

SIMONE CARDOSO LISBOA PEREIRA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E DE FATORES DE VIRULÊNCIA
DE *Klebsiella* sp. ISOLADAS DE DIETAS ENTERAIS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de "Doctor Scientiae".

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2001

SIMONE CARDOSO LISBOA PEREIRA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E DE FATORES DE VIRULÊNCIA
DE *Klebsiella* sp. ISOLADAS DE DIETAS ENTERAIS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de "Doctor Scientiae".

APROVADA: 10 de dezembro de 2001.

Prof^ª Elza Fernandes de Araújo
(Conselheira)

Prof. José Mário da Silveira Mezêncio
(Conselheiro)

Prof. Ernesto Hofer

Prof. Jorge Luiz Cavalcante Coelho

Prof^ª Maria Cristina Dantas Vanetti
(Orientadora)

A Deus, pela luz na caminhada, mesmo quando achava que não a via.

À Marcela, minha mais valiosa obra, que é motivação de tudo que faço.

À minha mãe, pelo amor, apoio e a imprescindível ajuda.

Ao Carlos Magno, pelo incentivo, amizade e carinho.

À tia Mariinha (*in memoriam*), por ter sempre acreditado
no meu potencial.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Microbiologia, pela oportunidade de realização do curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

À professora Maria Cristina Dantas Vanetti, pela orientação, por sua valiosa contribuição e especialmente, pela amizade.

À professora Elza Fernandes de Araújo pelas valiosas contribuições, conselhos, estímulos e amizade.

Ao professor José Mário da Silveira Mezêncio, pela contribuição fundamental na condução desse trabalho.

Aos professores Ernesto Hofer e Jorge Luiz Cavalcante Coelho, pelo atendimento ao convite de participação da banca de defesa desta tese.

Ao professor Marcelo José Vilela e à Selma, do Laboratório de Patologia do Câncer, pela atenção e gentileza em ceder uma linhagem de célula eucarótica.

À professora Marilda Carlos Vidoto, da Universidade Estadual de Londrina, pela valiosa contribuição e gentileza em ceder estirpes essenciais ao trabalho.

À professora Loreni Gimenes Giugliano e ao Evandro, da Universidade de Brasília, pela atenção e pela doação de uma linhagem de célula eucariótica e estirpes controles importantes.

À Dra. Marise Dutra Asensi, do Laboratório de Enterobactérias do Departamento de Bacteriologia-IOC-Fiocruz, pela presteza na realização das sorotipagens e pela rapidez nos esclarecimentos solicitados.

Ao professor João Carlos Pereira da Silva e ao funcionário Cláudio, do Laboratório de Histopatologia do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, pela realização das análises histopatológicas.

A todos os professores do Departamento de Microbiologia, pelos ensinamentos.

Aos funcionários Antônio Roberto, Paulo, José Carlos, Danilo, José Reinaldo, Evandro, Laura, Aparecida e Nilcéia pela amizade, respeito, dedicação e eficiência.

Aos funcionários do Laboratório de Imunologia e Virologia Molecular, Monteiro e Francisco, pela ajuda indispensável.

A todos os colegas do Departamento de Microbiologia, de cada laboratório, bem como os estagiários, pelo auxílio sempre que precisei, especialmente à professora Tânia, Andréa, Denise, Rodrigo, Jorge e ao Júpiter, do Laboratório de Genética.

Aos colegas do laboratório de Microbiologia de Alimentos, Ana Lúcia, Audecir, Cláudia Lúcia, Esther, Eliseth, Rachel, Rodrigo, Uelinton e Wanessa, pelo ótimo relacionamento, ajudas e incentivos.

À estagiária alemã Kathin Schuldt, pela imensurável ajuda na execução dos experimentos.

À Roberta Ribeiro Silva pela amizade, pelas valiosas discussões e também pelo incentivo em buscar oportunidades profissionais.

À Kiusa e Genuíno, pela amizade, apoio e incentivos no decorrer deste trabalho.

Aos meus irmãos e sobrinhos, pela torcida para que eu atingisse este objetivo importante.

Aos hospitais por cederem amostras do material a ser analisado, bem como as nutricionistas Daniela, Viviane e Carla.

BIOGRAFIA

SIMONE CARDOSO LISBOA PEREIRA, filha de Alberto Lisboa Neto e Terezinha Cardoso Lisboa, nasceu em São Paulo, Estado de São Paulo, no dia 03 de julho de 1971.

Em abril de 1990, ingressou na Universidade Federal de Viçosa-UFV, Minas Gerais, onde, em janeiro de 1994, graduou-se em Nutrição.

No período de fevereiro de 1994 a fevereiro de 1995, atuou como nutricionista, na qualidade de administradora da unidade de alimentação e nutrição da empresa Real Café, em Cariacica, Espírito Santo.

Em abril de 1995, iniciou o Curso de Mestrado em Microbiologia Agrícola na UFV, Minas Gerais, obtendo o título em julho de 1997.

Em agosto de 1997, iniciou o Curso de Doutorado em Microbiologia Agrícola na UFV, Minas Gerais.

Em julho de 2001, foi contratada como professora de Microbiologia Geral e dos Alimentos pela Faculdade Salesiana, em Vitória, Espírito Santo.

ÍNDICE

RESUMO	ix
ABSTRACT	xii
INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	18
CAPÍTULO 1	
CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE <i>Klebsiella</i> sp. ISOLADA DE DIETAS ENTERAIS	
1. INTRODUÇÃO	30
2. MATERIAL E MÉTODOS	33
2.1. Isolamento, identificação e sorotipagem de <i>Klebsiella</i> em dietas enterais.....	33
2.2. Análise de polimorfismo de DNA amplificado ao acaso.....	34
2.3. Análise por PCR-RFLP do rDNA.....	34
2.4. Análise dos dados.....	35
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
CAPÍTULO 2	
VIRULÊNCIA DE ISOLADOS DE <i>Klebsiella</i> sp.	
1. INTRODUÇÃO	57
2. MATERIAL E MÉTODOS	60
2.1. Estirpes bacterianas.....	60
2.2. Susceptibilidade a antibióticos.....	60

2.3. Aspecto mucóide e produção de cápsula	62
2.4. Ensaio de adesão e invasão em células eucarióticas	62
2.4.1. Análise quantitativa de adesão e invasão	62
2.4.2. Análise dos dados.....	64
2.4.2.1. análise de Agrupamento.....	65
2.5 Análise da produção de aerobactina.....	66
2.6 Atividade de fosfatidilcolina (PC-PLC) e de hemolisina.....	66
2.7. Detecção de enterotoxina termoestável.....	67
2.8. Determinação da dose letal (DL ₅₀).....	67
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	68
3.1. Aspecto mucóide e produção de cápsula	72
3.2. Ensaio quantitativo de adesão e invasão.....	74
3.3. Produção de aerobactina	85
3.4. Atividade hemolítica e de fosfatidilcolina (PC-PLC).....	87
3.5. Produção de enterotoxina termoestável	88
3.6. Determinação da DL ₅₀ em camundongos normais e imunodeprimidos	89
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	91
CAPÍTULO 3	
PATOGENICIDADE DE ISOLADOS DE <i>Klebsiella</i> sp. EM CAMUDONGOS	
1. INTRODUÇÃO	98
2. MATERIAL E MÉTODOS	101
2.1. Origem e manutenção das culturas	101
2.2. Concentrado de células viáveis da mistura de <i>Klebsiella</i>	102
2.3. Origem e manutenção dos animais	102
2.4. Delineamento experimental	103
2.5. Determinação da translocação de <i>Klebsiella</i> para os diferentes órgãos.....	104
2.6. Caracterização genética dos isolados obtidos nos diferentes órgãos	104
2.7. Histopatologia	105
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	106
3.1. Determinação analítica de <i>Klebsiella</i> sp. em diferentes órgãos de camundongos	106
3.2. Análises histopatológicas.....	113
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	114
RESUMO E CONCLUSÕES	117

RESUMO

PEREIRA, Simone Cardoso Lisboa, D.S., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2001. **Caracterização molecular e de fatores de virulência de *Klebsiella* sp. isoladas de dietas enterais.** Orientadora: Maria Cristina Dantas Vanetti. Conselheiros: Elza Fernandes de Araújo e José Mário da Silveira Mezêncio.

A identificação morfo-tintorial e bioquímica de 21 isolados de *Klebsiella* provenientes de amostras de dietas enterais artesanais revelou que 15 deles pertenciam a espécie *K. pneumoniae* e seis a *K. oxytoca*. A sorotipagem de *K. pneumoniae* identificou cinco isolados do sorotipo K5, um do sorotipo K4 e os demais não foram sorotipados pelos antissoros dos grupos K1 a K6. Os resultados das análises por RAPD e da região espaçadora 16S-23S do rDNA mostraram um polimorfismo acentuado entre os isolados de *K. pneumoniae* e um polimorfismo menor entre os isolados de *K. oxytoca*. O fragmento de DNA, de 1420 pb, gerado pela amplificação da região 16S do rDNA foi digerido por oito endonucleases de restrição e resultou padrões de RFLP idênticos para todos os isolados. As análises por RAPD e por PCR da região espaçadora do rDNA mostraram-se apropriadas para avaliar a diversidade genética entre estes isolados. A resistência a pelo menos dois antibióticos foi verificada em todos os isolados de *Klebsiella* e maior prevalência de resistência foi verificada aos antibióticos amoxicilina e ampicilina. Os isolados que apresentaram resistência a um maior

número de antibióticos pertenciam a espécie *K. pneumoniae* provenientes, principalmente, do hospital B. A produção de β -lactamase de espectro ampliado não foi verificada em nenhum dos isolados avaliados. Observou-se que a frequência de colônias mucóides entre as estirpes foi baixa (23,8%) e que a produção de cápsula foi verificada, microscopicamente, somente nas estirpes, cujas colônias apresentaram aspecto mucóide. *K. pneumoniae* apresentou maior adesão em células Caco-2 e HEp-2 enquanto *K. oxytoca* apresentou adesão expressiva apenas em células Caco-2. Porém, a invasão de *K. pneumoniae* foi constatada nas três linhagens de células eucarióticas, apesar dos índices terem sido baixos em relação aos de adesão. Somente os isolados da espécie *K. pneumoniae* apresentaram adesão e invasão nas células HEp-2. De uma forma geral, os índices de adesão e invasão foram maiores entre os isolados do hospital A. Nas condições usadas neste estudo, os isolados de *Klebsiella* não apresentaram atividade hemolítica, de fosfolipase e produção de enterotoxina termoestável, assim como do sideróforo aerobactina. A inoculação intraperitoneal em camundongos saudáveis e imunodeprimidos com estirpes selecionadas de *Klebsiella* para a determinação da DL_{50} não promoveu a morte dos animais, até uma concentração de 10^7 células por inoculação. Quando camundongos foram alimentados com dietas enterais ou ração não se observou a presença de colônias típicas de *Klebsiella* na análise de amostras do fígado, baço, coração, rim e pulmão dos animais. Entretanto, em amostras de fígado e pulmão dos camundongos dos grupos que receberam drogas imunodepressoras e, ou antimicrobiana, alimentados ou não com dieta enteral contaminada com 6×10^9 UFC/animal de *Klebsiella*, a presença de colônias típicas foi constatada. Em animais que receberam somente a dieta contaminada, a translocação de *Klebsiella* também foi observada. A análise do perfil genético, por RAPD, de isolados recuperados desses órgãos revelou similaridades com os padrões de bandas de DNA das estirpes de *Klebsiella* administradas aos animais, via oral. A presença de *Klebsiella* no fígado de camundongos que não receberam fonte exógena de *Klebsiella*, mas que receberam a combinação de medicamentos, sugere que estirpes da microbiota intestinal autóctone foram capazes de

translocar quando houve uma depressão do sistema imunológico e uma descontaminação seletiva, promovidas pelo corticóide e antibiótico, respectivamente. A colonização por *Klebsiella*, proveniente das dietas enterais, no intestino também foi facilitada quando medicamentos imunodepressores e antimicrobianos foram utilizados.

ABSTRACT

PEREIRA, Simone Cardoso Lisboa, D.S., Universidade Federal de Viçosa, December, 2001. **Pathogenicity of *Klebsiella* spp. isolated from enteral formulae.** Advisor: Maria Cristina Dantas Vanetti. Committee members: Elza Fernandes de Araújo and José Mário da Silveira Mezêncio.

Biochemical testing and microscopic observations of stained cells were used to identify 21 *Klebsiella* isolates from hospital enteral formulae. Fifteen of the isolates were identified as *K. pneumoniae* and six as *K. oxytoca*. Serotyping of *K. pneumoniae* identified five isolates belonging to serological group K5 and one to serological group K4 while the rest could not be identified using the antisera in serological groups K1 through K6. Results of RAPD analysis and of the 16S-23S rDNA intergenic spacer revealed accentuated polymorphism among the *K. pneumoniae* isolates and a lesser polymorphism among the *K. oxytoca* isolates. The 1420 bp DNA fragment generated by amplification of the 16S rDNA region digested with eight restriction endonucleases resulted in identical RFLP patterns for all isolates. RAPD and PCR analyses of the rDNA intergenic spacer were shown to be appropriate tools for evaluating genetic diversity among the isolates. Resistance to at least two antibiotics was observed in all *Klebsiella* isolates, with greater prevalence of resistance to amoxicillin and ampicillin. *K. pneumoniae* isolates presented resistance to the greatest number of antibiotics,

especially those isolated from Hospital B. Broad-spectrum β -lactamase production was not observed in any isolate. Presence of mucous was infrequent (6.7%) and capsule production was only observed among the isolates that presented moderate to intense mucous production. Adhesion and invasion were observed in Caco-2 and HEp-2 cells, but not in VERO cells. Only *K. pneumoniae* isolates adhered to and invaded HEp-2 cells. No hemolysin activity, phospholipase activity, thermostable enterotoxin production or aerobactin siderophore production were observed under the conditions used in this study. Selected *Klebsiella* isolates were inoculated intraperitoneally in healthy and immunodepressed mice to determine LD₅₀ but did not prove lethal, demonstrating the avirulence of the isolates. When mice were given enteral formula or animal feed, no typical *Klebsiella* colonies were observed in liver, spleen, heart, and kidney or lung samples. However, typical colonies were observed in liver and lung samples from animals that received immunodepressant and/or antimicrobial drugs, regardless of whether or not the animals received enteral formula contaminated with 6×10^9 CFU *Klebsiella* per animal. In animals that only received the contaminated formula, translocation was also observed. Genetic profile analysis of isolates retrieved from these organs by RAPD revealed similarities to the DNA band patterns of the *Klebsiella* strains administered orally to the animals, confirming pathogen translocation. Presence of *Klebsiella* in livers of mice that did not receive an external source of *Klebsiella* but that received a combination of medications suggests that autochthonous intestinal microbial strains are able to translocate when the immunological system is depressed as well as a selective decontamination promoted by corticoids and antibiotics, respectively. Intestinal colonization by *Klebsiella* isolated from enteral formula was also facilitated when immunodepressant and antimicrobial medications were used.

INTRODUÇÃO GERAL

A magnitude de doenças causadas por microrganismos em alimentos é subestimada, tanto pelas pessoas em geral quanto por profissionais da área de saúde. Estima-se que, nos Estados Unidos, essas doenças resultem, anualmente, em 325.000 hospitalizações, 5.000 mortes e perdas econômicas da ordem de cinco bilhões de dólares (DOYLE, 2000). Além disso, os surtos relatados que envolvem poucos indivíduos são, geralmente, investigados de forma inadequada.

A transmissão de microrganismos patogênicos ou potencialmente patogênicos, via alimentos, é particularmente importante quando ocorre em indivíduos hospitalizados. Aproximadamente 50% das infecções que acometem pacientes hospitalizados são causadas por microrganismos hospitalares que colonizam o trato gastrointestinal (SHOOTER et al., 1971). Apesar disso, pouca importância é dada aos alimentos como fonte de microrganismos capazes de causar infecções hospitalares (ARIAS et al., 1998).

Pacientes em tratamentos intensivos, muitas vezes, necessitam de um suporte nutricional por dietas enterais. São pacientes que possuem o trato gastrointestinal funcionando, mas que, em razão de patologias e, ou cirurgias, estão impossibilitados de alimentar-se por via oral (COSTA et al., 1998). A dieta é administrada por uma sonda que, normalmente, finaliza no duodeno ou jejuno, ultrapassando a barreira ácida do estômago. Nesse meio, em pH alcalino, os

microrganismos contaminantes podem proliferar e colonizar o intestino, cuja microbiota residente pode ter sido diminuída pelo uso sistêmico de antibióticos (ARIAS et al., 1998). Além disso, essa colonização pode ser facilitada pela redução do peristaltismo, que ocorre em resposta ao uso desse medicamento.

As condições de preparo, estocagem, transporte e administração das dietas enterais podem permitir a contaminação e o crescimento microbiano. A ingestão de dietas enterais contaminadas pode comprometer a evolução clínica dos pacientes e resultar em complicações terapêuticas, tais como vômitos, distensão abdominal, pneumonia, diarreia, colonização do trato gastrointestinal e septicemia, contribuindo para um aumento significativo do tempo de permanência hospitalar e da taxa de letalidade (ARIAS et al., 1998).

Pacientes que receberam dietas enterais contaminadas com aeróbios mesófilos, coliformes totais e *Escherichia coli*, apresentaram sintomas de gastroenterites 10,5 vezes mais do que aqueles que receberam as dietas não contaminadas (NAVAJAS et al., 1992). A gravidade dessa contaminação é acentuada em pacientes que estão em tratamento com antibióticos de administração sistêmica. Nessa condição, a resistência à colonização intestinal é menor, uma vez que a microbiota competitiva foi eliminada ou reduzida (ARIAS et al., 1998; ASENSIO et al., 2000).

Vários autores relataram a contaminação de dietas enterais por bactérias Gram-negativas como *Klebsiella* sp. (SCHOOTER et al., 1971; CASEWELL e PHILLIPS, 1978; MONTGOMERIE, 1979; COOKE et al., 1980; THURN et al., 1990; COSTA et al., 1998; OKUMA et al., 2000), *Enterobacter cloacae* (CASEWELL et al., 1981; LEVY et al., 1989, THURN et al., 1990; COSTA et al., 1998; ARIAS et al., 1999), *E. coli* (SCHOOTER et al., 1971; ARIAS et al., 1998; ARIAS et al., 1999), *Pseudomonas aeruginosa* (SCHOOTER et al., 1971; ARIAS et al., 1999), *Acinetobacter* sp. (OKUMA et al., 2000), *Serratia marcescens* (THURN et al., 1990; ARIAS et al., 1999) e *Salmonella* Enteritidis (GILL e GILL, 1981). Bactérias Gram-positivas são encontradas menos frequentemente em dietas enterais (ARIAS et al., 1998).

CASEWELL e PHILLIPS (1978) encontraram que, em 47 amostras de dietas enterais, 32 (68%) estavam contaminadas com 10^4 UFC de *Klebsiella* sp. por mililitro. Nesse estudo, a presença de *Klebsiella* foi também verificada em equipamentos, utensílios e superfícies de trabalho no setor de nutrição e dietética dos hospitais e os resultados mostraram que os isolados tinham o mesmo tipo capsular daqueles isolados das dietas enterais. *Klebsiella* sp. foi também o contaminante mais freqüente em manipuladores, utensílios e superfícies de trabalho de um serviço de alimentação hospitalar do município de Viçosa, MG (LISBOA, 1997).

MATHUS-VLIEGEN et al. (2000) avaliaram a contaminação de frascos e aparelhos de bombeamento de dietas enterais após 24 horas do início da administração da dieta, nos pacientes em tratamento intensivo e constataram que 4% dos frascos e 74% dos aparelhos apresentavam contaminação superior a 10^2 UFC/mL. Os isolados mais freqüentes foram *K. oxytoca*, *E. cloacae* e enterococos.

O gênero *Klebsiella*

Klebsiella pneumoniae foi descrita pela primeira vez, em 1882 por Friedländer e denominada inicialmente de *Bacillus friedlaenderi* e posteriormente, *Bacterium pneumoniae*. A denominação de *Klebsiella* foi dada ao gênero em homenagem ao bacteriologista alemão Edwin Klebs e, inicialmente, compreendia as espécies: *K. pneumoniae*, *K. ozaenae* e *K. rhinoscleromatis*. Entretanto, com a introdução de técnicas de hibridização do ácido desoxiribonucléico (DNA), ficou demonstrado que essas espécies bacterianas possuíam seqüências de DNA homólogas (BRENNER et al., 1972), pertencendo assim a mesma espécie, *K. pneumoniae*. Os isolados de *K. pneumoniae* passaram então a ser classificados em três subespécies: *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae* e *K. pneumoniae* subsp. *rhinoscleromatis*. Estudos moleculares adicionais à hibridização de DNA, descreveram outras espécies do gênero: *K. oxytoca* (BRENNER et al., 1972), *K. planticola*

(BAGLEY et al., 1981), anteriormente designada *K. trevisanii*, *K. terrigena* (IZARD et al., 1981) e *K. ornithinolytica* (SAKAZAKI et al., 1989).

As bactérias do gênero *Klebsiella* são encontradas amplamente distribuídas na natureza, tendo sido isoladas do solo, de vegetais e água e de humanos e animais, como colonizadores do trato gastrointestinal (PODSCHUM e ULLMANN, 1998). Já foi identificada como principal componente da microbiota em vários tipos de ambientes hostis e não clínicos, como águas que recebem resíduos industriais (CAPLENAS et al., 1981), alimentos com altas concentrações de açúcar e ácido (MUNDT et al., 1978) e sucos de laranja concentrados e congelados (FUENTES et al., 1985).

Em humanos, *Klebsiella* sp. pode ser encontrada em indivíduos sadios residentes urbanos, trabalhadores de hospitais e pacientes, numa proporção que varia entre 30 a 37% sendo 29 a 35% de origem entérica e 3 ou 4% encontrados orofaringe (DAVIS e MATSEN, 1974).

Klebsiella sp. é um paradigma de patógeno oportunista entre os bacilos Gram-negativos, sendo uma das principais bactérias responsáveis por infecções hospitalares. Em ambientes hospitalares essa bactéria tem sido descrita como agente etiológico de infecções do trato urinário, corrente sangüínea, trato respiratório baixo, via biliar e feridas cirúrgicas. Outras infecções como endocardite, diarreia e meningite também podem ser causadas por esse agente (MEYER et al., 1993). Depois de *E. coli*, *Klebsiella* sp. é a causa mais comum de septicemia provocada por bactérias Gram-negativas, com taxa de letalidade de até 50% (HANSEN et al., 1998).

Desde a última década, surtos de infecção por *K. pneumoniae* em hospitais, são registrados com uma frequência crescente (LHOPITAL et al., 1997). No Brasil, de acordo com o primeiro diagnóstico das infecções hospitalares realizado em 1994, pelo Ministério da Saúde, 18,1% das bactérias encontradas nas infecções hospitalares foram *Klebsiella* sp., superadas somente por *P. aeruginosa*, presente em 19,6% dos casos avaliados (BRASIL, 1995).

Klebsiella sp. pode causar infecção em humanos, variando de colonização assintomática do trato intestinal, urinário ou respiratório à septicemia. Infecções

comunitárias e nosocomiais por *Klebsiella* são causadas principalmente por *K. pneumoniae* e *K. oxytoca*, numa proporção de dois para um (BAUERNFEIND et al., 1981). Infecções por *K. planticola* são ocasionais (PODSCHUN e ULLMANN, 1998) e por *K. terrigena* são excepcionais (PODSCHUN et al., 2000). *K. pneumoniae* pode causar pneumonia lobar, que é uma doença grave, com altas taxas de fatalidade, de origem comunitária, que atinge freqüentemente pessoas com doenças de base específicas como por exemplo, diabete *mellitus* e doença pulmonar obstrutiva crônica ou alcoolismo por meio do refluxo de alimentos (conseqüência do alcoolismo), pois esses indivíduos apresentam depressão dos mecanismos de defesa das vias aéreas superiores. O tipo capsular K1 é mais freqüentemente isolado nessas situações, embora os tipos K2 a K6, considerados endêmicos em hospitais, também possam estar envolvidos (EICKOFF et al., 1966; ØRSKOV, 1981).

Os fatores que predisõem às infecções hospitalares por *K. pneumoniae* ou *K. oxytoca* são: idade avançada; alcoolismo crônico; doenças pulmonares, renais e cardíacas crônicas ou doenças neoplásicas (FELDMAN et al., 1990).

Embora *K. pneumoniae* seja raramente implicada como causa de gastroenterites via alimentos e não é comumente considerada como enteropatógeno, há estudos que relatam essa bactéria como agente causal de gastroenterites. RENNIE et al. (1990) reportaram um surto, em que as informações como, período de incubação, sintomas predominantes e o alimento envolvido, indicavam uma gastroenterite causada por *Clostridium perfringens*. Porém, a análise do padrão plasmidial e de enterotoxina em amostras fecais e do alimento, sugeriram *K. pneumoniae* como agente causal da síndrome. *K. pneumoniae* foi isolada em 12% dos casos de diarreia aguda em crianças com menos de três anos (ANANTHAN et al., 1999). Oito (67%) desses isolados foram caracterizados como enterotoxigênicos e apresentaram resistência a cinco antibióticos: ampicilina, estreptomicina, ceftazidima, cefuroxima e cotrimoxazole; e sensibilidade somente a antibióticos da classe quinolona. Isolados de *K. pneumoniae* de crianças com diarreia apresentaram mecanismos

incomuns de adesão a células da mucosa intestinal sugerindo a possibilidade de um novo mecanismo de virulência (NIYOGI et al., 2000)

Pela primeira vez registrado na literatura, SABOTA et al. (1998) reportaram *K. pneumoniae* como um patógeno de origem alimentar enteroinvasivo, em uma pessoa sadia. A infecção alimentar resultou do consumo de hambúrguer, sendo que os isolados de sangue e do produto tinham o mesmo padrão plasmidial, bioquímico, sensibilidade a antimicrobianos e produziram enterotoxinas termossensíveis. A infecção alimentar provocou a internação do indivíduo em unidade de tratamento intensivo, com episódio de septicemia, que evoluiu para disfunção orgânica múltipla: colapso cardiovascular; falência respiratória, renal e hepática e coagulação intravascular disseminada.

Métodos de tipagem de *Klebsiella*

Métodos como a biotipagem, sorotipagem, fagotipagem, tipagem por bacteriocinas e tipagem molecular têm sido usados com graus variados de sucesso na tipagem de *Klebsiella*.

A biotipagem baseia-se num painel extenso de testes culturais e bioquímicos e é, certamente, um método mais prático para laboratórios que não são equipados satisfatoriamente para estudos epidemiológicos. A biotipagem pode ser conduzida utilizando testes convencionais, em tubos de cultura (HAVERKORN e MICHEL, 1979) ou combinados a sistemas miniaturizados, disponíveis comercialmente, como API20E (PODSCHUN et al., 1986). Entretanto, em razão do grande número de reações a serem testadas e tempos longos de cultivo, a biotipagem de *Klebsiella* não é muito sustentável como uma ferramenta epidemiológica.

A sorotipagem, amplamente utilizada para tipagem de *Klebsiella* sp., é baseada na caracterização de acordo com o antígeno capsular (ØRSKOV e ØRSKOV, 1984). *Klebsiella* usualmente possui uma cápsula de polissacarídeo que confere um aspecto mucóide característico à colônia. Dos 82 antígenos

capsulares descritos, 77 tipos formam a base para um esquema de antígenos de cápsulas, internacionalmente reconhecido (PODSCHUN e ULLMANN, 1998). Além desses, 12 diferentes tipos de antígenos O têm sido descritos, mas são de difícil classificação pois sua determinação é dificultada pela instabilidade da cápsula ao calor (ØRSKOV e ØRSKOV, 1984). A tipagem capsular por contraste apresenta reprodutibilidade satisfatória e é capaz de diferenciar muitos isolados clínicos (AYLING-SMITH e PITT, 1990). Entre as desvantagens desse método citam-se o grande número de reações sorológicas cruzadas ou a presença de determinantes antigênicos comuns que ocorrem entre os 77 tipos capsulares. Como a maioria dos antissoros anti-capsulares não são disponíveis comercialmente, essa técnica, geralmente, é conduzida em laboratórios especializados.

Em contraste à tipagem dos antígenos K, praticamente nenhum outro processo bioquímico, sensibilidade a bacteriocina ou fagotipagem, são suficientemente discriminatórias e reproduzíveis para propósitos epidemiológicos (PODSCHUN e ULLMANN, 1998). O uso combinado de biotipagem e tipagem capsular capacita a diferenciação de um grande número de biosorotipos (RENNIE e DUNCAN, 1974).

A caracterização genotípica de *Klebsiella* sp., assim como de outras bactérias de importância clínica, é de grande relevância epidemiológica na saúde pública. Os métodos recentemente utilizados nessa caracterização, são: análise de DNA genômico por eletroforese em gel em campo pulsado-PFGE (CHETOUI et al., 1999; CHANG et al., 2000; SU et al., 2000; TRAUB et al., 2000) e por polimorfismo de DNA amplificado ao acaso-RAPD (LHOPITAL et al., 1997; SHANNON et al., 1998; HURTADO e RODRÍGUEZ-VALERA, 1999; YOUSSEF et al., 1999), análise de perfil de DNA plasmidial (GLATMAN et al., 1994; MONTEROS et al., 1994; YOUSSEF et al., 1999) e de polimorfismo de rDNA (BERMUDE et al., 1997; LHOPITAL et al., 1997; SARUTA et al., 1997; BRISSE et al., 2000).

A técnica PFGE tem demonstrado ser eficiente na caracterização genotípica de *Klebsiella* e a principal vantagem é a alta reprodução dos padrões

obtidos (LHOPITAL et al., 1997; CHETOUI et al., 1999; CHANG et al., 2000; SU et al., 2000; TRAUB et al., 2000).

A análise de DNA amplificado ao acaso -RAPD é apropriada para estudos de epidemiologia molecular, onde objetivam-se caracterizar geneticamente, diferentes estirpes em uma dada espécie (LHOPITAL et al., 1997; HURTADO e RODRÍGUEZ-VALERA, 1999). Esse método baseia-se na amplificação de DNA total, com um único oligonucleotídeo iniciador de seqüência aleatória, geralmente de 10 nucleotídeos, sob condições que favorecem o anelamento. EISEN et al. (1995) constataram quatro padrões RAPD distintos entre 48 estirpes de *K. pneumoniae* de infecções nosocomiais isoladas em um hospital na Austrália, com resistência múltipla a antibióticos, utilizando dois oligonucleotídeos. Em outro estudo envolvendo marcadores moleculares para diferenciação de estirpes nosocomiais de *K. pneumoniae*, realizado em um hospital pediátrico na França, os autores observaram seis padrões RAPD distintos entre os 22 isolados clínicos estudados (LHOPITAL et al., 1997). Com o objetivo de caracterizar estirpes clínicas de *K. pneumoniae* isoladas de crianças com desnutrição em uma comunidade americana foram analisadas quanto ao perfil plasmidial, de susceptibilidade a antimicrobianos e a técnica RAPD (YOUSSEF et al., 1999). Os resultados mostraram que o RAPD foi mais sensível na tipagem e na diferenciação das estirpes, pois aquelas com os mesmos antibiotipos e o mesmo perfil plasmidial, apresentaram padrões de bandas de DNA diferentes.

O número e tamanho de plasmídeos e/ou seus fragmentos gerados por endonucleases de restrição, são avaliados com freqüência, uma vez que, vários determinantes genéticos de patogenicidade estão contidos nesses elementos. Porém, a determinação de padrão plasmidial para diferenciação genética possui a desvantagem de limitar-se a estirpes que contém plasmídeos. A instabilidade dos plasmídeos e o fato de serem elementos genéticos transmissíveis, resultam em uma técnica com baixa reprodutibilidade (LHOPITAL et al., 1997).

A análise por RFLP do rDNA que codifica a subunidade 16S do RNA, assim como a análise por PCR da região espaçadora do rDNA têm sido ferramentas empregadas e com alta reprodutibilidade, na caracterização genética

de *Klebsiella* (LHOPITAL et al., 1997; SARUTA et al., 1997; STTEPHAN et al., 2001). Essa análise é baseada em reações de PCR de regiões específicas do cromossomo. Genes que codificam rRNA (16S, 23S e 5S) em bactérias, estão organizados em operons *rrn* multicópias. Estratégias de ribotipagem-PCR são reportadas utilizando oligonucleotídeos iniciadores complementares às seqüências que codificam os RNAs ribossomais 16S e 23S (STTEPHAN et al., 2001).

Resistência de *Klebsiella* a antibióticos

Como a maioria dos bacilos Gram-negativos hospitalares, estirpes de *Klebsiella* podem apresentar resistência múltipla a antimicrobianos, constituindo-se uma fonte importante de disseminação de genes que conferem resistência a antibióticos no ambiente hospitalar. As mudanças relativamente rápidas no padrão de susceptibilidade a antibióticos em isolados clínicos de *K. pneumoniae* e a descrição cada vez maior de surtos hospitalares causados por esses agentes, chamam a atenção para a importância que esse patógeno oportunista pode assumir no ambiente hospitalar (GALES, 1997).

Estirpes de *K. oxytoca* e *K. pneumoniae* são naturalmente resistentes a ampicilina e carbenicilina e susceptíveis a outros antibióticos β -lactâmicos. Essa resistência é atribuída a produção de uma penicilinase, codificada por um gene localizado no cromossomo, e que é inibida por ácido clavulânico. Uma pequena zona de inibição, ao redor de um disco contendo 100 μ g de carbenicilina, é típico e caracteriza esse fenótipo (JARLIER, 1985). Além disso, *K. pneumoniae* é, geralmente, susceptível a colistina, ácido nalidíxico, quinolona e associação de trimetroprina-sulfametoxazol (WATANABE et al., 1980) e, susceptíveis a aminoglicosídeos.

A resistência adquirida por *K. pneumoniae* freqüentemente, é atribuída a atividade de β -lactamases determinadas por plasmídeos que conferem resistência a carbenicilina, ureidopenicilinas, cefalotina, cefamandole e cefuroxime

(JARLIER, 1985). No início dos anos 80, foi relatado na Alemanha o isolamento de estirpes de *K. pneumoniae* produtoras de β -lactamases, codificadas por genes plasmidiais, identificadas como enzimas TEM-1, TEM-2 e TESHV-1 e que conferiam resistência as cefalosporinas de amplo espectro e a monobactams (KOTHE et al., 1983). Posteriormente, essas enzimas receberam a denominação de β -lactamases de espectro ampliado ("extended-spectrum β -lactamases-ESBL"), pois conferiam resistência a um maior número de antimicrobianos. Essas enzimas não reconhecem as cefamicinas e os carbapenems como substrato e, bactérias produtoras dessas β -lactamases permanecem sensíveis, *in vitro*, à ação dessas drogas. Outra característica fenotípica importante dos organismos produtores dessas enzimas, é a sensibilidade à ação dos inibidores de β -lactamases, como sulbactam, ácido clavulânico e tazobactam (SHANNON et al., 1990). Apesar das ESBL terem sido descritas inicialmente em isolados do gênero *Klebsiella*, outras bactérias da família *Enterobacteriaceae*, tais como *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Serratia marcescens*, *Morganella morganii* e espécies de *Enterobacter* e *Citrobacter* são produtoras desse tipo de β -lactamases (De CHAMPS et al., 1991).

A ocorrência de infecções hospitalares causadas por *K. pneumoniae* que expressam as ESBL tem aumentado desde o primeiro surto registrado em 1984 (RITTER et al., 1992). No Brasil, a prevalência de amostras de *K. pneumoniae* produtoras de ESBL já chega a 39% (GALES, 1997).

As mudanças no padrão de susceptibilidade a antibióticos em isolados clínicos de *K. pneumoniae* são relativamente rápidas. YIGIT et al. (2001) identificaram uma β -lactamase produzida por estirpes de *K. pneumoniae*, que hidroliza carbapenem e é codificada por um gene presente em um plasmídeo de 50 Kb. A emergência de resistência a antibióticos anteriormente eficientes no tratamento de infecções hospitalares por *K. pneumoniae*, como o imipinem foi constatada em isolados clínicos (CAO et al., 2001).

Fatores de virulência em *Klebsiella*

Estirpes de *K. pneumoniae* podem conter uma combinação de fatores de virulência, dos quais os mais importantes são: a natureza da cápsula de polissacarídeos da membrana externa, fímbrias mediadoras de aderência, o sistema aerobactina e aspecto mucóide das colônias (VERNET et al., 1992; 1995). Outros fatores de virulência também são relatados como a hemolisina (CAMPRUBI et al., 1990), enterotoxinas termolábeis e termoestáveis (WADSTROM et al., 1976; KLIPSTEIN et al., 1983), lipopolissacarídeos (WILLIAMS e TOMAS, 1990) e produção de fosfolipases (SINGH et al., 1999).

O primeiro fator de virulência descrito para células do gênero *Klebsiella* foi a cápsula, constituída de polissacarídeos e que circunda a célula. POLLACK (1976) encontrou concentrações detectáveis de polissacarídeos capsulares em sangue de pacientes infectados por *K. pneumoniae* e sugeriu a correlação entre antigenicidade e severidade de infecção. Essa cápsula produzida por *Klebsiella* é composta de polissacarídeo ácido complexo e é essencial para virulência (ØRSKOV e ØRSKOV, 1984).

SIMOONS-SMIT et al. (1984) estudaram a virulência de isolados clínicos de *Klebsiella* em um modelo, utilizando camundongos, e mostraram que estirpes com antígenos capsulares K1, K2, K4 e K5 eram mais virulentas do que estirpes com antígeno capsular igual ou maior a K6. Tentativas para estabelecer a correlação entre sorotipos de *Klebsiella* e o sítio de infecção ou sintomas clínicos têm produzido resultados contraditórios. Muitos relatos concordam, entretanto, que o sorotipo K2 está entre os mais importantes tipos capsulares isolados de pacientes com infecções do trato urinário, pneumonia, ou bacteremia. Pode-se assumir então que, K2 é o sorotipo predominante de isolados clínicos humanos em todo o mundo, uma vez que esse sorotipo foi mais raramente encontrado em ambientes (PODSCHUN e ULLMANN, 1998). Até o presente, estirpes dos tipos capsulares K1 e K2 são especialmente consideradas virulentas, porém poucos dos 77 antígenos capsulares foram sistematicamente estudados.

Alguns isolados de *K. pneumoniae* encapsulados possuem colônias mucóides de consistência viscosa. A ausência desse fenótipo em subculturas foi associado com a redução da virulência. O aspecto mucóide das colônias é determinado por um gene, designado *rmpA*, localizado em um plasmídeo de 180 Kb (NASSIF et al., 1989) e influenciado pelos meios de cultura. O aspecto mucóide das colônias de *Klebsiella* pode apresentar variações. De acordo com KAUFFMANN (1949; 1966), existem as formas lisas e rugosas. As formas lisas podem variar apresentando aspecto mucóide (M) cápsula (K) e antígeno O (O), ou K-O, ou M-O, ou O. As forma rugosas podem conter aspecto M-K e aspecto rugoso (R), ou K-R, ou M-R, ou R. A influência da cápsula em interações com células epiteliais foi avaliada, utilizando um mutante defeutivo na síntese de cápsula (FAVRE-BONTES et al., 1999). Os resultados sugeriram que a cápsula desempenha um papel ativo durante a etapa inicial da patogênese por interagir com células produtoras de muco no intestino.

A adesão à superfície de mucosas é, freqüentemente, a primeira etapa no desenvolvimento de infecções. A capacidade de espécies de bactérias entéricas em reconhecer e colonizar um nicho ao longo do trato intestinal é baseada, principalmente, na distribuição de receptores e interpretação de uma combinação de sinais ambientais que levam a expressão de fatores de aderência específicos (EDWARDS e PUENTE, 1998).

As propriedades de adesão em *Enterobacteriaceae* são geralmente mediadas por diferentes tipos de fímbrias. Fímbrias são classificadas, principalmente, com base na sua capacidade de aglutinar eritrócitos de diferentes espécies animais. Dependendo se a reação é inibida ou não por D-manose, essas adesinas são designadas como sensíveis à manose ou resistentes a manose. Dos diferentes tipos de adesinas fimbriais descritas em enterobactérias, dois tipos são predominantes em *Klebsiella* (CLEGG e GERLACH, 1987). A fímbria do tipo 1 é a mais investigada de todas as fímbrias bacterianas. São sensíveis a manose e sua relevância para a virulência das bactérias é principalmente, por permitir a ligação a mucosas ou células epiteliais do trato urinário, respiratório e intestinal (JONES e ISAACSON, 1983; FAVRE-BONTES et al., 1999).

As fimbrias do tipo 3 são resistentes a manose e capazes de ligarem a várias células humanas como as endoteliais, do epitélio do trato respiratório e células uroepiteliais (WÜRKER et al., 1990; HORNICK et al., 1992, TARKKANEM et al., 1997). O papel desse tipo de fimbria no processo patogênico não é conhecido.

Três novos tipos de adesinas de *Klebsiella* foram recentemente reportadas. A adesina CF29K de *Klebsiella* participa da aderência a linhagens de células intestinais humanas Caco-2 e Intestino-407 (DARFEUILLE et al., 1992). Um padrão de aderência caracterizado por adesão agregativa para linhagens de células intestinais é mediada por um outro tipo de adesina que é composta por material extracelular como a cápsula (FAVRE-BONTE et al., 1995). Enquanto essas duas adesinas não são fimbriais, um terceiro fator de colonização de intestino humano é uma fimbria denominada KPF-28 (DI MARTINO et al., 1996). Este tipo de fimbria tem sido encontrado na maioria das estirpes de *K. pneumoniae* produtoras de ESBL. Pouco é conhecido sobre a frequência e distribuição dessas novas adesinas descritas.

O plasma humano é bactericida para *K. pneumoniae* e seu efeito parece ser altamente dependente da disponibilidade de ferro, essencial para o crescimento bacteriano (GRIFFITHS, 1987; BULLEN et al., 2000). O suprimento de ferro livre para a bactéria no hospedeiro é extremamente baixo, pois, se encontra ligado intracelularmente a proteínas como hemoglobina, ferritina, e hemosiderina e, extracelularmente, a proteínas com alta afinidade por ferro, como lactoferrina e transferrina. A concentração de ferro biodisponível é de 10^{-18} M, e é muitas vezes menor do que o necessário para o crescimento bacteriano (BUFFENMEYER et al., 1976). Muitas bactérias tentam garantir o seu suprimento de ferro no hospedeiro secretando substâncias com alta afinidade por esse nutriente, os sideróforos, que solubilizam e ajudam na importação do ferro requerido. Em isolados clínicos de *Klebsiella* já foi confirmada a produção dos sideróforos enterobactina e aerobactina representantes de dois grupos químicos, fenolato e hidroxamato, respectivamente (WILLIAMS et al., 1987; REISSBRODT e RABSCH, 1988; PODSCHUN et al. 1992). Em *K. pneumoniae* do sorotipo K2 a

aerobactina é codificada por um plasmídeo grande e conjugativo (KRONE et al., 1985). NASSIF e SANSONETTI (1986) também correlacionaram a virulência de *K. pneumoniae* sorotipo K1 e K2 com a presença de plasmídeo de 180 Kb que contém o gene que codifica a aerobactina.

Embora existam evidências da importância da aerobactina na patogenicidade de *Klebsiella*, alguns autores têm verificado a baixa frequência desse fator de virulência entre isolados clínicos. VERNET et al. (1995) constataram que, em 241 isolados clínicos de *K. pneumoniae*, apenas 6,7% apresentaram produção de aerobactina. PODSCHUN et al. (2000) verificaram, em um estudo comparativo de fatores de virulência entre isolados clínicos de *K. terrigena* e *K. pneumoniae*, que nenhuma das 74 estirpes de *K. terrigena* e apenas 5% das 50 estirpes de *K. pneumoniae*, tinham a capacidade de sintetizar aerobactina.

Pouco se conhece sobre a hemolisina, outro fator de virulência em *Klebsiella* sp. detectado *in vitro*, em ágar sangue com eritrócitos de coelho (ALBESA et al., 1980). Desde então, esses autores estudam essa citolisina (ALBESA et al., 1985; ALBESA, 1989) e demonstraram ser essa a primeira hemolisina ativada por tióis descrita em bactérias Gram-negativas. Sua síntese ocorre na fase exponencial de crescimento, é inibida por soro anti-estreptolisina e possui estrutura protéica. Porém, a sua importância no processo infeccioso por *Klebsiella* não está claro.

Enterotoxinas termolábeis e termoestáveis produzidas por *K. pneumoniae* também são consideradas como fatores de virulência (WADSTROM et al., 1976; KLIPSTEIN et al., 1983). RENNIE et al. (1990) relataram um caso de gastroenterite causada pela ingestão de carne de peru contaminada por *K. pneumoniae*, produtora de enterotoxina sensível ao calor. GUARINO et al. (1989) avaliaram características e mecanismo de ação de uma enterotoxina estável ao calor, produzida por *K. pneumoniae* isolada de crianças com diarreia secretória. Esses autores verificaram tratar-se de enterotoxina solúvel em metanol, sensível a mercaptoetanol, ativa em pH baixo, mas não em pH acima de

8,0, capaz de reduzir a absorção de sódio e secreção de cloro e aumentar a concentração de cGMP, mas não a de cAMP.

Os patógenos possuem vários mecanismos que podem agir individualmente ou em combinação para produzirem infecção ou doença. A remoção de alguns desses fatores de virulência pode ou não tornar uma bactéria avirulenta. Além disso, tem-se que considerar o papel complexo do hospedeiro, enfatizando estudos com modelos animais e explorando o conhecimento da biologia celular e da imunologia (FINLAY e FALKOW, 1989). Neste contexto, vários estudos que avaliam a patogenicidade e a presença de fatores de virulência em bactéria, realizam testes experimentais *in vivo*.

Os estudos de virulência em modelos animais são importantes pois, fatores de virulência podem não ser essenciais *in vitro*, mas desempenharem um papel importante na patogênese de uma bactéria *in vivo*. A expressão desses fatores é alterada em resposta ao ambiente do hospedeiro, como pH, metabólitos, íons metálicos, osmolaridade e temperatura., que muitas vezes não são reproduzidos em experimentos laboratoriais (FINLAY e FALKOW, 1989).

Experimentos em camundongos com isolados clínicos de *Klebsiella* têm sugerido que estirpes virulentas são aquelas cuja dose letal é menor ou igual a 1.000 células e as não virulentas são aquelas que apresentam dose letal superior a 1 milhão (NASSIF e SANSONETTI, 1986; VERNET et al. 1992, 1995; LE ROY et al., 1995; FAVRE-BONTES et al., 1999 e PODSCHUN et al., 2000). Essa determinação tem como critério de virulência, a morte de camundongos inoculados intraperitonealmente com diluições consecutivas de bactéria (REED e MUENCH, 1938).

Apesar da dose letal ser amplamente utilizada em estudos de patogenicidade bacteriana, ela pode não distinguir estirpes virulentas de avirulentas, principalmente em pessoas com o sistema imunológico deprimido. Uma modificação desse método envolve a imunodepressão dos camundongos antes da inoculação intraperitoneal da bactéria (LAMMERDING et al., 1992).

Outra metodologia *in vivo* que tem sido proposta para avaliar a virulência de bactéria, especialmente aquelas veiculadas por alimentos, é a determinação da

translocação de bactérias inoculadas por via oral. Essa determinação tem como critério de virulência a capacidade de invasão gastrointestinal e infecção de órgãos vitais (LAMMERDING et al., 1992).

Estudos epidemiológicos mostraram que infecções hospitalares por *K. pneumoniae* são precedidas por colonização do trato gastrointestinal (DE CHAMPS et al., 1989). O trato gastrointestinal é considerado um dos principais reservatórios de infecções em neonatos e imunocomprometidos, e infecções sistêmicas são resultado, primariamente, dessa colonização. Nesses pacientes, bactérias podem translocar do trato gastrointestinal para a corrente sanguínea, causando infecções sistêmicas graves. Além disso, BERG (1983) constatou que drogas imunodepressoras, como ciclofosfamida e prednisona, aumentam a translocação de bactérias endógenas, sendo *K. pneumoniae* uma das principais bactérias recuperadas de órgãos extraintestinais.

KELLER e ENGLEBY (1958) foram os primeiros autores que utilizaram o termo translocação para descrever a passagem de bacteriófagos de *Bacillus megaterium*, inoculados via oral, do lúmen intestinal para a corrente sanguínea. HILDIBRAND e WOLOCHOW (1966) também utilizaram o termo translocação para descrever a passagem de bacteriófago, porém para os linfonodos. Entretanto, WOLOCHOW et al. (1966) foram os primeiros autores que empregaram o termo translocação para descrever a passagem de bactérias viáveis provenientes do trato gastrointestinal para sítios extraintestinais ou tecidos. Posteriormente, BERG e CARLINGTON (1979); BERG (1980; 1983; 1992; 1995) e BERG et al. (1988) descreveram condições que favorecem ou não o processo de translocação para os diversos órgãos em animais convencionais e gnotobióticos. Esses estudos indicaram que o fenômeno é observado mais frequentemente, com bactérias Gram-negativas e anaeróbias facultativas do que com anaeróbias estritas e bactérias Gram-positivas.

Três mecanismos primários que promovem a translocação bacteriana têm sido propostos: i) crescimento bacteriano intestinal excessivo; ii) aumento da permeabilidade da mucosa intestinal; e iii) deficiências na imunidade do

hospedeiro. Estes mecanismos podem não ser mutuamente exclusivos e um ou mais podem ser relevantes em cada indivíduo (O'BOYLE et al., 1998).

A migração de organismos através da parede intestinal pode ocorrer por pinocitose, processo de ingestão de quantidades diminutas de líquido extracelular e de substâncias nele dissolvidos, sob a forma de pequenas vesículas em células epiteliais, que tem sido proposto como o mecanismo de translocação na presença de uma barreira mucosa intacta (BERG, 1995).

A translocação bacteriana envolve, portanto, interações complexas entre os mecanismos de defesa e a capacidade para transpor a barreira intestinal e sobreviver em outro ambiente, sendo necessários mais estudos para elucidar os mecanismos envolvidos na ocorrência de translocação no hospedeiro saudável ou debilitado (BERG, 1992).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBESA, I. *Klebsiella pneumoniae* haemolysin adsorption to red blood cells. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 67, p. 263-266. 1989.
- ALBESA, I., BARBERIS, L. I., PAJARO, C., FARNOCHI, M. C., ERASO, A. J. A thiol-active hemolysin in Gram-negative bacteria. **Can. J. Microbiol.**, v.31, p. 297-300. 1985.
- ALBESA I., ERASO, A. J., FRIGERIO, C. I., LUBETKIN, A. M. Hospital outbreak in a care unit for infants, due to *Klebsiella* tribe. **Revista Arg. Microbiol.**, v. 12, p. 39-43. 1980.
- ANATHAN, S., RAY, S., ALVANDI, S. Enterotoxigenicity of *Klebsiella pneumoniae* associated with childhood gastroenteritis in Madras, India. **Jpn. J. Infect. Dis.**, v. 52, p. 16-17. 1999.
- ARIAS, M. L., MONGE, R., ANTILLON, F., CHAVEZ, C. Microbiological contamination of enteral feeding solutions used in Costa Rica hospital. **Arch. Latino. Am. Nutr.**, v. 49, p. 363-366. 1999.
- ARIAS, M. L., MONGE, R., RODRÍGUES, J. Presencia de coliformes totales, *Escherichia coli* y *Listeria* sp. em fórmulas enterales. **Arch. Lat. Nut.**, v. 48, p. 68-70. 1998.
- ASENSIO, A., OLIVER, A., GONZALES-DIEGO, P., BAQUERO, F., PEREZ-DIAS, J. C., ROS, P., COBO, J., PALACIOS, M., LASHERA, D., CANTON, R. Outbreak of a multiresistant *Klebsiella pneumoniae* strain in an intensive care unit: Antibiotic use as risk factor for colonization and infection. **Clin. Infect. Dis.**, v. 30, p. 55-60. 2000.

- AYLING-SMITH, B., PITT, T.L. State of the art in typing: *Klebsiella* spp. **J. Hosp. Infect.**, v. 16, p. 287-295. 1990.
- BAGLEY, S. T., SEIDLER, R. J. Primary *Klebsiella* identification with MacConkey-inositol-carbenicilina agar. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 36, p.536-538. 1978.
- BAGLEY, S. T., SEIDLER, R. J., BRENNER, D. J. *Klebsiella planticola* sp. nov.: a new species of *Enterobacteriaceae* found primarily in nonclinical environments. **Curr. Microbiol.**, v. 6, p. 105-109. 1981.
- BAUERNFEIND, A., PETERMÜLLER, C., SCHNEIDER, R. Bacteriocins as tools in analysis of nosocomial *Klebsiella pneumoniae* infections. **J. Clin. Microbiol.**, v.14, p. 15-19. 1981.
- BERG, R. D. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. **Trends Microbiol.**, v.3, p. 149-54. 1995.
- BERG, R. D. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract of the mice receiving immunosuppressive chemotherapeutic agents. **Curr. Microbiol.**, v.8, p. 285-92. 1983.
- BERG, R. D., CARLINGTON, A. W. Translocation of certain indigenous bacteria from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymph nodes and other organs in a gnotobiotic mouse model. **Infection and Immunity**, v. 23, p. 403-411. 1979.
- BERG, R. D. Mechanisms confining indigenous bacteria to gastrointestinal tract. **Am. J. Clin. Nut.**, v.33, p. 2472-2484. 1980.
- BERG, R. D. Translocation and the indigenous gut flora. In: FULLER, R. (Ed.) **Probiotic: the scientific basis**. London: Chapman e Hall, 1992. p. 55-85.
- BERG, R. D., WOMMACK, E., DEITCH, E. A. Immunosuppression and intestinal bacterial overgrowth synergistically promote bacterial translocation. **Arch. Surg.**, v.123, p. 1359-1364. 1988.
- BERMUDE, H. ARPIN, C., JUDE, F., EL-HARRIF, Z., BÉBÉAR, C., QUENTIN, C. Molecular epidemiology of na outbreak due to extended-spectrum beta-lactamases-producing enterobacteria in a French hospital. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 16, p 523-529. 1997.
- BRENNER, D. J., STEIGERWALT, S. A., FANNING. Differentiation of *Enterobacter aerogenes* from *Klebsiella* by desoxyribonucleic acid reassociation. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 22, p. 193-200. 1972.

- BRASIL. Ministério da Saúde. Primeira pesquisa brasileira das infecções hospitalares. **Rev. Control. Infec. Hosp.** 1995. 47p.
- BRENNER, D. J., FARMER, J. J., HICKMAN, F. W., ASBURRY, M. A. Taxonomic and nomenclature changes in *Enterobacteriaceae*. HEW publication (CDC) 79-8356. **Centers for Disease Control, Atlanta, GA.** 1977.
- BRISSE, S., MILATOVIC, D., FLUIT, A.C., VERHOEF, J., SCHMITZ, F.J. Epidemiology of quinolone resistance of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* in Europe. **Eur. J. Clin. Microbiol.**, v. 19, p. 64-68. 2000.
- BUFFENMEYER, C. L., RYCHEK, R. R., YEE, R. B. Bacteriocin (klebocin) sensitivity typing of *Klebsiella*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 4, p. 239-244. 1976.
- BULLEN, J., GRIFFITHS, E., ROGERS, H., WARD, G. Sepsis: the critical role of iron. **Microb. Infect.**, v. 2, p. 409-415. 2000.
- CAMPRUBI, S., TOMAS, J., MUNOIA, F., MADRID, C., JUAREZ, A. Influence of lipopolysaccharide on external hemolytic activity of *Salmonella typhimurium* and *Klebsiella pneumoniae*. **Curr. Microbiol.**, v. 20, p. 1-3. 1990.
- CAO, V. T. B., ARLET, G., ERICSONNON, B. M., TAMMELIN, A., COURVALIN, P., LAMBERT, T. Emergence of imipinem resistance in *Klebsiella pneumoniae* owing to combination of plasmid-mediated CMY-4 and permeability alteration. **J. Antimic. Chemot.**, v. 46, p. 895-900. 2001.
- CAPLENAS, N. R., KANAREK, M. S., DUFOUR, A. P. Source and extent of *Klebsiella pneumoniae* in the paper industry. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.42, p. 779-785. 1981.
- CASEWELL, M. W., COOPER, J. E., WEBSTER, M. Enteral feeds contaminated with *Enterobacter cloacae* as a cause of septicemia. **Br. Med. J.**, v. 282, p.973. 1981.
- CASEWELL, M., PHILLIPS, I. Food as source of *Klebsiella* species for colonization and infection of intensive care patients. **J. Clin. Pathol.**, v. 31, p. 841-849. 1978.
- CHANG, S. C., FANG, C. T., HSUEH, P. R., CHEN, Y. C., LUH, K. T. *Klebsiella pneumoniae* isolates causing liver abscess in Taiwan. **Diagnostic Microbiol. Infect. Dis.**, v. 37, p. 279-284. 2000.

- CHETOUI, H., DELHALLE, E., MELIN, P., SABRI, A., THONART, P., DE MOL, P. Epidemiological typing of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates by pulsed-field gel electrophoreses and antibiotic susceptibility patterns. **Res. Microbiol.**, v. 150, p. 265-272. 1999.
- CLEGG, S., GERLACH, G. S. Enterobacterial fimbriae. **J. Bacteriol.**, v. 169, p.934-938. 1987.
- COOKE, E. M., SAZEGAR, T., EDMONSON, A. S., BRAYSON, J. C., HALL, D. *Klebsiella* species in hospital food and kitchens: a source of organisms in the bowel of patients. **J. Hyg.**, v. 84, p. 97-101. 1980.
- COSTA, G. P., SILVA, M. L. T., FERRINI, M. T. et al. Estudo comparativo da contaminação microbiana das dietas enterais em sistema aberto e fechado. **J. Bras. Nut. Parent Ent.**, p. 180-188. 1998.
- DARFEUILLE-MICHAUD, A., JALLAT, C., AUBEL, D., SIROT, D., RICH, C., SIROT, J., JOLY, B. R-plasmid-encoded adhesive factor in *Klebsiella pneumoniae* strain responsible for human nosocomial infections. **Infect. Immun.**, v. 60, p. 44-45. 1992.
- DAVIS, T. J., MATSEN, J. M. Prevalence and characteristics of *Klebsiella* species: relation to association with a hospital environment. **J. Infect. Dis.**, v.130, p. 402-405. 1974.
- DE CHAMPS, C., SAUVANT, M. P., CHANAL, C. et al. Prospective survey of colonization and infection caused by expanded-spectrum- β -lactamase-producing members of the family *Enterobacteriaceae* in intensive care unit. **J. Clin. Microbiol.**, v. 27, p. 2887-2890. 1989.
- DE CHAMPS, C., SIROT, D., CHANAL, C. POUPART, M. C. DUMAS, M. P., SIROT, J. Concomitant dissemination of three extended-spectrum β -lactamases among different *Enterobacteriaceae* isolate in a french hospital. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 27, p. 441-445. 1991.
- DI MARTINO, P., LIVRELLI, V., SIROT, D., JOLY, B., DARFEUILLE-MICHAUD. A new fimbrial antigen harbored by CAZ-5/SHV-4- producing *Klebsiella pneumoniae* strains involved in nosocomial infection. **Infect. Immun.**, v. 64, p. 2266-2273. 1996.
- DOYLE, L. William Stark (1740-1770); his life, manuscript and death. **J. Med. Biogr.**, v. 8, p. 146-148. 2000.

- EICKOFF, T. C., STEINHAUER, B. W., FINLAND, M. The *Klebsiella-Enterobacter-Serratia* division. Biochemical and serological characteristics and susceptibility to antibiotics. **Annales of Internal Medicine**, v.65, p.1163-1179. 1966.
- EISEN, D., RUSSELL, E., TYMMS, M., ROPER, E., GRAYSON, M., TURNIDGE, J. Random amplified of polymorphic DNA and plasmid analyses used in investigation of na outbreak of multiresistant *Klebsiella pneumoniae*. **J. Clin. Microbiol.**, v.33, p.713-717. 1995.
- EDWARDS, R. A., PUENTE, J. L. Fimbrial expression in enteric bacteria: a critical step in intestinal pathogenesis. **Trends in Microbiology**, v.6, p.282-287. 1998.
- FADER, R. C., GONDESEN, K., TOLLEY, B., RITCHIE, D. G., MOLLER, P. Evidence that in vitro adherence of *Klebsiella pneumoniae* to ciliated hamster tracheal cells is mediated by type 1 fimbriae. **Infect. Immun.**, v.56, p. 3011-3013. 1988.
- FAVRE-BONTES, S., DARFEUILLE-MICHAUD, A., FORESTIER, C. Aggregative adherence of *Klebsiella pneumoniae* to human Intestine-407 cells. **Infect. Immun.**, v. 63, p. 1318-1328. 1995.
- FAVRE-BONTES, S., JOLY, B., FORESTIER, C. Consequences of reduction of *Klebsiella pneumoniae* capsule expression on interactions of this bacterium with epithelial cells. **Infect. Immun.**, v. 67, p. 554-561. 1999.
- FELDMAN, C., SMITH, C. LEVY, H., GINSBURG, P. MILLER, S. D., KOORNHOF, H. J. *Klebsiella pneumoniae* bacteraemia at na urban general hospital. **J. Infect.**, v. 20, p. 21-31. 1990.
- FINLAY, B. B., FALKOW, S. Common themes in microbial pathogenicity, **Microbiol. Rev.**, v. 53, p. 210-230. 1989.
- FUENTES, F. A., HANZEN, T. C., LÓPEZ-TORRES, A. J., RECHANI, P. *Klebsiella pneumoniae* in orange juice concentrate. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 49, p. 1527-1529. 1985.
- GALES, A. C. **Prevalência, sensibilidade a antimicrobianos e tipagem molecular de amostras de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de beta lactamases de espectro ampliado.** São Paulo, SP: EPM, 1997. 132p. Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas e Parasitárias) - Escola Paulista de Medicina, 1997.
- GILL, K., GILL, P. Contaminated enteral feeds. **Br. Med. J.**, v.282, p.1971. 1981.

- GLATMAN, L. I., KALNIN, K. V., KLITSUNOVA, N. V., DOMORADSKAYA, T. I., BEREZINA, L. A., TERECHOV, A. A., GENEVA, G. Y., ANKIRSKAYA, A. S. Genetic and molecular R-plasmid analysis of Enterobacteriaceae hospital strains at children's hospital of the former USSR. **J. Chem.**, v. 6, p. 155-162. 1994.
- GRIFFITHS, E. The iron-uptake systems of pathogenic bacteria. In: BULLEN, J. J., GRIFFITHS (Eds.), **Ir. Infect.** New York, N.Y: John Wiley & Sons, Inc., 1987. p. 69-137.
- GUARINO, A., GUANDALINI, S., ALESSI, M. et al. Characteristics and mechanism of action of a heat-stable enterotoxin produced by *Klebsiella pneumoniae* from infants with secretory diarrhea. **Pediat. Res.**, v.25, p. 514-518. 1989.
- HANSEN, D. S., GOTTSCHAU, A., KOLMOS, H. J. Epidemiology of *Klebsiella* bacteraemia: a case control study using *Escherichia coli* bacteraemia as control. **J. Hosp. Infect.**, v. 38, p. 119-132. 1998.
- HAVERKORN, M. L., MICHEL, M, F. Nosocomial klebsiellas I. Colonization of hospitalized patients. **J. Hyg. Camb.**, v. 82, p. 177-193. 1979.
- HORNICK, D. B., ALLEN, B. L., HORN, M. A., CLEG, S. Adherence to respiratory epithelia by recombinant *Escherichia coli* expressing *Klebsiella pneumoniae* type 3 fimbrial gene products. **Infect. Immun.**, v.60, p. 1577-1788. 1992.
- HURTADO, A., RODRÍGUEZ-VALERA, F. Accessory DNA in the genomes of representatives of the *Escherichia coli* reference collection. **J. Bacteriol.**, v. 181, p. 2548-2554. 1999.
- IZARD, D., FERRAGUT, C., GAVINI, F., KERTERS, K., DE LEY, J., LECLERE, H. *Klebsiella terrigena*, a new species from soil and water. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 31, p. 116-127. 1981.
- JARLIER, V. Enterobactéries et bétalactamases. In: COURVALIN, P., GOLDSTEIN, F., PHILIPPON, A., SIROT, J. (Eds.) **L'antibiogramme**, Paris: MPC, Videocom., 1985.
- JONES, G. W., ISAACSON. Proteinaceous bacterial adhesins and their receptors. **Crit. Rev. Microbiol.**, v.10, p. 229-260. 1983.
- KAUFFMANN, F. **The bacteriology of Enterobacteriaceae**. Baltimore: Willilkins Co., 1966.

- KAUFFMANN, F. On the serology of the *Klebsiella* group. **Acta. Pathol. Microbiol. Sacand.**, v.26, p. 381-406. 1949.
- KLIPSTEIN, F. A., ENGERT, R. F., HOUGHTEN, R. A. Immunological properties of purified *Klebsiella pneumoniae* heat-stable enterotoxin. **Infection and Imunity**, v. 42, p. 838-841. 1983.
- KOTHE, H., SHAP, P., KREMERY, V., MITSUHASHI, S. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. **Infection**, v. 11, p. 315-317. 1983.
- KRONE, W. J. A., KONINGSTEIN, G., DE GRAAF, F. K., OUDEGA, B. Plasmid-determined cloacin DF13-susceptibility in *Enterobacter cloacae* and *Klebsiella edwardsii*: identification of the cloacin DF13/aerobactin outer membrane receptor proteins. *Antonie van Leeuwenhoek*, **J. Microbiol. Serol.**, v. 51, p. 203-218. 1985.
- LAMMEDING, A. M., GLASS, K. A., GENDRON-FITZPATRICK, A., DOYLE, M. P. Determination of the virulence of different strains of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* by oral inoculation of pregnant mice. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 58, p. 3991-4000. 1992.
- LEVY, J., LAETHEM, J. V., VERHAEGEN, G., PERPETE, C., H., BUTZLER, J., P., WENZEL R. P. Contaminated enteral nutrition solutions as a cause of nosocomial bloodstream infection: a study using plasmid fingerprinting. **JPEN**, v. 3, p. 228-234. 1989.
- LHOPITAL, S., BONACORSI, S., MEIS, D., BRAHIMI, N., MATHY, S., NAVARRO, J., AIGRAIN, Y., BINGEN, E. Molecular markers for differentiation of multiresistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in a pediatric hospital. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.**, v. 18, p. 743-748. 1997.
- LISBOA, S.C. **Bactérias gram negativas e *Staphylococcus aureus* em serviço de alimentação hospitalar**. Viçosa, MG: UFV, 1997. 39p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, 1997.
- MEYER, K. S., URBAN, C., EAGAN, J. A., BERGER, B. J., RAHAL, J. J. Nosocomial outbreak of *Klebsiella* infection resistant to late-generation cephalosporins. **Ann. Intern. Med.**, v. 119, p. 353-358. 1993.
- MONTEROS, L. E. E., CEJA, V., MONTAÑEZ, C., SANTOS, J. I. Comparative analysis of plasmids from nosocomial *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from two hospital. **Arch. Med. Res.**, v. 25, p. 321-324. 1994.

- MONTGOMERIE, J. Z. Epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* and hospital-associated infections. **Rev. Infect. Dis.**, v.1, p.736. 1979.
- MUNDT, J. O., COLLINS, J. L., MCCARTHY, I. E., BARLEY, R. Description and microbiology of home-canned tomatoes and tomato juice. **J. Food Protect.**, v. 41, p. 944-947. 1978.
- NAVAJAS, M. F., CHACON, D. J., SOLVAS, J., F., VARGAS, R. G. Bacterial contamination of enteral feeds as a possible risk of nosocomial infection. **J. Hosp. Infect.**, v. 21, p. 111-120. 1992.
- NASSIF, X., FOURNIER, J. M., ARONDEL, J., SANSONETTI, P. J. Mucoid phenotype of *Klebsiella pneumoniae* is a plasmid-encoded virulence factor. **Infect. Immun.**, v. 57, p. 546-552. 1989.
- NASSIF, X., SANSONETTI, P. J. Correlation of the virulence of *Klebsiella pneumoniae* K1 and K2 with the presence of a plasmid encoding aerobactin. **Infect. Immun.**, v. 54, p. 603-608. 1986.
- NIYOGI, S. K., PAL, A., MITRA, U. E DUTT'A, P. Enteroaggregative *Klebsiella pneumoniae* in association with childhood diarrhoea. **Ind. J. Med. Res.**, v. 112, p. 133-134. 2000.
- O'BOYLE, C. J., MACFIE, J., MITCHELL, C.J., JONSTONE, D., SAGAR, P., SEDMAN, P. C. Microbiology of bacterial translocation in humans. **Gut**, v.42, p. 29-35. 1998.
- OKUMA, T., NAKAMURA, M., TOTAKE, H., FUKUNAGA, Y. Microbial contamination of enteral feeding formulas and diarrhea, **Appl. Nut. Invest.**, v.16, p. 719-722. 2000.
- ØRSKOV, I. The genus *Klebsiella* (medical aspects). In: STARR, M. P., STOP, H., TRUPER, H. G., BALOWS, A., SCHLEGEL, H. G. (Eds.) **The prokaryotes: a handbook on habitats, isolation, and identification of bacteria**. Berlin: Springer-Verlag, 1981. p. 1160-1165.
- ØRSKOV, I., ØRSKOV, F. Serotyping of *Klebsiella*, In: BERGAN, T. (Ed.). **Methods in microbiology**, vol. 14. London: Academic Press, 1984. p.143-164.
- PODSCHUN, R., FISCHER, A., ULLMANN, U. Characterization of *Klebsiella terrigena* strains from humans: haemagglutinins, serum resistance, siderophore synthesis, and serotypes. **Epidemiol. Infec.**, v. 125, p. 71-78. 2000.

- PODSCHUN, R., HEINEKEN, P., ULLMANN, U., SONNTAG, H. G. Comparative investigations of *Klebsiella* species of clinical origin: plasmid patterns, biochemical reactions, antibiotic resistances and serotypes. **Zentbl. Bakteriolog. Mikrobiolog. Hyg. Ser.**, v. 262, p. 335-345. 1986.
- PODSCHUN, R., ULLMANN, U. *Klebsiella* capsular type K7 in relation to toxicity, susceptibility to phagocytosis and resistance to serum. **J. Med. Microbiol.**, v. 36, p. 250-254. 1992.
- PODSCHUN, R., ULLMANN, U. *Klebsiella* spp. As nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 11, p. 589-603. 1998.
- POLLACK, M. Significance of circulating capsular antigen in *Klebsiella* infections. **Infect. Immun.**, v. 13, p. 1543-1548. 1976.
- PRODINGER, W. M., FILLE, M., BAUERNFEIND, A., et al. Molecular epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* producing SHV-5 β -lactamase: parallel outbreaks due to multiple plasmid transfer. **J. Clin. Microbiol.**, v. 34, p. 564-568. 1996.
- REISSBRODT, R., RABSCH, W. Further differentiation of *Enterobacteriaceae* by means of siderophore-pattern analysis. **Zentbl. Bakteriolog. Mikrobiolog. Hyg. Ser. A**, v. 268, p. 306-317. 1988.
- RENNIE, R. P., ANDERSON, C. M., WENSLEY, B. G. et al. *Klebsiella pneumoniae* gastroenteritis masked by *Clostridium perfringens*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 28, p. 216-219. 1990.
- RENNIE, R. P., DUNCAN, I. B. R. Combined biochemical and serological typing of clinical isolates of *Klebsiella*. **Appl. Microbiol.**, v. 28, p. 534-539. 1974.
- RITTER, E., BAUERNFEIND, A., BECKER-BOOST, E., FIENH, A., STÖCKER, H., WIRSING VON KÖNING, C. H., FINGER, H. Ausbruch einer nosokomialen Infektion durch SHV2- β -Laktamase-bildende *Klebsiella pneumoniae* Stämme in einer operativen Intensivstation. **Immun. Infect.**, v. 20, p. 3-6. 1992.
- SABOTA, J. M., HOPPES, W. L., ZIEGLER, J. R. et al. A new variant of food poisoning: enteroinvasive *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* sepsis from a contaminated hamburger. **Am. J. Gastr.**, v. 93, p. 118-119. 1998.
- SAKAZAKI, R., TAMURA, K., KOSAKO, Y., YOSHIZAKI, R. *Klebsiella ornothinolytica* sp. nov., formerly known as ornithine-positive *Klebsiella oxytoca*. **Curr. Microbiol.**, v. 18, p. 201-206. 1989.

- SARUTA, K., MATSUNAGA, T., KONO, M., HOSHINA, S., IKAWA, S., SAKAI, O., MACHIDA, K. Rapid identification and typing of *Staphylococcus aureus* by nested PCR amplified ribosomal DNA spacer region. **FEMS Microbiol. Letters**, v. 146, p. 271-278. 1997.
- SCHOOTER R. A., FAIERS, M. C., COOKE, E. M., BREADEN, A. L., O'FARRELL, S. M. Isolation of *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Klebsiella* from food in hospital, canteens and schools. **Lancet**, v. 2, p.390-392. 1971.
- SHANNON, K., FUNG, K., STAPLETON, P., ANTHONY, R., POWER, E., FRENCH, G. A hospital outbreak of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* investigated by RAPD typing and analysis of the genetics and mechanisms of resistance. **J. Hosp. Infect.**, v.39, p.291-300. 1998.
- SHANNON, K., STAPLETON, P., XIANG, X. et al. Extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains causing nosocomial outbreaks of infection in the United Kingdom. **J. Clin. Microbiol.**, v.36, p. 3105-3110. 1990.
- SIMOONS-SMIT, A. M., VERWEIJI-VAN VUGHT, A. M. J. J., KANIS, L. Y. R., MACLAREN, D. M. Virulence of *Klebsiella* strains in experimentally induced skin lesions in the mouse. **J. Med. Microbiol.**, v. 17, p. 67-77. 1984.
- SINGH, B.R., SHARMA, V. D., CHANDRA, R. Detection, prevalence, purification and characterization of lecithinase de *Klebsiella pneumoniae*. **Indian. J. Exp. Biol.**, v. 7, p. 925-932. 1999.
- SU, L. H., LEU, H. S., CHIU, Y. P., CHIA, J. H., KUO, A. J., SUN, C. F., LIN, T. Y., WU, T. L. Molecular investigation of two clusters of hospital-acquired bacteraemia caused by multi-resistant *Klebsiella pneumoniae* using pulsed-field gel electrophoresis and infrequent restriction site PCR. **J. Hosp. Infect.**, v. 46, p. 110-117. 2000.
- TARKKANEM, A. M., VIRKOLA, R., CLEGG, S., KORHONEN. Binding of the type 3 fimbriae of *Klebsiella pneumoniae* to human endothelial and urinary bladder cells. **Infec. Immun.**, v. 65, p. 1546-1549. 1997.
- THURN, J., CROSSLEY, K., GERDTS, A., MAKI, M., JHNSON, J. Enteral hyperalimentation as a source of nosocomial infection. **J. Ent. Infec.**, v. 15, p.203-217. 1990.

- TRAUB, W.H. SCHWARZE, I., BAUER, D. Nosocomial outbreak of cross-infection due to multiple-antibiotic-resistant *Klebsiella pneumoniae*: characterization of the strain and antibiotic susceptibility studies. **Chemotherapy**, v. 46, p. 1-14. 2000.
- VERNET, V., MADOULET, C., CHIPPAUX, C., PHILIPPON, A. Incidence of two virulence factors (aerobactin and mucoid phenotype) among 190 clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum β - lactamase. **FEMS Microbiol. Letter**, v. 96, p. 1-6. 1992.
- VERNET, V., PHILIPPON, C., MADOULET, C. et al. Virulence factors (aerobactin and mucoid phenotype) in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* blood culture isolates. **FEMS Microbiol. Letters**, v. 130, p. 51-57. 1995.
- WADSTROM, T. A., AUST-KETTIS, A., HABTE, D. et al. Enterotoxine producing bacteria and parasites in stools of Ethiopian children. **Arch. Dis. Child.**, v. 51, p. 865-870. 1976.
- WATANABE, H., HASHIMOTO, H., TANAKA, T., MITSUHASHI, S. Different patterns of drug resistance and R plasmids between indole-positive and -negative strains of *Klebsiella pneumoniae*. **Microbiol. Immunol.**, v.24, p. 169-171. 1980.
- WILLIAMS, P., CHART, H., GRIFFITHS, E., STEVENSON, P. Expression of high affinity iron uptake by clinical isolates of *Klebsiella*. **FEMS Microbiol. Letters**, v. 44, p. 407-412. 1987.
- WILLIAMS, P., TOMAS, J. M. The pathogenicity of *Klebsiella pneumoniae*. **Rev. Med. Microbiol.**, v. 1, p. 196-204. 1990.
- WOLOCHOW, G., HILDEBRANT, G. J., LAMANNA, C. Translocation of microorganisms across the intestinal wall of the rat: effects of microbial size and concentration. **J. Infect. Dis.**, v. 116, p. 523-528. 1966.
- WÜRKER, M., BEUTH, J., KO, H. L., PRZONDO-MODARSKA, A. Types of fimbriation determines adherence of *Klebsiella* bacteria to human epithelial cells. **Zentbl. Bakteriol.**, v.274, p. 239-245. 1990.
- YIGIT H., QUEENAM, A. M., ANDERSON, G. J., DOMENECH-SANCHEZ A., BIDDLE, J. W., STEWARD, C. D., ALBERTI, S., BUSH, K. TENOVER, F. C. Novel carbapenem-hydrolyzing β -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimic. Ag. Chemot.**, v. 45, p. 1151-1161. 2001.

YOUSSEF, M. T., MALKAWI, H. I., SHURMAN, A. A., ANDREMONT, A. O. Molecular typing of multiresistant *Klebsiella pneumoniae* isolated from children from northern Jordan. **J. Trop. Pediatr.**, v. 45, p. 271-277. 1999.

CAPÍTULO 1

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Klebsiella* sp. ISOLADA DE DIETAS ENTERAIS

1. INTRODUÇÃO

Infecções nosocomiais são reconhecidas como problemas críticos e relevantes em saúde pública, contribuindo para um aumento significativo da taxa de letalidade e dos custos com internação e medicação. As estratégias para reduzir e controlar as infecções nosocomiais devem concentrar-se na avaliação criteriosa das fontes de contaminação dos pacientes dentro do ambiente hospitalar, recorrendo à caracterização genética para diferenciação das estirpes isoladas (EISEN et al., 1995).

Aproximadamente, 50% das infecções que acometem pacientes hospitalizados, são causadas por bactérias que colonizam o trato intestinal (SHOOTER et al., 1971). Apesar disso, pouca importância é dada aos alimentos como fonte de patógenos causadores de infecções nosocomiais (ARIAS et al., 1998). Dietas enterais, alimentos especiais destinados a pacientes em tratamentos

intensivos, podem veicular microrganismos patogênicos, possíveis de comprometer a evolução clínica do paciente. As condições a que são submetidas as dietas enterais durante a etapa de preparo, estocagem, transporte e administração podem permitir o crescimento dos contaminantes que encontram um substrato rico em nutrientes. Além disso, os contaminantes, dependendo da via de administração dessas dietas, superam as barreiras ácidas do estômago.

Klebsiella spp. é uma das bactérias contaminantes mais encontradas em dietas enterais (SCHOOTER et al., 1971; CASEWELL e PHILLIPS 1978; MONTGOMERIE, 1979; COOKE et al., 1980; THURN et al., 1990; COSTA et al., 1998). Entretanto, essa bactéria não está relacionada como patógeno de origem alimentar, embora tenham sido registrados casos de gastroenterites causadas por alimentos contaminados por *Klebsiella* (RENNIE et al., 1990; NIYOGI et al., 2000) e um caso de infecção generalizada, causada por *K. pneumoniae*, contaminante de hambúrguer (SABOTA et al., 1998). Adicionalmente, *Klebsiella* é um paradigma de patógeno oportunista entre os bacilos Gram-negativos associados com infecções nosocomiais, e é a segunda causa mais comum de septicemia, com taxa de letalidade de até 50% (HANSEN et al., 1998). Desde a última década, surtos de infecção por *K. pneumoniae* em pacientes hospitalizados são registrados com uma frequência crescente (LHOPITAL et al., 1997). No Brasil, de acordo com o primeiro levantamento sobre as infecções hospitalares realizado em 1994, pelo Ministério da Saúde, *Klebsiella* sp. representou 18,1% dos isolamentos de infecções nosocomiais, sendo superada apenas por *Pseudomonas aeruginosa*, isolada em 19,6% dos casos avaliados (BRASIL, 1995).

Estudos epidemiológicos de *Klebsiella*, até recentemente, eram baseados, essencialmente, em características fenotípicas como padrão bioquímico, resistência a antibióticos, sorotipagem, padrão de susceptibilidade a bacteriocinas e aos preparados fágicos. Porém, essas técnicas mostram-se limitadas na capacidade de discriminar estirpes (MONTEROS et al., 1994; WONG et al., 1994; EISEN et al., 1995; LHOPITAL et al., 1997). Com a introdução de técnicas moleculares, a caracterização genotípica apresenta possibilidades de

contornar essa dificuldade. A determinação do padrão plasmidial (GLATMAN et al., 1994; MONTEROS et al., 1994), a análise de polimorfismo de rDNA (STULL et al., 1988; BINGEN et al., 1994; MONTEROS et al., 1994; WIDJOJOATMODJO et al., 1995; BERMUDES et al., 1997; LHOPITAL et al., 1997; SARUTA et al., 1997; BRISSE et al., 2000) e a tipagem genômica por eletroforese em campo pulsado (COOKSON et al., 1995; PRODINGER et al., 1996; GALES, 1997; WELLER et al., 1997; DECREÉ et al., 1998; CHETOUI et al., 1999; CHANG et al., 2000; SU et al., 2000; TRAUB et al., 2000) e por análise de polimorfismo de DNA amplificado ao acaso-RAPD (WONG et al., 1994; EISEN et al., 1995; HURLEY et al., 1996; BERMUDES et al., 1997; LHOPITAL et al., 1997; SHANNON et al., 1998; HURTADO e RODRÍGUEZ-VALERA, 1999; YOUSSEF et al., 1999), são as técnicas mais comumente utilizadas na análise molecular para diferenciação de estirpes de *Klebsiella*.

Considerando que, estudos genéticos envolvendo epidemiologia molecular de *Klebsiella* spp. isoladas de alimentos são escassos, os objetivos deste trabalho se concentraram nos seguintes aspectos: isolar e identificar espécies de *Klebsiella* spp. de dietas enterais; comparar os isolados pelo padrão de polimorfismo gerado pelas análises por RAPD e por PCR-RFLP de rDNA.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Isolamento, identificação e sorotipagem de *Klebsiella* de dietas enterais

Seis amostras de dietas enterais não industrializadas (à base de peito de frango) e industrializada modular (leite pasteurizado e suplemento alimentar Sustacal®), foram coletadas em duas unidades hospitalares de duas cidade da Zona da Mata do estado de Minas Gerais, em diferentes ocasiões. Destas amostras, foi realizado o isolamento de *Klebsiella* em meio seletivo MacConkey-Inositol-Carbenicilina, como descrito por BAGLEY e SEIDLER (1978). Três a cinco colônias características de *Klebsiella* de cada amostra, foram estriadas em ágar Trypticaseina e Soja-TSA (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England) e mantidas em meio Infusão Cérebro e Coração-BHI (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England), semi-sólido a 4⁰C.

Os isolados foram identificados por provas morfo-tintoriais e bioquímicas, pelo sistema API 20E (API, LA Balme Les Grottes, França). A identificação foi confirmada pelo sistema Crystal (BBL-Becton & Dickinson), no Laboratório de Enterobactérias do Departamento de Bacteriologia da Fundação Oswaldo Cruz - Fiocruz, onde também foram realizadas as sorotipagens por tipo capsular, com os antissoros K1 a K6 (DENKA, SEIKEN, CO., LTD, Japan), utilizando o princípio da reação antígeno-anticorpo.

2.2. Análise de polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD)

O DNA total de *Klebsiella* foi extraído como descrito BINGEN et al. (1991). Reações de amplificação foram conduzidas de acordo com WILLIAMS et al. (1990), num volume total de 25 µL de Tris-HCl (pH 8,0) 10 mM em tampão contendo KCl 50 mM; MgCl₂ · 6H₂O 2,0 mM; cada deoxinucleosídeo trifosfatado 0,1 mM; oligonucleotídeos iniciadores 0,4 µM (grupo "D" ou "F" da Operon Technologies Inc., Alameda, CA); 25 ng de DNA; e 1,0 U de *taq* DNA polimerase (PROMEGA®).

As reações de amplificação foram conduzidas em um termociclador PTC 100 (MJ Research, Inc., Watertown, Massachusetts) programado para 94⁰C por 5 min e 30 ciclos (94⁰C, 1 min; 40⁰C, 1 min; 72⁰C, 1min e 30 s). Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação foram: OPD 03, OPD 07, OPD 08, OPD 12, OPD 18, OPD 20, OPF 10 e OPF 13 (Operon Technologies Inc., Alameda, CA, EUA). Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5% e evidenciados com brometo de etídeo (0,5 µg/mL). Os géis foram fotografados sob luz ultravioleta com câmara Polaroid MP4 e digitalizados em um sistema processador de imagens (Eagle Eye II- Stratagene).

2.3. Análise por PCR-RFLP do rDNA

Os pares de oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificar a região 16S e a região espaçadora 16S-23S do rDNA de *Klebsiella* foram sintetizados pela GIBCO-BRL (5' GCCTAACACATGCAAGTCGA 3' - 5' AAAGTGGTAAGCGCCCTCCC 3' e 5' GGT GAAGTCGTAACAAG 3' - 5' TGCCAAGGCATCCACC 3', respectivamente). As preparações de DNA total dos 21 isolados foram utilizadas para amplificação da região 16S e região espaçadora 16S-23S do rDNA.

As reações de amplificação foram conduzidas em um termociclador PTC 100 (MJ Research, Inc., Watertown, Massachusetts), programado para 40 ciclos

(94⁰C, 1 min; 56⁰C, 1 min; 72⁰C, 1 min e 30 s). Após os 40 ciclos, foi realizada uma etapa de extensão final a 72⁰C por 7 min. Os produtos da amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, imerso em tampão (Tris-borato 90 mM, EDTA 2mM, pH 8,0) ou foram precipitados com etanol, para análise de restrição. Os fragmentos de DNA gerados pela restrição foram detectados por eletroforese em gel de agarose 2%. Os produtos de amplificação da região espaçadora 16-23S do rDNA foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5% e em gel de agarose de alta resolução 1,5% imerso em tampão TEB e evidenciados com brometo de etídeo (0,5µg/mL). Os géis foram fotografados sob luz ultravioleta com câmara Polaroid MP4 e digitalizados em um sistema processador de imagens (Eagle Eye II- Stratagene).

2.4. Análise dos dados

Os produtos da amplificação foram tabulados utilizando os códigos 1 ou 0, respectivamente, para presença e ausência de um determinado fragmento de DNA e utilizados para o cálculo das distâncias genéticas entre os isolados (NEI e LI, 1979). As distâncias genéticas calculadas foram utilizadas para agrupar os isolados pelo método UPGMA, com auxílio do programa "Statistic" (Windows 4.2 A Stat Soft Inc., 1993). As análises de correlação de Pearson foram feitas utilizando o mesmo programa estatístico.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Trinta isolados, cujas colônias apresentaram características morfológicas presuntivas, foram obtidos. Vinte e um foram identificados como *Klebsiella*, sendo seis *K. oxytoca* e 15 *K. pneumoniae*. A sorotipagem de *K. pneumoniae* permitiu identificar um isolado do sorotipo K4, cinco do sorotipo K5, e nove não pertencentes aos sorotipos de K1 a K6 (Quadro 1).

Dos 15 isolados de *K. pneumoniae*, seis (40%) pertencem aos sorotipos menores que K6 (Quadro 1) e são associados com infecções hospitalares. Os tipos capsulares considerados endêmicos em hospitais são os compreendidos entre K1 e K6, com maior incidência do sorotipo K2 (ØRSKOV e ØRSKOV, 1984). O sorotipo K1 está, principalmente, envolvido como agente causador de pneumonia aguda. Além disso, outros sorotipos como K14, K24 e K25 também foram implicados em infecções nosocomiais (MOROZOVA e PRIAMUKHIA, 1997). Os demais isolados de *K. pneumoniae* não aglutinaram com os antissoros disponíveis, indicando pertencerem a sorotipos maiores do que K6. O grande número de sorotipos capsulares encontrados no gênero *Klebsiella* dificulta o reconhecimento dos mesmos. Segundo ØRSKOV e ØRSKOV (1984), são reconhecidos 82 tipos capsulares sorologicamente distintos em *Klebsiella*. Entretanto, outros autores sugerem o reconhecimento internacional de

Quadro 1 - Número e procedência do isolado, identificação e sorotipagem de *Klebsiella* isolada de dietas enterais

Amostra N ^o	Isolados	Tipo de Dieta Enteral	Espécie	Sorotipos	Hospital
1	P1	NI ^a	<i>K. oxytoca</i>	- ^c	A
1	P2	NI	<i>K. oxytoca</i>	-	A
1	P3	NI	<i>K. oxytoca</i>	-	A
1	P4	NI	<i>K. oxytoca</i>	-	A
1	P5	NI	<i>K. oxytoca</i>	-	A
3	P6	NI	<i>K. pneumoniae</i>	ND ^d	A
3	P7	NI	<i>K. pneumoniae</i>	ND	A
3	P8	NI	<i>K. pneumoniae</i>	K5	A
3	P9	NI	<i>K. oxytoca</i>	-	A
4	P11	NI	<i>K. pneumoniae</i>	ND	A
4	P13	NI	<i>K. pneumoniae</i>	K5	A
4	P14	NI	<i>K. pneumoniae</i>	ND	A
4	P15	NI	<i>K. pneumoniae</i>	ND	A
4	P17	NI	<i>K. pneumoniae</i>	ND	A
5	U1	IM ^b	<i>K. pneumoniae</i>	K5	B
5	U2	IM	<i>K. pneumoniae</i>	ND	B
5	U3	IM	<i>K. pneumoniae</i>	K5	B
5	U4	IM	<i>K. pneumoniae</i>	ND	B
6	U5	IM	<i>K. pneumoniae</i>	K4	B
6	U7	IM	<i>K. pneumoniae</i>	ND	B
6	U8	IM	<i>K. pneumoniae</i>	K5	B

^a dietas enterais não industrializadas, à base de peito de frango.

^b dietas enterais industrializadas modular, à base de leite e suplemento alimentar (Sustacal®).

^c não sorotipadas.

^d sorotipagem não determinada, sorotipos acima de K6.

77 diferentes sorotipos para esse gênero (PODSCHUN e ULLMANN, 1998). O antígeno K em *Klebsiella* é um determinante importante de virulência, pois desempenha um papel na resistência a fagocitose por macrófagos (SIMOONS-SMIT et al., 1986).

Um polimorfismo acentuado foi verificado entre os isolados de *K. pneumoniae* por RAPD com a detecção de 31 fragmentos de DNA polimórficos e apenas dois fragmentos de DNA monomórficos (Figura 1). Com base na presença e ausência dos fragmentos de DNA evidenciados, obteve-se uma matriz distância genética onde se verificaram variações de 0 a 74% (Quadro 2). O agrupamento dos isolados de *K. pneumoniae*, a partir dessa matriz, revelou três grupos distintos (Figura 2). Os isolados da unidade hospitalar A formaram dois grupos e os isolados da unidade hospitalar B formaram um único grupo, sendo que um dos grupos do hospital A está mais próximo, geneticamente, dos isolados do hospital B.

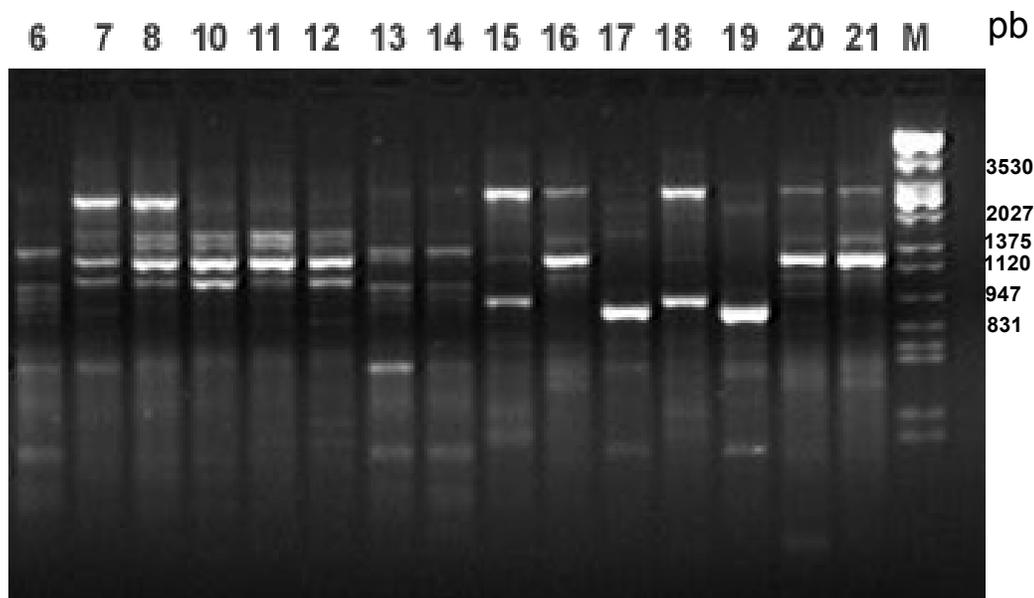


Figura 1 - Eletroforese em gel de agarose do DNA total amplificado por RAPD, utilizando o oligonucleotídeo OPD03. Números de 6 a 21 correspondem aos isolados de *K. pneumoniae*. Os isolados estão descritos no Quadro 1. Marcador de tamanho de fragmento de DNA (pb) está indicado pela letra M (DNA do fago λ , digerido com as enzimas *HindIII*, *BanHI* e *EcoRI*).

Quadro 2 - Matriz de distância genética (%) entre 15 isolados de *K. pneumoniae*. Matriz calculada a partir de 33 fragmentos de DNA gerados por sete oligonucleotídeos iniciadores. A identificação dos isolados está listada no Quadro 1.

7	52													
8	52	0												
10	39	23	23											
11	39	23	23	14										
12	39	23	23	21	71									
13	27	57	57	42	50	50								
14	43	62	62	65	74	65	37							
15	57	36	36	60	68	60	62	60						
16	57	36	36	52	60	52	62	60	18					
17	40	52	52	36	46	46	44	65	47	47				
18	48	50	50	44	60	60	52	60	27	36	47			
19	6	52	52	55	64	55	67	53	47	47	25	47		
20	50	52	52	46	54	54	55	71	39	22	40	39	60	

21	57	50	50	52	60	52	62	60	36	18	47	46	47	13
	6	7	8	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20

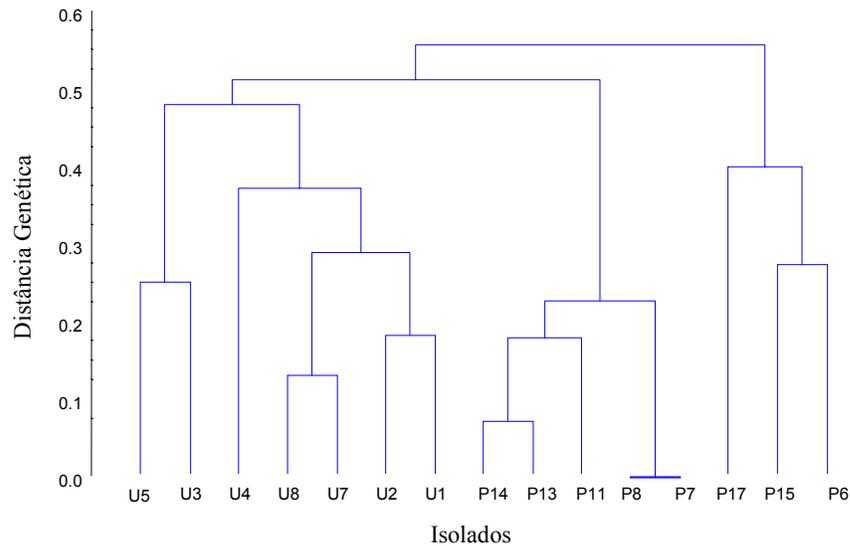


Figura 2 - Dendrograma gerado pelo agrupamento dos genótipos de *K. pneumoniae* isolados de dietas enterais, baseado nos coeficientes de similaridade genética determinada pelos padrões de DNA amplificado por RAPD, com sete oligonucleotídeos iniciadores (OPD03, OPD07, OPD08, OPD12, OPD20, OPF10 e OPF13).

O padrão de fragmentos RAPD dos isolados de *K. oxytoca* revelou 16 fragmentos monomórficos e nove polimórficos, sendo observada uma variação da distância genética de 2,4 a 20% (Quadro 3) mostrando que os isolados de *K. oxytoca* são geneticamente relacionados. Foi observado um polimorfismo menor em relação aos isolados de *K. pneumoniae* (Figura 3). O agrupamento desses isolados diferenciou três grupos de *K. oxytoca* em uma única unidade hospitalar (Figura 4).

Quadro 3 - Matriz de distância genética (%) entre seis isolados de *K. oxytoca*. Matriz calculada a partir de 25 fragmentos de DNA gerados por oito oligonucleotídeos iniciadores. A identificação dos isolados está listada no Quadro 1.

2	2					
3	14	10				
4	10	10	5			
5	20	20	10	10		
9	10	5	5	5	15	
	1	2	3	4	5	

A caracterização de isolados clínicos de *K. pneumoniae* por RAPD foi conduzida em outros estudos e evidenciou a diversidade genética dessa espécie. EISEN et al. (1995) realizaram a investigação de um surto infeccioso em um hospital da Austrália e constataram quatro padrões de RAPD distintos entre 48 estirpes de *K. pneumoniae* de infecções nosocomiais, com resistência múltipla a antibióticos, utilizando dois oligonucleotídeos iniciadores. Em outro estudo utilizando RAPD para diferenciação de estirpes nosocomiais de *K. pneumoniae*, realizado em um hospital pediátrico na França, os autores observaram seis padrões distintos entre os 22 isolados clínicos estudados, utilizando dois

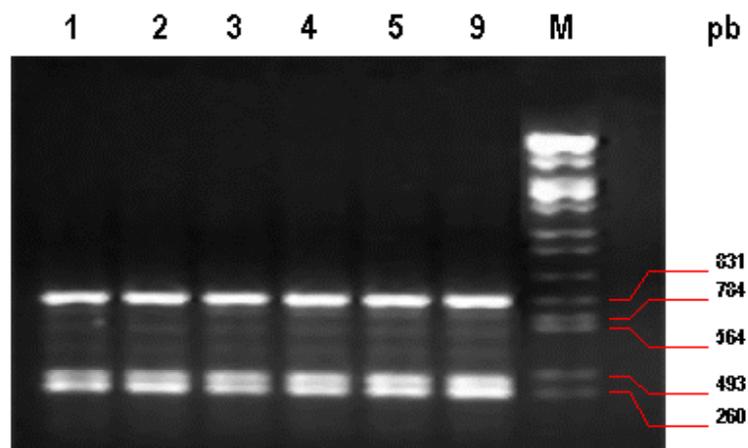


Figura 3 - Eletroforese em gel de agarose do DNA total amplificado por RAPD, utilizando o oligonucleotídeo OPD03. Números de 1 a 9 correspondem aos isolados de *K.oxytoca*. Os isolados estão descritos no Quadro 1. Marcador de tamanho de fragmento de DNA (pb) está indicado pela letra M (DNA do fago λ , digerido com as enzimas *Hind*III, *Ban*HI e *Eco*RI).

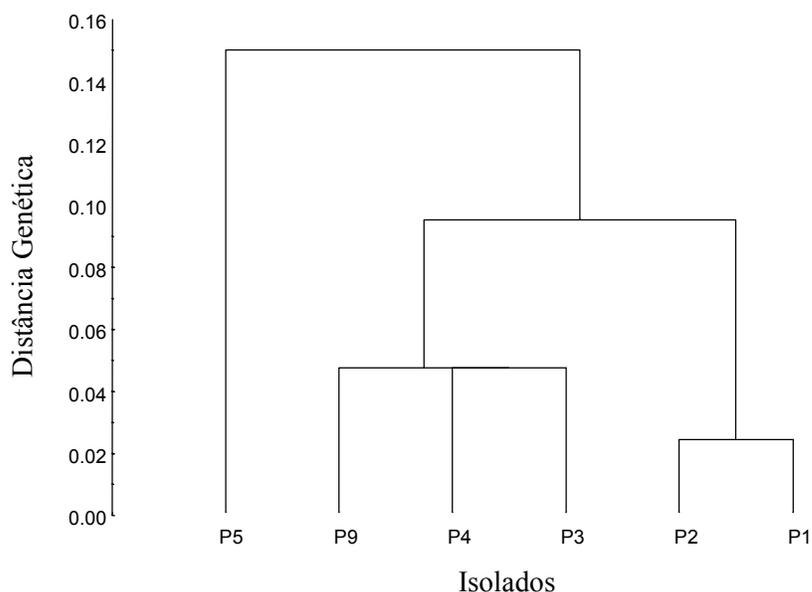


Figura 4 - Dendrograma gerado pelo agrupamento dos genótipos de *K. oxytoca* isolados de dietas enterais, baseado nos coeficientes de similaridade genética determinada pelos padrões de DNA amplificado por RAPD, com oito oligonucleotídeos iniciadores (OPD03, OPD07, OPD08, OPD12, OPD18, OPD20, OPF10 e OPF13).

oligonucleotídeos iniciadores (LHOPITAL et al., 1997). Entretanto, nesses trabalhos, não foi calculada a distância genética.

Nas análises de amplificação do DNA por RAPD observou-se que, para estirpes do mesmo sorotipo, detectou-se padrões diferentes de bandas, como verificado para os isolados de número 8, 11, 15, 17 e 21 (Figura 1). No entanto, o mesmo padrão pôde ser observado entre, por exemplo, os isolados 7 e 8 de sorotipos diferentes (Figura 1). As observações de que as análises dos padrões de bandas gerou subdivisões dentro de um mesmo sorotipo, de que para algumas estirpes de diferentes sorotipos obteve-se perfis idênticos e de que o agrupamento

evidenciou a separação dos isolados de mesmo sorotipo, também foi constatada em estudo com outra espécie bacteriana (SILVA et al., 2001). Esses resultados sugerem que as regiões de DNA amplificadas não foram sorotipo específicas e concordam com o observado por LHOPITAL et al. (1997), de que a sorotipagem é um método de caracterização que oferece suporte significativo à classificação de microrganismos, porém é menos sensível que a técnica RAPD.

Tendo como base a matriz de distâncias genéticas gerada para os isolados *K. pneumoniae*, foi possível observar que existem diferenças entre estirpes isoladas de uma mesma amostra, ou de uma mesma localidade. Por exemplo, estirpes isoladas de amostra de dietas enterais do hospital A, como as de número 11 e 14, apresentaram uma distância genética de 74%. Ao contrário, a de número seis, que embora tenha sido isolada de dietas do hospital A, apresentou uma distância de 6% da estirpe de número 19 proveniente de dietas do hospital B. Uma possível explicação para esta grande diversidade genética é que, além da amplificação do DNA cromossômico, o DNA plasmidial também tenha sido amplificado (GLATMAN et al., 1994; MONTEROS et al., 1994). Tal variação pode ainda estar relacionada com a perda desses plasmídeos, em função das várias condições de estresse a que essas estirpes podem ter sido submetidas. Outros autores têm levantado as mesmas hipóteses para explicar a diversidade genética em *Listeria monocytogenes* (SILVA et al., 2001), *Escherichia coli* (HURTADO e RODRÍGUEZ-VALERA, 1999) e *Lactobacillus plantarum* (JOHANSSON et al., 1995).

A alta diversidade genética entre os isolados de *K. pneumoniae* de dietas enterais pode ser também atribuída as diferentes fontes de contaminação dentro do serviço de alimentação hospitalar. Incidência elevada de *K. pneumoniae* foi registrada em equipamentos, utensílios, manipuladores e superfícies de trabalho no setor de nutrição e dietética de hospitais (CASEWELL, 1977; CASEWELL e PHILLIPS 1978, LISBOA, 1997).

A amplificação da região espaçadora 16S-23S do rDNA revelou fragmentos de DNA monomórficos entre os isolados de *K. oxytoca* e polimorfismo entre os isolados de *K. pneumoniae*. Além disso observou-se que,

os padrões de fragmentos de DNA gerados diferenciaram essas duas espécies (Figura 5).

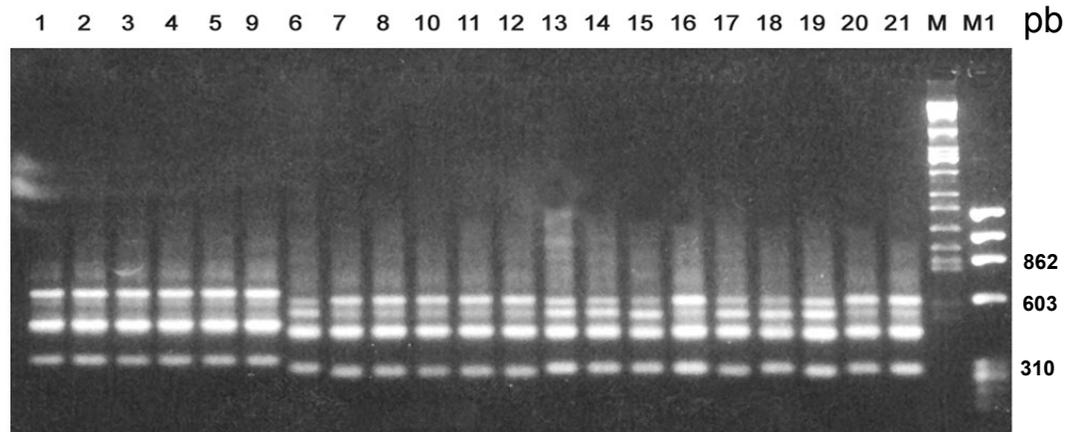


Figura 5 - Eletroforese em gel de agarose da região espaçadora 16S-23S do rDNA dos isolados de *Klebsiella* spp. Números de 1 a 21 correspondem a identificação dos isolados listada no Quadro 1. Marcador de tamanhos de fragmentos de DNA (pb) está indicado pela letra M (DNA do fago ϕ x174 digerido com *Hae*III).

Na análise genética baseada na região espaçadora 16S-23S do rDNA, observou-se que a amplificação indicou a presença de três fragmentos

monomórficos e cinco fragmentos polimórficos entre os isolados de *K. pneumoniae* (Figura 6). Com base nesses produtos de amplificação, construiu-se uma matriz de distância genética (Quadro 5), que apresentou valores entre 0 e 45%. A maior distância genética foi observada tanto entre isolados de hospitais diferentes bem como, entre alguns isolados do hospital B. Distância genética zero foi observada somente entre isolados de um mesmo hospital. A análise de agrupamento, baseada nas distâncias genéticas, separou os isolados em dois grupos: grupo I contendo isolados de amostras de dietas enterais coletadas no hospital B e grupo II contendo isolados provenientes de amostras dos dois hospitais. Pôde-se também observar, nesta análise, que o grupo II foi dividido em dois subgrupos: subgrupo I contendo isolados do hospital A e o subgrupo II contendo isolados de ambos hospitais (Figura 7).

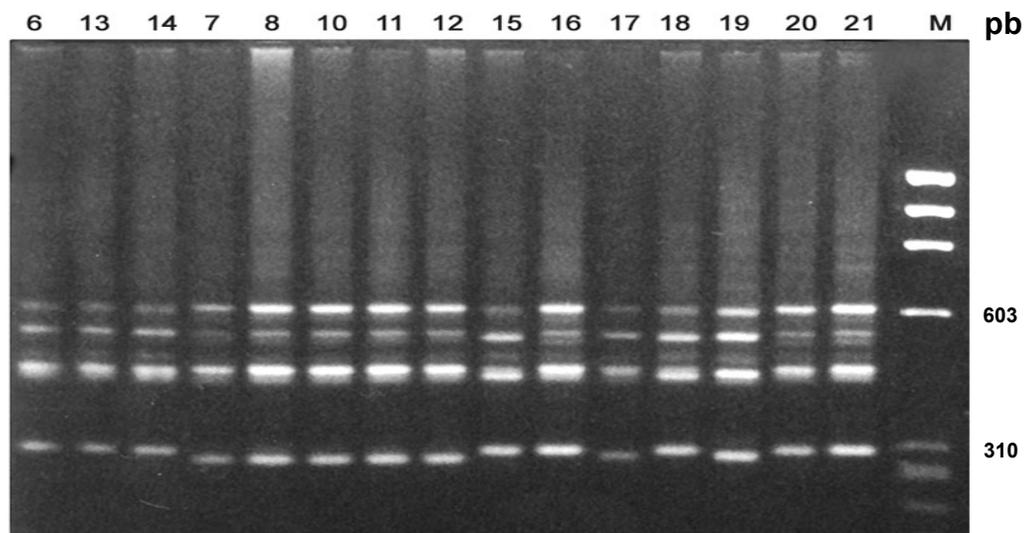


Figura 6 - Eletroforese em gel de agarose de alta resolução da região espaçadora 16S-23S do rDNA dos isolados de *K. pneumoniae*. Números de 6 a 21 correspondem a identificação dos isolados listada no Quadro 1. Marcador de tamanhos de fragmentos de DNA (pb) está indicado pela letra M (DNA do fago ϕ x174 digerido com *Hae*III).

Quadro 5 - Matriz de distância genética (%) entre 15 isolados de *K. pneumoniae*. Matriz calculada a partir de cinco bandas de DNA geradas por um par de oligonucleotídeos iniciadores da região espaçadora 16-23S do rDNA. A identificação dos isolados está disponível no Quadro 1.

7	27													
8	27	0												
10	27	0	0											
11	27	0	0	0										
12	27	0	0	0	0									
13	0	27	27	27	27	27								
14	0	27	27	27	27	27	0							
15	20	45	45	45	45	45	20	20						
16	9	17	17	17	17	17	9	9	27					
17	20	45	45	45	45	45	20	20	0	27				
18	20	45	45	45	45	45	20	20	0	27	0			
19	40	27	27	27	27	27	40	40	20	45	20	20		
20	9	17	17	17	17	17	9	9	27	0	27	27	45	
21	9	17	17	17	17	17	9	9	27	0	27	27	45	
	6	7	8	10	11	12	13	14	15	16	17	19	20	

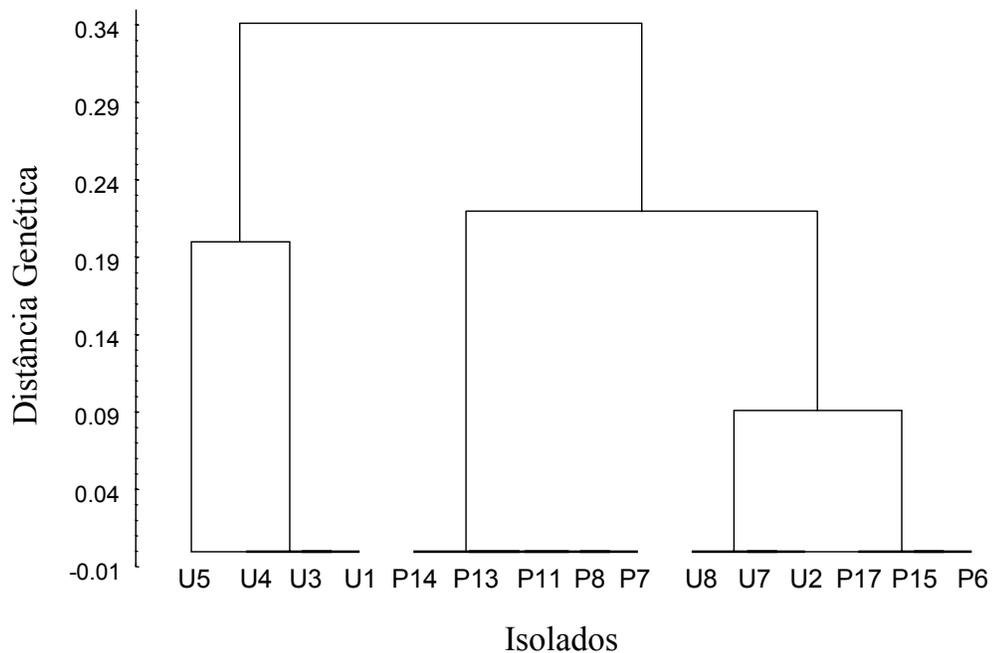


Figura 7 - Dendrograma gerado pelo agrupamento dos genótipos de *K. pneumoniae* isolados de dietas enterais, baseado nos coeficientes de similaridade genética determinada pelos padrões de DNA da região espaçadora 16S-23S do rDNA.

Os produtos de amplificação da região espaçadora intergênica 16S-23S, foram detectados para todos os 21 isolados e apresentaram de três a cinco bandas (Figura 6). Este resultado está de acordo com dados de SARUTA et al. (1997), que avaliaram a amplificação dessa região em 34 espécies diferentes, incluindo *K. pneumoniae*. Esses autores atribuíram à presença de várias bandas, o fato de terem sido amplificados dois operons *rrn* adjacentes.

A análise de correlação de Pearson entre os dados obtidos por RAPD e os dados obtidos da análise da região espaçadora 16S-23S, de *K. pneumoniae*, mostrou um coeficiente de 0,34 ($P < 0,05$) (Quadro 6). Embora essa correlação entre os dados não tenha sido elevada, observou-se a tendência dos grupos formados pela análise RAPD corresponderem a grupos de isolados de mesmo genótipo na análise da região espaçadora, como pode ser constatado para os dois grupos de isolados do hospital A e pelos isolados U2, U7 e U8 do hospital B. Além disso, observou-se que na análise por RAPD, as distâncias genéticas entre os isolados foram maiores.

Quadro 6 - Correlação de Pearson dos dados obtidos nas análises por RAPD e da região espaçadora rDNA 16S-23S

Variáveis	Nº total de dados	Var (RAPD)	Var (rDNA 16S-23S)	COV(RAPD,rDNA 16S-23S)	Correlação
RAPD x rDNA16S-23S	105	225.47	219.71	75.05	0.34*

* : Significativo a 1 e 5% de probabilidade, pelo teste t.
Var- variância; Cor- covariância.

A amplificação da região 16S do rDNA dos isolados de *K. pneumoniae* (Figura 8A) e *K. oxytoca* (Figura 8B) resultou em um fragmento de DNA de,

aproximadamente, 1420 pb. Não foi detectado polimorfismo de tamanho entre os isolados.

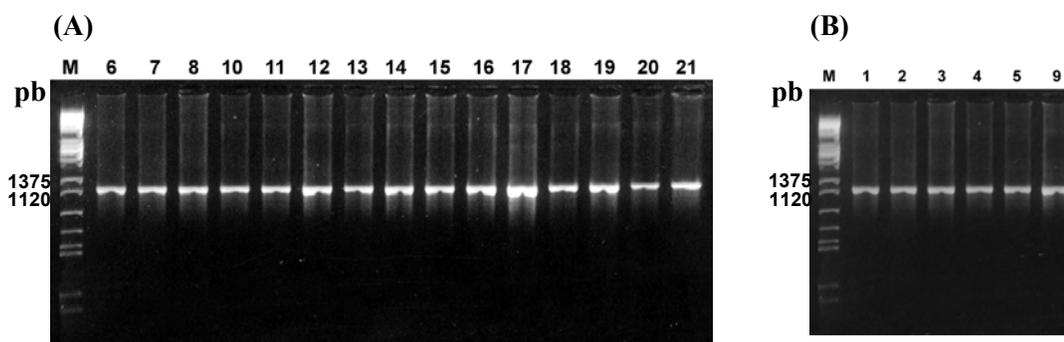


Figura 8 - Eletroforese em gel de agarose da região 16S do rDNA amplificada de isolados de *K. pneumoniae* (A) e *K. oxytoca* (B). Números de 1 a 21 correspondem a identificação listada no Quadro 1. Marcadores de tamanho de fragmento de DNA (pb) está indicado pela letra M (DNA do fago λ digerido com *Hind*III-*Ban*HI-*Eco*RI).

Na análise dos fragmentos do rDNA 16S amplificado, não observou-se polimorfismo de restrição entre os isolados, para nenhuma enzima de restrição avaliada (Quadro 7).

Para as enzimas *Hin*fI (Figura 9A e 9B), *Hha* I, *Bgl* II e *Eco* RI, observou-se sítios de restrição no fragmento de DNA de 1420 pb amplificado. O tratamento desse fragmento de DNA com as enzimas de restrição *Eco*RV, *Hind*III, *Kpn*I e *Xho*I resultou em um único fragmento de 1420 pb (Quadro 7), indicando a ausência de sítios de restrição interno no gene que codifica o RNA ribossômico 16S.

A amplificação do rDNA 16S gerou um fragmento de DNA de 1420 pb, para todos os 21 isolados de *Klebsiella*, não apresentando polimorfismo de tamanho. Este resultado está de acordo com SARUTA et al. (1997) que concluíam que o tamanho da região 16S do rDNA é muito similar entre estirpes de bactéria do mesmo gênero. O par de oligonucleotídeos iniciadores utilizado

neste estudo foi sintetizado baseado especificamente na seqüência 16S do rDNA de *Klebsiella* disponível no banco de dados do Gen-Bank e construído para

Quadro 7 - Fragmentos de restrição de DNA da região 16S do rDNA de isolados de *Klebsiella*

Região 16S amplificada/ enzima	Isolados																				
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P11	P13	P14	P15	P17	U1	U2	U3	U4	U5	U7	U8
<i>Bgl</i> II	940	940	940	940	940	940	940	940	940	940	940	940	940	940	940	940	940	940	940	940	940
	620	620	620	620	620	620	620	620	620	620	620	620	620	620	620	620	620	620	620	620	620
<i>Eco</i> RI	860	860	860	860	860	860	860	860	860	860	860	860	860	860	860	860	860	860	860	860	860
	670	670	670	670	670	670	670	670	670	670	670	670	670	670	670	670	670	670	670	670	670
<i>Eco</i> RV	1420	1420	1420	1420	1420	1420	1420	1420	1420	1420	1420	1420	1420	1420	1420	1420	1420	1420	1420	1420	1420
<i>Hha</i> I	530	530	530	530	530	530	530	530	530	530	530	530	530	530	530	530	530	530	530	530	530
	370	370	370	370	370	370	370	370	370	370	370	370	370	370	370	370	370	370	370	370	370
	350	350	350	350	350	350	350	350	350	350	350	350	350	350	350	350	350	350	350	350	350
	240	240	240	240	240	240	240	240	240	240	240	240	240	240	240	240	240	240	240	240	240
<i>Hind</i> III	1420	1420	1420	1420	1420	1420	1420	1420	1420	1420	1420	1420	1420	1420	1420	1420	1420	1420	1420	1420	1420
<i>Hinf</i> I	600	600	600	600	600	600	600	600	600	600	600	600	600	600	600	600	600	600	600	600	600
	330	330	330	330	330	330	330	330	330	330	330	330	330	330	330	330	330	330	330	330	330
	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300
	190	190	190	190	190	190	190	190	190	190	190	190	190	190	190	190	190	190	190	190	190
<i>Kpn</i> I	1420	1420	1420	1420	1420	1420	1420	1420	1420	1420	1420	1420	1420	1420	1420	1420	1420	1420	1420	1420	1420
<i>Xho</i> I	1420	1420	1420	1420	1420	1420	1420	1420	1420	1420	1420	1420	1420	1420	1420	1420	1420	1420	1420	1420	1420

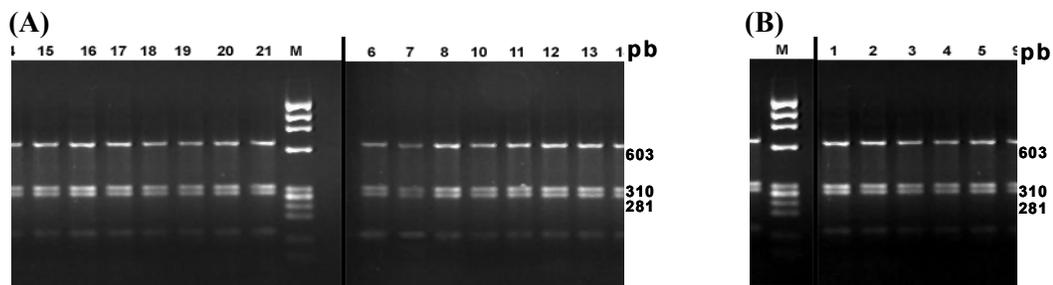


Figura 9 - Eletroforese em gel de agarose da região 16S do rDNA amplificada de isolados de *K. pneumoniae* (A) e *K. oxytoca* (B), digerida com a enzima de restrição *Hinf* I. Números de 1 a 21 correspondem a identificação listada na Quadro 1. Marcadores de tamanho de fragmento de DNA (pb) estão indicados pela letra M (DNA do fago ϕ x174 digerido com *Hae*III).

amplificar, praticamente, toda região que corresponde a 16S de *Klebsiella*, que varia de 1436 a 1489 pares de bases, dependendo da espécie ou da subespécie avaliada. Este par é diferente do par de oligonucleotídeos iniciadores (universal) normalmente utilizados para análises desta região, envolvendo espécies e gêneros diferentes. LU et al. (2000) utilizaram um par de oligonucleotídeos iniciadores universal, para amplificar uma região que codifica o rRNA 16S para eubactérias, incluindo 17 espécies. Esse par de oligonucleotídeos iniciadores amplificou um fragmento de DNA de 960 pb para todas as espécies testadas, não detectando polimorfismo de tamanho. Porém, os autores observaram padrões de restrição distintos quando, três enzimas de restrição, em média, foram utilizadas. Esses resultados diferem dos obtidos na análise por RFLP do rDNA 16S no presente estudo. Nesta análise não foi verificado polimorfismo de restrição entre os isolados de *Klebsiella*, nem mesmo entre as duas espécies (Quadro 7). Este resultado indica que a seqüência analisada de 1420 pb, que corresponde a região 16S do rDNA, é altamente conservada, pois não revelou polimorfismo nos fragmentos de restrição do rDNA para as oito enzimas testadas.

Portanto, as análises por RAPD e por PCR da região espaçadora do rDNA mostraram-se mais apropriadas para avaliar a diversidade genética entre os isolados de *Klebsiella*, em relação a região 16S do rDNA.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARIAS, M. L., MONGE, R., RODRÍGUES, J. Presencia de coliformes totales, *Escherichia coli* y *Listeria* sp. em fórmulas enterales. **Arch. Lat. Nut.**, v. 48, p. 68-70. 1998.
- BAGLEY, S. T., SEIDLER R. J. Primary *Klebsiella* identification with MacConkey-inositol-carbenicilina agar. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.36, p.536-538. 1978.
- BERMUDE, H. ARPIN, C., JUDE, F., EL-HARRIF, Z., BÉBÉAR, C., QUENTIN, C. Molecular epidemiology of an outbreak due to extended-spectrum beta-lactamases-producing enterobacteria in a French hospital. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infec. Dis.**, v. 16, p. 523-529. 1997.
- BIGEN, E., DENAMUR, E., ELION, J. Use of ribotyping in epidemiological surveillance of nosocomial outbreaks. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 7, 311-327. 1994.
- BIGEN, E., DENAMUR, E., LAMBERT-ZECHOVSKY, N., et al. DNA restriction fragment-length polymorphism differentiates crossed from independent infections in nosocomial *Xanthomonas maltophilia* bacteremia. **J. Clin. Microbiol.**, v. 29, p.1348-1350. 1991.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Primeira pesquisa brasileira das infecções hospitalares. **Rev. Control. Infec. Hosp.** 1995. 47p.

- BRISSE, S., MILATOVIC, D., FLUIT, A.C., VERHOEF, J., SCHMITZ, F.J. Epidemiology of quinolone resistance of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* in Europe. **Eur. J. Clin. Microbiol.**, v. 19, p. 64-68. 2000.
- CASEWELL, M., W. The epidemiology of *Klebsiella aerogenes* in an intensive care unit. **Res.Clin. Forums**, v. 1, p. 101. 1977.
- CASEWELL, M., PHILLIPS, I. Food as source of *Klebsiella* species for colonization and infection of intensive care patients. **J. Clin. Pathol.**, v.31, p.841-849. 1978.
- CHANG, S. C., FANG, C. T., HSUEH, P. R., CHEN, Y. C., LUH, K. T. *Klebsiella pneumoniae* isolates causing liver abscess in Taiwan. **Diag. Microbiol. Infec. Dis.**, v. 37, p. 279-284. 2000.
- CHETOUI, H., DELHALLE, E., MELIN, P., SABRI, A., THONART, P., DE MOL, P. Epidemiological typing of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates by pulsed-field gel electrophoreses and antibiotic susceptibility patterns. **Res. Microbiol**, v. 150, p. 265-272. 1999.
- COOKE, E. M., SAZEGAR, T., EDMONSON, A. S., BRAYSON, J. C., HALL, D. *Klebsiella* species in hospital food and kitchens: a source of organisms in the bowel of patients. **J. Hyg.**, v. 84, p. 97-101. 1980.
- COOKSON, B., JOHNSON, A. P., AZADIAN, B., PAUL, J., HUTCHINSON, G., KAUFMANN, M., WOODFOD, N., MALDE, M., WALSH, B., YOUSIF, A., SELKON, J. International inter- and intrahospital patient spread of a multiple antibiotic-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. **J. Infec. Dis.**, v. 171, p. 511-513. 1995.
- COSTA, G. P., SILVA, M. L. T., FERRINI, M. T. et al. Estudo comparativo da contaminação microbiana das dietas enterais em sistema aberto e fechado. **J. Bras. Nut. Parent Ent.**, v. 32, p. 180-188. 1998.
- DECRÉ, D., GACHOT, B., LUCET, J. C., ARLET, G., BERGOGNE-BÉREZIN, E., RÉGNIER, B. Clinical and bacteriologic epidemiology of extended-spectrum β -lactamase-producing strains of *Klebsiella pneumoniae* in a medical intensive care unit. **Clin. Infec. Dis.**, v. 27, p. 834-844. 1998.
- EISEN, D., RUSSELL, E., TYMMS, M., ROPER, E., GRAYSON, M., TURNIDGE, J. Random amplified of polymorphic DNA and plasmid analyses used in investigation of an outbreak of multiresistant *Klebsiella pneumoniae*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 33, p. 713-717. 1995.

- GALES, A. C. **Prevalência, sensibilidade a antimicrobianos e tipagem molecular de amostras de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de beta lactamases de espectro ampliado.** São Paulo, SP: EPM, 1997. 132p. Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas e Parasitárias) - Escola Paulista de Medicina, 1997.
- GLATMAN, L. I., KALNIN, K. V., KLITSUNOVA, N. V., DOMORADSKAYA, T. I., BEREZINA, L. A., TERECHOV, A. A., GENEVA, G. Y., ANKIRSKAYA, A. S. Genetic and molecular R-plasmid analysis of enterobacteriaceae hospital strains at children's hospital of the former USSR. **J. Chem.**, v. 6, p. 155-162. 1994.
- HANSEN, D. S., GOTTSCHAU, A., KOLMOS, H. J. Epidemiology of *Klebsiella* bacteraemia: a case control study using *Escherichia coli* bacteraemia as control. **J. Hosp. Infec.**, v. 38, p. 119-132. 1998.
- HURLEY, J.C., RUSSELL. E.G., HARRINGTON, G., SPICER, W.J. Investigation of an apparent cluster of *Klebsiella pneumoniae* bacteraemias using random amplified polymorphic DNA analysis. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.**, v. 17, p. 743-745. 1996.
- HURTADO, A., RODRÍGUEZ-VALERA, F. Accessory DNA in the genomes of representatives of the *Escherichia coli* reference collection. **J. Bacteriol.**, v.181, p. 2548-2554. 1999.
- JOHANSSON, M. L., QUESNAU, M., MOLIN, G., AHRNÉ, S. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) for rapid typing of *Lactobacillus plantarum* strains, **Letters Apl. Microbiol.**, v. 21, p. 155-159. 1995.
- LHOPITAL, S., BONACORSI, S., MEIS, D., BRAHIMI, N., MATHY, S., NAVARRO, J., AIGRAIN, Y., BINGEN, E. Molecular markers for differentiation of multiresistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in a pediatric hospital. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.**, v. 18, p. 743-748. 1997.
- LISBOA, S.C. **Bactérias Gram Negativas e *Staphylococcus aureus* em Serviço de Alimentação Hospitalar.** Viçosa, MG: UFV, 1997. 39p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, 1997.
- LU, J. J., PERNG, C. L., LEE, S. Y., WAN, C. C. Used of PCR with universal primers and restriction endonuclease digestions for detection and identification of common bacterial pathogens in cerebrospinal fluid. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, p. 2076-2080. 2000.

- MONTEROS, L. E. E., CEJA, V., MONTAÑEZ, C., SANTOS, J. I. Comparative analysis of plasmids from nosocomial *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from two hospital. **Arch. Med. Res.**, v. 25, p. 321-324. 1994.
- MONTGOMERIE, J. Z. Epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* and hospital-associated infections. **Rev. Infec. Dis.**, v. 1, p.736. 1979.
- MOROZOVA, O. T., PRIAMUKHINA, N.S. Methodological aspects of *Klebsiella pneumoniae* serotyping and its used for characterization of clinical isolates. **Klin. Lab. Diagn.**, v. 8, p. 38-41. 1997.
- NEI, M., LI, W. H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. **Proc. Nat. Acad. Scienc. USA**, v.76, p. 1564-2568. 1979.
- NIYOGI, S. K., PAL, A., MITRA, U., DUTT'A, P. Enteroaggregative *Klebsiella pneumoniae* in association with childhood diarrhea. **Ind. J. Med. Res.**, v. 112, p. 133-134. 2000.
- ØRSKOV, I., ØRSKOV, F. Serotyping of *Klebsiella*. In: BERGAN, T. (Ed.). **Met. Microbiol.**, vol. 14.:London. Academic Press, 1984. p143-164.
- PODSCHUN, R., ULLMANN, U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.11, p.589-603. 1998.
- PRODINGER, W. M., FILLE, M., BAUERNFEIND, A., et al. Molecular epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* producing SHV-5 β -lactamase: parallel outbreaks due to multiple plasmid transfer. **J. Clin. Microbiol.**, v. 34, p. 564-568. 1996.
- RENNIE, R. P., ANDERSON, C. M., WENSLEY, B. G., ALBRITTON, W. L., MAHONY, D. E. *Klebsiella pneumoniae* gastroenteritis masked by *Clostridium perfringens*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 28, p. 216-219. 1990.
- SABOTA, J. M., HOPPES, W L., ZIEGLER, J. R. et al. A new variant of food poisoning: enteroinvasive *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* sepsis from a contaminated hamburger. **Am. J. Gastr.**, v. 93, p. 118-119. 1998.
- SARUTA, K., MATSUNAGA, T., KONO, M., HOSHINA, S., IKAWA, S., SAKAI, O., MACHIDA, K. Rapid identification and typing of *Staphylococcus aureus* by nested PCR amplified ribosomal DNA spacer region. **FEMS Microbiol. Letters**, v. 146, p.271-278. 1997.

- SCHOOTER R. A., FAIERS, M. C., COOKE, E. M., BREADEN, A. L., O'FARRELL, S. M. Isolation of *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Klebsiella* from food in hospital, canteens and schools. **Lancet.**, v.2, p.390-392. 1971.
- SILVA, M.C.D., DESTRO, M. T., HOFER, E., TIBANA, A. Characterization and evaluation of some virulence markers of *Listeria monocytogenes* strains isolated from Brazilian cheeses using molecular, biochemical and serotyping technique. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 63, p. 275-280. 2001.
- SIMOONS-SMIT, A. M., VERWEIJI-VAN VUGHT, A. M. J. J., MACLAREN, D. M. The role of K antigens as virulence factors in *Klebsiella*. **J. Med. Microbiol.**, v. 21, p. 133-137. 1986.
- SHANNON, K., FUNG, K., STAPLETON, P., ANTHONY, R., POWER, E., FRENCH, G. A hospital outbreak of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* investigated by RAPD typing and analysis of the genetics and mechanisms of resistance. **J. Hosp. Infect.**, v.39, p.291-300. 1998.
- STULL, T., LIPUMA, J., EDLIND, T. A broad spectrum probe for molecular epidemiology of bacteria: ribosomal RNA. **J. Infect. Dis.**, v. 157, p. 280-286. 1988.
- SU, L. H., LEU, H. S., CHIU, Y. P., CHIA, J. H., KUO, A. J., SUN, C. F., LIN, T. Y., WU, T. L. Molecular investigation of two clusters of hospital-acquired bacteraemia caused by multi-resistant *Klebsiella pneumoniae* using pulsed-field gel electrophoresis and infrequent restriction site PCR. **J. Hosp. Infect.**, v. 46, p. 110-117. 2000.
- THURN, J., CROSSLEY, K., GERDTS, A., MAKI, M., JOHNSON, J. Enteral hyperalimentation as a source of nosocomial infection. **J. Ent. Infec.**, v. 15, p.203-217. 1990.
- TRAUB, W.H., SCHWARZE, I., BAUER, D. Nosocomial outbreak of cross-infection due to multiple-antibiotic-resistant *Klebsiella pneumoniae*: characterization of the strain and antibiotic susceptibility studies. **Chemotherapy**, v. 46, p. 1-14. 2000.
- WELLER, T. M. A., MACKENZIE, F. M., FORBES, K. J. Molecular epidemiology of a large outbreak of multiresistant *Klebsiella pneumoniae*. **J. Med. Microbiol.**, v. 46, p.921-926. 1997.

- WIDJOJOATMODJO, M. N., FLUIT, A. C., VERHOEF, J. Molecular identification of bacteria by fluorescence-based PCR-Single-Strand conformation polymorphism analysis of the 16S rRNA gene. **J. Clin. Microbiol.**, v. 33, p. 2601-2601. 1995.
- WILLIAMS, J. G. K., KUBELIK, A. R., LIVAR, K.J. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucl. Acids Res.**, v.18, p. 6531-6535. 1990.
- WONG, N. A. C. S., LINTON, C. J., JALAL, H., MILLAR, M. N. Randomly amplified polymorphic DNA typing: a useful tool for rapid epidemiological typing of *Klebsiella pneumoniae*. **Epidemiol. Infec.**, v. 113, p. 445-454. 1994.
- YOUSSEF, M. T., MALKAWI, H. I., SHURMAN, A. A., ANDREMONT, A. O. Molecular typing of multiresistant *Klebsiella pneumoniae* isolated from children from northern Jordan. **J. Trop. Pediatr.**, v. 45, p. 271-277. 1999.

CAPÍTULO 2

VIRULÊNCIA DOS ISOLADOS DE *Klebsiella* sp.

1. INTRODUÇÃO

Bactérias do gênero *Klebsiella* frequentemente causam infecção nosocomial e são associadas com morbidade e mortalidade elevadas (VERNET et al., 1995). Em particular, *K. pneumoniae*, a espécie mais importante clinicamente, ocorre em proporções significativas em infecções hospitalares como as do trato urinário, pneumonia e septicemia (PODSCHUN e ULLMANN, 1998).

Os esforços para o controle das infecções nosocomiais devem ser direcionados para a identificação das fontes de contaminação e o modo de transmissão, para a adoção de medidas preventivas. O trato gastrointestinal e as mãos de profissionais hospitalares são fontes reconhecidas de contaminação por *Klebsiella* (CASEWELL, 1977) e, embora essa bactéria tenha sido encontrada com frequência em dietas enterais, o envolvimento desses alimentos como fonte desse patógeno oportunista não tem sido considerado.

A presença de estirpes patogênicas de *Klebsiella* em ambientes e alimentos tem sido relatada. Segundo PODSCHUN et al. (2001), *K. pneumoniae* isoladas de água são capazes, como os isolados clínicos, de expressar fatores de virulência, como resistência a anticorpos, polissacarídeos capsulares, pili e sideróforos. A avaliação desse potencial virulento pode contribuir para a compreensão da etiologia do processo infeccioso.

Entre os fatores que contribuem para a patogenicidade de *Klebsiella*, a natureza da cápsula de polissacarídeos da membrana externa, fímbrias mediadoras de aderência, o sistema aerobactina e a quantidade de polissacarídeo capsular caracterizado pelo aspecto mucóide das colônias, são considerados de maior relevância (VERNET et al., 1992; 1995). A resistência a antibióticos é outro fator que contribui para a patogênese e é preocupante, pois surtos de infecção nosocomial causados por *Klebsiella*, principalmente as produtoras de β -lactamases de espectro ampliado (ESBL), vêm aumentando nos últimos anos (HENÁNDEZ-ALLÉS et al., 1999). Outros fatores de virulência também são reconhecidos como, a produção de hemolisina (CAMPRUBI et al., 1990), enterotoxinas termolábeis e termoestáveis (WADSTROM et al., 1976; KLIPSTEIN et al., 1983), lipopolissacarídeos (WILLIAMS e TOMAS, 1990) e fosfolipases (SINGH et al., 1999). Porém, o envolvimento desses fatores na patogenicidade de *Klebsiella*, não está muito claro.

A cápsula produzida por *Klebsiella* é composta de polissacarídeo complexo e protege a bactéria da fagocitose por macrófagos (SIMOONS-SMIT et al., 1986; PODSCHUN, 1990; PODSCHUN e ULLMANN, 1992), além de prevenir a morte celular por fatores bactericidas do soro. A cápsula, provavelmente, inibe a ativação de componentes do sistema complemento, principalmente, C3b (WILLIAMS et al., 1983).

As adesinas, fimbriais ou não fimbriais, participam do processo infeccioso, permitindo a aderência do patógeno a superfícies do hospedeiro. Dos diferentes tipos de adesinas fimbriais descritas em enterobactérias, dois tipos são predominantes em *Klebsiella*. As adesinas fimbriais do tipo 1 promovem a colonização bacteriana na superfície da mucosa do hospedeiro através de uma

ligação inespecífica (JONES E ISAACSON, 1983) e as adesinas fimbriais do tipo 3, ligam-se a várias células humanas, tais como as endoteliais, do epitélio do trato respiratório e células uroepiteliais (WÜRKER et al., 1990; HORNICK et al., 1992, TARKKANEN et al., 1997). Entretanto, o papel desse tipo de fimbria no processo patogênico não é conhecido. Outras adesinas fimbriais como a CF29K (DARFEUILLE-MICHAUD et al., 1992) e uma outra adesina, presente em material extracelular como a cápsula (FAVRE-BONTE et al., 1995) e adesinas não fimbriais, como KPF-28 (DI MARTINO et al., 1996) têm sido descritas. Entretanto, pouco é conhecido sobre a expressão dessas novas adesinas descritas por diferentes espécies de *Klebsiella* ou seu significado na patogenicidade (PODSCHUN e ULLMANN, 1998).

No gênero *Klebsiella*, como em outros patógenos, a garantia de suprimento de ferro no hospedeiro é feita pela síntese de sideróforos. Enterobactina e aerobactina são sideróforos, reconhecidamente, produzidos por *Klebsiella* (WILLIAMS et al., 1987; REISSBRODT e RABSCH, 1988; PODSCHUN e ULLMANN, 1992). No entanto, resultados sobre a contribuição desses sideróforos na virulência dessa bactéria têm sido conflitantes (PODSCHUN e ULLMANN, 1998).

A detecção de fatores de virulência *in vitro* não é suficiente para caracterizar a patogenicidade de um isolado, pois alguns fatores de virulência não são, necessariamente, sintetizados fora do hospedeiro. O uso de modelos animais tem sido um elemento crítico no estudo da patogenicidade de *Klebsiella* por proporcionar informações que não são obtidas em estudos *in vitro*. A determinação da dose letal (DL₅₀) tem sido uma metodologia amplamente utilizada em estudos de patogenicidade bacteriana. Essa determinação tem como critério de virulência a morte de camundongos inoculados intraperitonealmente com diluições sucessivas da bactéria (REED e MUENCH, 1938).

O objetivo desse trabalho foi avaliar a expressão de fatores de virulência de estirpes de *Klebsiella* sp. isoladas de dietas enterais, determinar a resistência a antimicrobianos e a patogenicidade utilizando modelo animal.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Estirpes bacterianas

O potencial virulento foi avaliado em seis isolados de *K. oxytoca* e 15 de *K. pneumoniae* provenientes de dietas enterais. As estirpes de *Shigella* e *Escherichia coli* utilizadas como controles nos experimentos estão descritas no Quadro 1.

2.2. Susceptibilidade a antibióticos

A susceptibilidade dos isolados de *Klebsiella* aos agentes antimicrobianos foi determinada pelo método de disco-difusão em ágar Mueller-Hinton, de acordo com o guia do "National Committee for Clinical Laboratory Standards" (NCCLS, 1999). Os antibióticos usados (Sensibiodisc-CECON, São Paulo, Brasil) foram: ácido nalidíxico-NAL (30µg), amicacina-AMI (30µg), amoxicilina-AMO (10µg), amoxicilina + ácido clavulânico-AMC (30µg/10µg), ampicilina-AMP (10µg), cloranfenicol-CLO (30µg), gentamicina-GEN (10µg), imipenem-IMP (30µg), kanamicina-KN (30µg), neomicina-NO (30µg),

Quadro 1 - Estirpes de *Shigella* e *E. coli* utilizadas neste estudo

Amostr a	Estirpes	Características ou propriedades relevantes	Origem ou referência
1	<i>Shigella dysenteriae</i>	Sorotipo 2, invasora	Brasil
2	<i>S. flexneri</i>	Sorotipo 2, invasora	Brasil
3	<i>S. flexneri</i> BS176	Pinv ⁻ , não invasora	França
4	<i>Escherichia coli</i> RS 51-1 C1(+)	Adesão difusa, controle positivo de adesão.	USA
5	<i>E. coli</i> enteroagregativa C2(+)	Adesão agregativa, controle positivo de adesão	Brasil
6	<i>E. coli</i> HB101 C3(-)	hsdS recA ara proA lacY galK rpsL xyl mtL supE, controle negativo de adesão e invasão	BOYER e ROULLAND- DUSSOIX (1969)
7	<i>E. coli</i> LG1315	ara entA lac leu mtL proC rpsL supE thi tonA trpE Xyl, controle negativo	WILLIAMS (1979)
8	<i>E. coli</i> LG1522	Ara azi fepA lac leu mtL proC rpsL supE tonA tsx thi col-V- K30iuc, controle positivo	WILLIAMS (1979)
9	<i>E. coli</i> F205	Produtora de cloacina DF13	WILLIAMS (1979)
10	<i>E. coli</i> H10407	Enterotoxigênica	FIOCRUZ

tetraciclina-TET (30µg), ticarcilina + ácido clavulânico-TIC (75µg/10µg) e trimetropim + sulfametoxazol-SUT (1,25/23,75µg). Para o diagnóstico de estirpes produtoras de beta-lactamases de espectro ampliado (ESBL/ Extended Spectrum β-lactamases) foi realizado a triagem com o uso dos antibióticos: cefotaxima-CTX (30µg), ceftazidima-CAZ (30µg), ceftamet-CEF (10µg) cefalotina-CFL (30µg) e aztreonam-ATM (30µg), de acordo com recomendações do NCCLS (1999). Após incubação a 35⁰C por 16 a 18 horas, foram consideradas suspeitas de produzirem ESBL os isolados que, de acordo com os

antibióticos testados, apresentaram os seguintes halos de inibição de crescimento: ceftamet ≤ 22 mm, ceftazidima ≤ 22 mm, aztreonam ≤ 27 mm, cefotaxima ≤ 27 mm e cefalotina ≤ 25 mm. Como teste confirmatório, foi realizado o Eteste, (AB BIODISK, Solna, Sweden) utilizando os antibióticos ceftazidima e cefotaxima como substrato.

2.3. Aspecto mucóide e produção de cápsula

O aspecto mucóide das colônias foi observado após incubação dos isolados de *Klebsiella* em ágar TSA, a 37⁰C por 48 horas (NASSIF et al., 1989).

A presença de cápsula nos isolados de *Klebsiella*, foi constatada pela visualização em microscópio ótico, após o preparo de lâminas tratadas com tinta Nanquin (HARRIGAN e McCANCE, 1976).

2.4. Ensaio de adesão e invasão em células eucarióticas

2.4.1. Análise quantitativa de adesão e invasão

A análise quantitativa de adesão e invasão dos 21 isolados de *Klebsiella* em células eucarióticas foi conduzida como descrito por FAVRE-BONTES et al. (1999), com modificações. As linhagens de células incluíram HEp-2, derivada de carcinoma de laringe humana, células VERO, derivadas de rim de macaco e Caco-2, derivada de carcinoma de cólon humano.

As células HEp-2 e VERO foram mantidas em meio mínimo de Eagle modificado por Dulbecco-D MEM e meio mínimo Eagle-MEM (Life Technologies. Inc, Grand Island, NY 14072, USA), respectivamente, suplementados com 10% de soro fetal bovino, 1% de L-glutamina, 10.000 U de penicilina por mL, 10 μ g de estreptomicina por mL e 25 μ g de anfotericina B por mL. O meio D MEM foi acrescentado ainda de 1% de piruvato de sódio. As

células ficaram incubadas a 37⁰C a uma atmosfera de 5% de CO₂ em garrafas de plásticas estéreis de 25 cm² (NUNCLON™ A/S, Roskilde, Denmark).

As células Caco-2 foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA), suplementado conforme descrito acima, sob uma atmosfera de 10% de CO₂ a 37⁰C em garrafas plásticas de 25 cm².

Monocamadas subconfluentes de, aproximadamente, 6x10⁵ células epiteliais, em placas de culturas de tecido, contendo 96 orifícios (NUNCA A/S, Roskilde, Denmark), foram lavadas quatro vezes, com 1 mL de solução tampão salina fosfatada-PBS, pH 7,4. Uma alíquota de 100 µL de suspensão de células bacterianas em fase logarítmica de crescimento foi inoculada sobre a monocamada de células em culturas e incubadas a 37⁰C por uma hora em atmosfera de 5% de CO₂. Após incubação, cada orifício foi lavado três vezes com tampão PBS, para liberação das células bacterianas não aderidas e as aderidas foram liberadas por adição de 0,1% de Triton X-100 (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA). A suspensão de bactérias liberadas pelo detergente foi então quantificada em ágar MacConkey usando o plaqueador automático Spiral Plater (Autoplate, 4000- Spiral Biotechm). A adesão foi calculada considerando-se o número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) que aderiram em células eucarióticas que formaram monocamada nos orifícios das placas de cultura de tecidos.

A determinação da quantidade de bactérias intracelulares foi realizada em monocamadas subconfluentes das diferentes linhagens de células, as quais foram lavadas quatro vezes, com 1 mL de tampão PBS. Uma suspensão de 100µL de bactérias em fase logarítmica de crescimento foi adicionada às células. Após 2 horas de incubação a 37⁰C e em atmosfera de 5% de CO₂, as células foram lavadas por quatro vezes com 1 mL de PBS e gentamicina que foi adicionada em cada orifício numa concentração de 100µg mL⁻¹. Após uma hora e meia de incubação, foram realizadas quatro lavagens com PBS e as bactérias intracelulares foram liberadas por adição de 0,1% Triton X-100. Diluições apropriadas da suspensão foram plaqueadas em ágar MacConkey, utilizando-se plaqueador automático, para quantificar bactérias invasoras.

2.4.2. Análise dos dados

Foram feitas análises de variâncias para os testes de adesão e invasão, considerando o modelo com dois fatores em delineamento inteiramente casualizado.

$$y_{ijk} = u + G_i + M_j + GM_{ij} + e_{ijk}$$

onde:

y_{ijk} é o valor observado para a característica em estudo;

u é a média geral;

G_i é o valor referente a características de adesão e invasão

M_j é o valor referente ao fator adição de manose;

GM_{ij} é a interação entre características de adesão e invasão e manose;

e_{ijk} é o erro aleatório.

A ANOVA foi feita como no demonstrado a seguir:

Quadro 2 - Resumo da análise de variância (ANOVA) da característica de adesão e invasão dos isolados de *Klebsiella* em células eucariotas na presença ou não de manose

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Genótipos	$g - 1$	SQG	QMG	QMG/QMR
Manose	$a - 1$	SQM	QMM	QMM/QMR
Gen. x Manose.	$(g - 1)(a - 1)$	SQGM	QMGM	QMGM/QMR
Resíduo	$(r - 1)(g - 1)a$	SQR	QMR	
Total	$gra - 1$	SQT		

Média	m
CV%	$(100 \cdot \text{QMR}^{1/2})/m$

As hipóteses testadas foram:

$$H_0^{(1)}: g_1 = g_2 = \dots = g_g \quad H_A^{(1)}: \text{não } H_0^{(1)}$$

Não há diferenças, de um modo geral, entre os isolados de *Klebsiella* sp. quanto à característica de adesão ou invasão.

$$H_0^{(2)}: m_1 = m_2 \quad H_A^{(2)}: \text{não } H_0^{(1)}$$

A adição, ou não, de manose no meio de crescimento das células eucarióticas não influencia os isolados quanto à capacidade de adesão ou invasão.

$$H_0^{(3)}: gm_{11} = gm_{12} = \dots = gm_{ga} \quad H_A^{(3)}: \text{não } H_0^{(1)}$$

Não há características de adesão e invasão diferenciadas por isolados de acordo com a adição ou não de manose no meio de crescimento das células eucarióticas utilizadas.

Rejeitando-se a $H_0^{(1)}$, procedeu-se o teste de média de Tukey.

2.4.2.1. Análise de Agrupamento

Distância Generalizada de Mahalanobis

As distâncias entre as 24 estirpes, incluindo os isolados de *Klebsiella* sp. de dietas enterais e os controles positivos e negativo, foram estimadas a partir dos dados de adesão e invasão, nos diferentes tipos de células eucarióticas, como descrito por CRUZ e REGAZZI (1994) utilizando o programa GENES (CRUZ, 2001).

Dendrograma de agrupamento

A matriz de distâncias genéticas entre os isolados de *Klebsiella* sp. foi utilizada para a construção de um dendrograma, utilizando o método UPGMA, com auxílio do programa STATISTICA 4.2 For Windows (Stat Sof Inc., 1993)

2.5. Análise da produção de aerobactina

A produção de aerobactina foi demonstrada utilizando a estirpe de *Escherichia coli* LG 1522 como indicadora (Quadro 1) (NASSIF e SANSONETTI, 1986). Essa estirpe foi cultivada em ágar M9 contido em placas de Petri adicionado de 200 μ M de 2,2' biperidina (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA). Uma colônia de cada isolado de *Klebsiella* a ser testada foi inoculada nesse ágar já contendo a estirpe indicadora. Estirpes produtoras de aerobactina foram visualizadas pelo halo de crescimento de células de *E. coli* LG 1522 em torno dos isolados inoculados. Como controle positivo utilizou-se a estirpe *E. coli* LG 1315 e como controle negativo, *E. coli* HB101 (Quadro 1).

2.6. Atividades de fosfatidilcolina (PC-PLC) e de hemolisina

A atividade de PC-PLC foi determinada segundo a metodologia descrita por COFFEY et al. (1996). As culturas de *Klebsiella* foram cultivadas em 4 mL de caldo BHI e incubadas a 37°C por 18 a 24 horas. Alíquotas de 3 μ L de cada cultura foram inoculadas na superfície de ágar BHI contendo 2% de NaCl e 5% de emulsão de gema de ovo, previamente diluída em NaCl 0,85% (1:1, v/v).

As placas foram incubadas a 37°C por 96 horas, em jarra Gas-Pak com gerador de anaerobiose (AnaeroGenTM Oxoid Basingstoke, England) e observada a presença de um halo de hidrólise da lecitina em torno das colônias.

A atividade hemolítica de culturas de *Klebsiella* foi investigada em ágar-sangue, como descrito por ALBESA (1989). Placas de ágar tripticaseína e soja-TSA (Oxoid, Basingstoke, England) com 5% de sangue de coelho desfibrinado foram preparadas e pequenos orifícios de 3 mm foram perfurados. Nesses

orifícios foram inoculadas 5µL de suspensão bacteriana e posteriormente as placas foram incubadas por 12 horas, a 37⁰C.

2.7. Detecção de enterotoxina termoestável

A detecção de enterotoxina foi realizada pelo método do camundongo recém-nato, descrito por GIANELLA (1976).

Os resultados foram obtidos por meio da relação do intestino e carcaça (I/C), sendo considerados positivos valores iguais ou superiores a 0,085. O controle positivo do teste foi conduzido com a estirpe enterotoxigênica *E. coli* H10407.

2.8. Determinação da dose letal (DL₅₀)

Foram utilizados camundongos albinos suíços, com cinco e seis semanas de idade e pesando de 22 a 26g, obtidos no Laboratório de Imunologia e Virologia Molecular do Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa. Os camundongos foram divididos, aleatoriamente, em grupos de seis animais e mantidos em gaiolas desinfetadas, à temperatura ambiente de cerca de 25⁰C. Duas condições experimentais foram adotadas: uma onde os camundongos foram inoculados intraperitonealmente com diluições decimais seriadas (10³ a 10⁷ UFC/mL) dos isolados em solução salina 0,1%; outra, onde os camundongos foram imunodeprimidos pela administração, via oral de prednisona (10mg/Kg/dia) durante quatro dias antes da administração intraperitoneal de diluições seriadas dos isolados. Em cada grupo de seis camundongos foi administrada uma única diluição do mesmo isolado. Os isolados P15 e U4 foram testados nas duas condições experimentais e os isolados U5 e U8, somente em camundongos imunodeprimidos.

A dose letal 50% (DL_{50}) foi calculada pelo método de REED e MUENCH (1938), após 15 dias da inoculação. Foram considerados avirulentos os isolados que apresentaram DL_{50} acima de 1×10^6 e virulentos aqueles cuja DL_{50} foi menor do que 1×10^3 (NASSIF e SANSONETTI, 1986).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os 21 isolados de *Klebsiella*, provenientes de dietas enterais, apresentaram resistência aos antibióticos amoxicilina e ampicilina (Quadro 3). Porém, quando amoxicilina foi associada ao ácido clavulânico, um inibidor de β -lactamases, apenas seis isolados (28,6%) foram resistentes (Quadro 3). Esse comportamento também foi observado na associação ticarcilina-ácido clavulânico (Quadro 3). A alteração do perfil de resistência da maioria dos isolados a esses antibióticos associados ao ácido clavulânico sugere que a produção de β -lactamases sensíveis a esse inibidor pode ser o principal mecanismo de resistência.

A prevalência elevada de resistência a ampicilina nos isolados de dietas enterais foi verificada (Quadro 3). Segundo JARLIER (1985), estirpes de *K. pneumoniae* e *K. oxytoca* são naturalmente resistentes a ampicilina e ticarcilina. Entretanto, a constatação de isolados de *K. pneumoniae* resistentes a outros agentes antimicrobianos, como ácido nalidíxico, cloranfenicol e a associação trimetropina-sulfametoxazol (Quadro 3) é diferente das observações de WATANABE et al. (1980). Esses autores relataram que, além de serem sensíveis aos antibióticos citados anteriormente, isolados de *K. pneumoniae*, provenientes de fontes diversas, são susceptíveis aos aminoglicosídeos.

Quadro 3 - Perfil de resistência a antimicrobianos de uso terapêutico de *Klebsiella* isoladas de dietas enterais

Espécie / Hospital	N ^o de Isolados (%) de Resistência aos antibióticos indicados																	
	AMC	NAL	AMI	AMO*	AMP*	ATM	CFL	CEF	CTX	CAZ	CLO	GEN	IPM	KN	NO	SUT	TET	TIC
<i>K. pneumoniae</i> Hospital A (n=8)	2 (25)	2 (25)	1 (12,5)	8 (100)	8 (100)	2 (25)	2 (25)	0 (0)	2 (25)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (37,5)	2 (25)	0 (0)	2 (25)	1 (12,5)
<i>K. oxytoca</i> Hospital A (n=6)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	6 (100)	6 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>K. pneumoniae</i> Hospital B (n=7)	4 (57,1)	6 (85,7)	0 (0)	7 (100)	7 (100)	6 (85,7)	5 (71,4)	0 (0)	5 (71,4)	1 (14,3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (14,3)	0 (0)	3 (42,9)	0 (0)
Total (n=21)	6 (28,6)	8 (38,1)	1 (4,8)	21 (100)	21 (100)	8 (38,1)	7 (33,3)	0 (0)	7 (33,3)	1 (4,8)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (14,3)	3 (14,3)	0 (0)	5 (23,8)	1 (4,8)

AMC-amoxicilina+ácido-clavulânico, NAL-ácido nalidíxico, AMI-amicacina, AMO-amoxicilina, AMP-ampicilina, ATM-aztreonam, CFL-cefalotina, CEF-ceftamet, CTX-cefotaxima, CAZ-ceftazidima, CLO-cloranfenicol, GEN-gentamicina, IPM-imipinem, KN-Kanamicina, NO-neomicina, SUT-sulfaxotrim, TET-tetraciclina, TIC-ticarcilina+ácido-clavulânico e n= número de isolados.

Os isolados de *Klebsiella* foram sensíveis aos antibióticos do grupo β -lactâmico: ceftamet, que é uma cefalosporina de terceira geração e imipenem, que é um carbapenem (Quadro 3). Esses isolados também foram inibidos pelos antibióticos de grupos distintos como: cloranfenicol, uma quinolona; gentamicina, um aminoglicosídeo; e sulfaxotrim, associação trimetropina-sulfametoxazol. Estes resultados reforçam as recomendações de GALES (1997), segundo o qual, as opções terapêuticas mais seguras para o tratamento de infecções causadas por *Klebsiella* produtoras de β -lactamases seriam β -lactâmicos do grupo carbapenem e, antibióticos não lactâmicos, como fluoroquinolonas, aminoglicosídeos e sulfametoxazol associado a trimetropina poderiam constituir drogas alternativas.

Diferentes perfis de resistência a antimicrobianos foram constatados por outros autores em estirpes de *K. pneumoniae* isoladas de alimentos. KAUR et al. (1988) observaram um índice de 54% de resistência a tetraciclina, 36% a

Kanamicina, 26% ao ácido nalidíxico e 9% a gentamicina. Esses índices de resistência antimicrobiana foram superiores aos encontrados no presente estudo para *K. pneumoniae* isoladas de dietas enterais. Por outro lado, LÁZARO et al. (1999) constataram, em isolados de *Klebsiella* provenientes de manipuladores e alimentos, 100% de resistência à ampicilina, 45% à cefotaxima, 15% à Kanamicina e 0,5% à gentamicina.

Essas comparações podem sugerir a ocorrência de mudanças no perfil de resistência ao longo do tempo e reforçam as evidências de que isolados de *Klebsiella* possuem grande variabilidade quanto à resistência aos antibióticos.

Foi constatado que os isolados de *K. pneumoniae* provenientes das dietas enterais preparadas no hospital B apresentaram, na maioria das vezes, maior resistência aos antibióticos avaliados (Quadro 3). De acordo com GALES (1997), a prevalência de resistência a antibióticos pode variar entre diferentes hospitais, podendo estar relacionada a fatores epidemiológicos locais como o controle do uso de antibióticos e nas medidas de prevenção aplicadas por comissões de infecções hospitalares sobre o problema de estirpes multirresistentes .

A variação no perfil de resistência a antibióticos entre os isolados de *Klebsiella* sp. permitiu classificá-los nos antibiotipos descritos no Quadro 4.

A constatação da resistência múltipla a antibióticos nos isolados de *Klebsiella* de dietas enterais tem grande significado clínico, pois são alimentos destinados a pacientes, por vezes, imunodeprimidos e que possuem baixa resistência a colonização do trato intestinal, por geralmente estarem recebendo drogas como antibióticos de amplo espectro e corticóides. A resistência a antibióticos confere a esses patógenos oportunistas, a maior possibilidade de colonizarem o hospedeiro e de provocar a doença.

A produção de β -lactamases de espectro ampliado (ESBL) não foi verificada entre os isolados de *K. pneumoniae* e *K. oxytoca*. Esta constatação foi possível por não ser observada a redução da concentração inibitória mínima (MIC) do antimicrobiano associado ao inibidor de β -lactamase em comparação

Quadro 4 - Antibiotipos especificados por isolados

Antibiótipo	Isolados	Resistência aos antibióticos
I	P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9, P11, P13 e U5	AMO e AMP
II	U3	NAL, AMO, AMP e ATM
III	P15	AMO, AMP, ATM, KN e TET
IV	U2	AMC, NAL, AMO, AMP, ATM, CFL e CTX
V	U4	NAL, AMO, AMP, ATM, CFL, CTX e TET
VI	P17	AMC, NAL, AMO, AMP, CFL, CTX, KN e NO
VII	U1	AMC, NAL, AMO, AMP, ATM, CFL, CTX e CAZ
VIII	U7	AMC, NAL, AMO, AMP, ATM, CFL, CTX, TET
IX	U8	AMC, NAL, AMO, AMP, ATM, CFL, CTX, NO e TET
X	P14	AMC, NAL, AMI, AMO, AMP, ATM, CFL, CTX, KN, NO, TET e TIC

Os isolados estão especificados no Quadro 1, Capítulo 1 e os antibióticos estão descritos no Quadro 2, deste capítulo.

com o MIC do antimicrobiano β -lactâmico isolado (ceftazidima ou cefotaxima), utilizando o Eteste (AB BIODISK, Solna, Sweden). Em isolados clínicos de *K. pneumoniae* já se identificou uma nova β -lactamase que hidroliza antibióticos do grupo carbapenem, sendo codificada por genes contidos em plasmídeo de 50 Kb (YIGIT et al., 2001).

A resistência aos antibióticos utilizados como substrato para a detecção de estirpes produtoras de β -lactamases de espectro ampliado variou de 0 a 38,1% (Quadro 3). Maior incidência de resistência foi registrada para os β -lactâmicos aztreonam e cefotaxima com índices respectivos de 38,1 e 33,3 %, enquanto menor resistência foi para ceftazidima e ceftamet 4,8 e 0 % respectivamente (Quadro 3). Embora a incidência de resistência ao antibiótico cefotaxima tenha sido elevada, a produção de ESBL, não foi verificada. De acordo com GALES (1997), o teste empregado pode falhar em detectar estirpes produtoras de ESBL,

como no caso de apresentar MICs situados fora da escala da fita teste para um dos compostos, uma vez que o antimicrobiano está presente em um número reduzido de diluições.

3.1. Aspecto mucóide e produção de cápsula

A maioria dos isolados de *Klebsiella*, obtidos de dietas enterais, formou colônias com aspecto mucóide pouco intenso em ágar TSA (Quadro 5). Quatro isolados (26,7%) de *K. pneumoniae* apresentaram aspecto mucóide moderado e apenas o isolado U4 (6,7%) apresentou aspecto mucóide intenso. VERNET et al. (1995) também constataram que o aspecto mucóide ocorre com frequência baixa, tendo em vista que em 241 isolados clínicos de *K. pneumoniae*, apenas 7,0% apresentavam essa característica.

A presença de cápsula no isolado U4, assim como nos isolados cujas colônias apresentaram aspecto mucóide moderados, foi confirmada pela observação microscópica de preparações tratadas com tinta Nanquim. Nos isolados que apresentaram colônias com aspecto mucóide fraco não foi possível observar cápsula pela coloração usada. O aspecto mucóide da colônia está relacionado com a produção da cápsula (MATATOV et al., 1999), que é um fator de virulência essencial para que *Klebsiella* possa superar o sistema imune do hospedeiro (SIMOONS-SMIT et al., 1986). Portanto, a ausência desse fenótipo em colônias de *Klebsiella* pode estar associada com redução da virulência. NASSIF et al. (1989) demonstraram que o aspecto mucóide das colônias é determinado por uma proteína codificada por um gene, designado *rmpA*, localizado em um plasmídeo de 180 Kb.

O tipo de cápsula produzida por *K. pneumoniae* parece desempenhar um papel importante na resistência ao soro sangüíneo e a fagocitose, mas contribui somente parcialmente para a virulência em camundongos (KABHA et al., 1995).

Quadro 5 - Características relacionadas com a virulência avaliadas em isolados de *Klebsiella* provenientes de dietas enterais

Espécie/ código	Hospital	Aspecto Mucóide	Atividade Hemolítica	PC-PLC (Lecitinase)	Produção de β -lactamase Espectro Ampliado	Produção de Aerobactina	Expressão do Receptor Aerobactina-ferro	Produção de Enterotoxina Termoestável	DL ₅₀	DL ₅₀ II
<i>K.pneumoniae</i>										
P6	A	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	nd	nd
P7	A	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	nd	nd
P8	A	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	nd	nd
P11	A	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	nd	nd
P13	A	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	nd	nd
P14	A	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	nd	nd
P15	A	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	>6,0x 10 ⁷	>7,2x 10 ⁷
P17	A	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	nd	nd
U1	B	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	nd	nd
U2	B	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	nd	nd
U3	B	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	nd	nd
U4	B	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	>5,1x 10 ⁶	>4,9x 10 ⁶
U5	B	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	nd	>6,4x 10 ⁸
U7	B	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	nd	nd
U8	B	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	nd	>8,6x 10 ⁷
<i>K.oxytoca</i>										
P1	A	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	nd	nd
P2	A	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	nd	nd
P3	A	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	nd	nd
P4	A	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	nd	nd
P5	A	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	nd	nd
P9	A	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	nd	nd

(-) Ausência do determinante de virulência avaliado e (+) Presença do determinante de virulência avaliado;
DL₅₀ I, camundongos com sistema imunológico normal e DL₅₀II, utilizando camundongos imunodeprimidos; Nd, característica não avaliada.

3.2. Ensaio quantitativo de adesão e invasão

No ensaio realizado em células Caco-2, 16 (76,2%) dos 21 isolados de *Klebsiella* apresentaram adesão expressiva (Figura 1). Isolados do hospital A, de uma forma geral, apresentaram maiores índices de adesão, em relação aos isolados do hospital B. Essa diferença entre os isolados desses hospitais pode estar relacionada a uma maior produção de cápsula por isolados, predominantemente do hospital B (Quadro 5). Observa-se que os isolados P15, U1, U4, U7 e U8 não apresentaram uma adesão expressiva (Figura 1) e, coincidentemente, foram os mesmos isolados cujas colônias apresentaram aspectos mucóide (Quadro 5). Como sugerido por FAVRE-BONTES et al. (1999), a cápsula desempenha um papel ativo durante a etapa inicial da patogênese por interagir com células produtoras de muco no intestino, porém não é requerida nas interações envolvendo as adesinas e a superfície de células epiteliais. Outros autores também relacionaram a produção de cápsula com a capacidade de adesão às células intestinais epiteliais. MATATOV et al. (1999) verificaram que estirpes de *K. pneumoniae* encapsuladas possuem incapacidade de reunir as subunidades pré-formadas de fímbrias do tipo I na superfície bacteriana.

Considerando que as estirpes de *Klebsiella* são geralmente, multirresistentes e que o trato gastrointestinal de pacientes é o principal reservatório de estirpes nosocomiais, estabeleceu-se uma relação entre adesão a linha de células epiteliais intestinais Caco-2 e multirresistência a antibióticos, dos isolados de *Klebsiella* deste trabalho. Observou-se que os isolados que tiveram uma adesão menos expressiva foram todas resistentes a pelo menos cinco antibióticos, enquanto que aqueles com adesão mais expressiva foram, predominantemente, resistentes a dois antibióticos, amoxicilina e ampicilina. Observações semelhantes foram obtidos no estudo realizado por LIVRELLI et al. (1996). Esses autores avaliando propriedades adesivas e resistência a antibióticos em isolados clínicos de *Klebsiella*, *Enterobacter* e *Serratia*, não encontraram

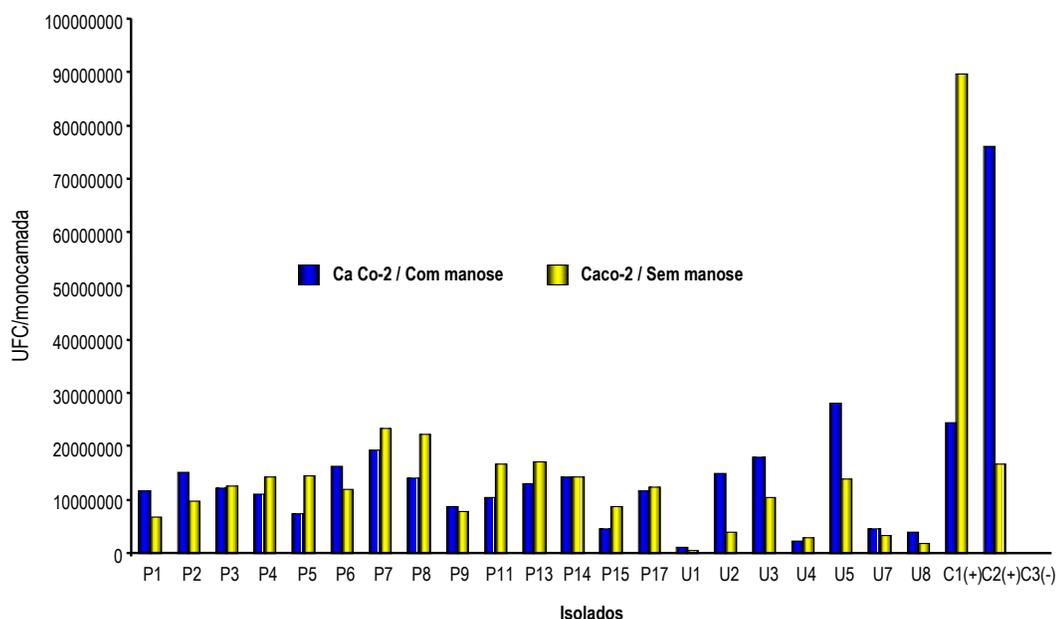


Figura 1 - Ensaio de adesão realizado com 21 isolados de *Klebsiella* de dietas enterais em células Caco-2, com dois tratamentos. Controles estão listados Quadro 1. Os resultados são médias de contagens de colônias típicas de *Klebsiella* realizadas em duplicata com duas repetições.

nenhuma relação entre o padrão de adesão e resistência a antibióticos específicas, sugerindo que existem outros fatores de adesão não conhecidos envolvidos. No entanto, relação diferente entre essas duas características foi encontrada por MARTINO et al. (1997) que sugeriram uma associação diretamente proporcional entre resistência múltipla a antibióticos e adesão a células intestinais epiteliais Caco-2, para a maioria dos 61 isolados clínicos de *Klebsiella* avaliados.

A análise de variância indicou haver diferenças significativas, a 1% de probabilidade, entre as características de adesão dos isolados de *Klebsiella* sp. em células Caco-2 e dos controles positivos e negativos. Entretanto, não foram detectadas diferenças significativas na adesão quando manose foi adicionada ao meio. A interação entre as características de adesão e invasão e manose também foi não significativa (Quadro 6).

Quadro 6 - Resumo da análise de variância para adesão e invasão, em diferentes tipos de células eucarióticas, considerando o comportamento das estirpes bacterianas testadas (QMG: Quadrado médio de Genótipo), da adição ou não de manose às células eucarióticas (QMM: Quadrado Médio de Manose), interação entre genótipo e manose (QMGM Quadrado médio da interação Genótipo e Manose) e QMR: Quadrado Médio do Resíduo.

ADESÃO				
Célula Hospedeira	QMG	QMM	QMGM	QMR
Caco-2	629583088804348**	578005300000 ^{ns}	57939537847826,1 ^{ns}	2097813708333333
VERO	133948408729,7 ^{ns}	56060866816,66 ^{ns}	28013366034,06 ^{ns}	80044568483,33
Hep-2	204385777210469 ^{ns}	219164264508817 ^{ns}	204061363405860 ^{ns}	210303914323817
INVASÃO				
Caco-2	347664087430,97**	164666040066,66 ^{ns}	392910209712,32**	170267142252,08
VERO	1192794601,13*	11915913,375 ^{ns}	607817155,98 ^{ns}	569797025,04
Hep-2	6682218228,8**	424284504,16 ^{ns}	476231191,12*	265019566,66

significativo a 5% de probabilidade.

** significativo a 1% de probabilidade.

^{ns} não significativo.

O teste de média de Tukey permitiu agrupar as estirpes estudadas em grupos distintos, de acordo com o padrão de adesão nas células Caco-2. O controle positivo C2, constituído pela *E. coli* enteroagregativa formou um grupo isolado dos demais, os padrões de adesão dos isolados P1, P9, P15, U4, U8, U7, U1 e do controle negativo (C3) formaram outro grupo e o restante dos isolados e um dos controles positivos (C1) foram classificados em dois níveis “a” e “b” (Quadro 7).

Foi possível observar que existem diferenças, com relação características de adesão em células Caco-2, entre os isolados de uma mesma localidade (Quadro 7). Por exemplo, estirpes isoladas de uma mesma amostra de dietas enterais do hospital A, como os isolados P15 e P14, ficaram em grupos distintos. Ao contrário, o isolado P15, que embora tenha sido isolada no hospital A, apresentou um padrão muito próximo do isolado U8 proveniente do hospital B. A observação de variações entre isolados de mesma localidade também foi observada na análise de polimorfismo de DNA amplificado ao acaso-RAPD (Capítulo 1).

Ainda considerando a característica de adesão em células Caco-2 pode-se destacar a diversidade entre isolados da mesma espécie (Quadro 7). Nota-se que os isolados de *K. oxytoca* foram separados em grupos distintos, o mesmo ocorrendo para os isolados de *K. pneumoniae*. Alta diversidade apenas entre o isolados de *K. pneumoniae* também foi observada na análise de RAPD, descrita no Capítulo 1.

Não foi observada adesão expressiva para nenhum dos isolados de *Klebsiella* na linhagem de células VERO (Figura 2). Esta observação pode estar relacionada a origem das células VERO, as quais são derivadas de células de rins de macacos. A escolha dessa linhagem de célula para estudos de adesão dos isolados de *Klebsiella* foi baseada no fato de serem células amplamente utilizadas em diferentes estudos *in vitro*, por não serem derivadas de carcinoma.

Mesmo a adesão das estirpes de *Klebsiella* sp. em células VERO ter sido pouco expressiva, pode-se observar que estirpes de *K. pneumoniae* do hospital A

Quadro 7 - Teste de média para as 24 estirpes testadas que foram significativos a 5% e 1% pelo teste F, considerando características de adesão para as células Caco-2 e invasão para as células Caco-2, VERO e Hep-2.

Adesão/Caco-2			Invasão/Caco-2			Invasão/VERO			Invasão/HEp-2		
Isolado	Média	Tukey	Isolado	Média	Tukey	Isolado	Média	Tukey	Isolado	Média	Tukey
C2(+)	63850000	a	P17	1157200	a	P7	68500	a	U8	174250	a
C1(+)	22350000	ab	P2	693650	a	P8	41155	a	U7	94700	b
P7	21225000	ab	P8	642875	a	P6	39900	a	P13	84675	bc
P8	17060000	ab	P4	639000	a	P3	39550	a	P8	76000	bcd
U5	15175000	ab	P3	162650	a	P2	34275	a	U5	69975	bcd
P13	15000000	ab	P15	130600	a	P4	32450	a	P7	60025	bcde
P14	14277500	ab	U5	101600	a	P17	28530	a	P6	48750	bcde
U3	14130000	ab	C1(+)	91650	a	P5	28250	a	P11	46650	bcde
P11	13490000	ab	U1	72500	a	U5	27350	a	P14	40525	bcde
P17	0012627500	ab	P14	61650	a	P11	27205	a	P15	38325	bcde
P3	12362500	ab	P13	58750	a	P1	25950	a	U1	34925	bcde
P6	10937500	ab	P11	54500	a	P13	19350	a	C2(+)	33575	bcde
P4	10175000	ab	P5	51200	a	P9	18225	a	U2	27625	cde
U2	9457000	ab	P6	43900	a	U1	13150	a	C!(+)	27400	cde
P2	8342500	ab	P7	36700	a	P14	12550	a	P17	20500	de
P5	8210000	ab	U7	32010	a	U3	9385	a	U3	6065	e
P1	7510000	b	P1	28750	a	P15	8650	a	U4	4715	e
P9	6025000	b	P9	26725	a	U4	4763	a	P2	3850	e
P15	4437500	b	C2(+)	25760	a	C!(+)	4170	a	P5	3737.5	e
U4	2864000	b	U2	22502.5	a	C2(+)	1792.5	a	P1	3462.5	e
U8	2603000	b	U4	19600	a	U8	1370	a	P4	3222.5	e
U7	2367500	b	U8	17162.5	a	U7	1295	a	P9	3182.5	e
U1	852500	b	U3	17000	a	U2	360	a	P3	2850	e
C3(-)	0	b	C3(-)	950	a	C3(-)	50	a	C3(-)	0	e

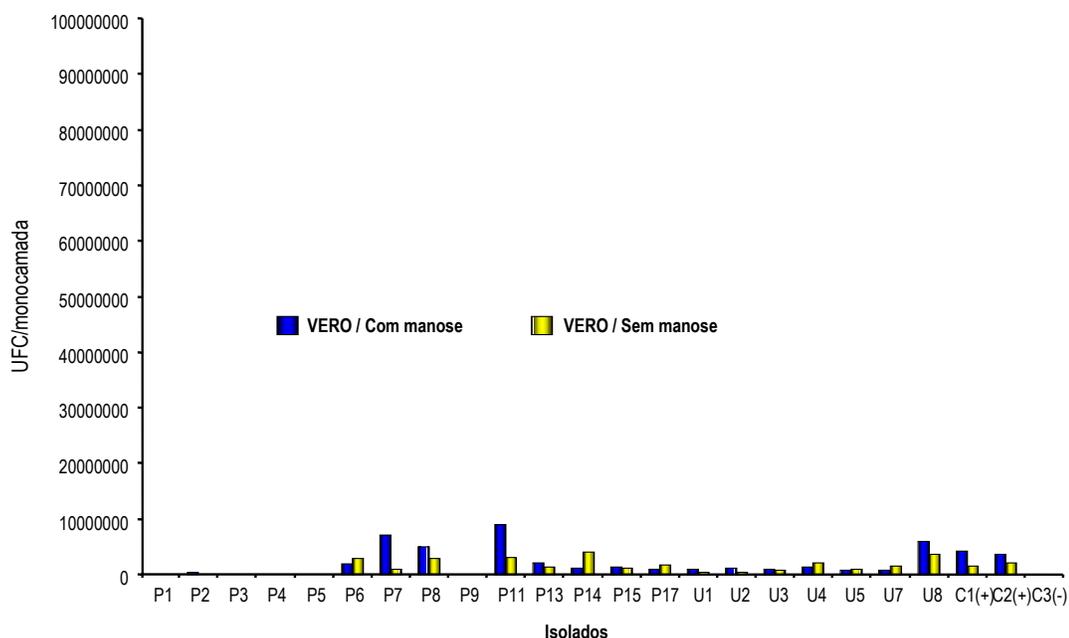


Figura 2 - Ensaio de adesão realizado com 21 isolados de *Klebsiella* de dietas enterais em células VERO, com dois tratamentos. Controles estão listados no Quadro 1. Os resultados são médias de contagens de colônias típicas de *Klebsiella* realizadas em duplicata com duas repetições.

sobressaíram em relação às estirpes da mesma espécie do hospital B, concordando com os dados de adesão obtidos com células Caco-2. Entretanto, a análise de variância não detectou diferença significativa entre os isolados de dietas enterais e entre controles positivos e negativos.

Apenas os isolados de *K. pneumoniae* aderiram às células HEp-2 (Figura 3). De acordo com FADER et al. (1988), isolados clínicos de *K. pneumoniae* assim como outros patógenos respiratórios, apresentam um certo tropismo de ligação a células HEp-2. O mesmo não se aplica aos isolados de *K. oxytoca*. Uma explicação seria que, diferenças nas especificidades de ligações são refletidas no tropismo característico dos diferentes tipos de fimbrias, em se ligar a estruturas presentes em células epiteliais de diferentes tecidos (TAKKANEM et al., 1990).

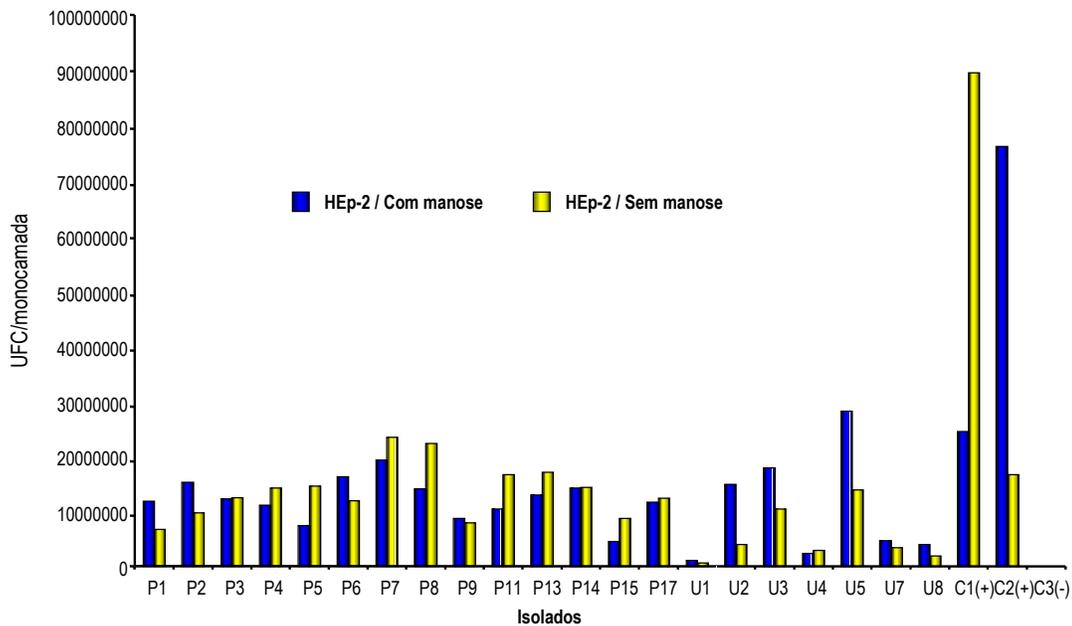


Figura 3 - Ensaio de adesão realizado com 21 isolados de *Klebsiella* de dietas enterais em células HEp-2, com dois tratamentos. Controles estão listados no Quadro 1. Os resultados são médias de contagens de colônias típicas de *Klebsiella* realizadas em duplicata com duas repetições.

Não foram verificadas diferenças significativas entre dos dados de adesão dos isolados em células HEp-2. Porém, quando analisado individualmente, em meios sem adição de manose, foi constatado um efeito genótipo significativo.

Comparando a capacidade de adesão dos isolados entre as linhagens de células epiteliais humanas analisadas neste trabalho, constatou-se que, para a maioria dos isolados, os maiores índices foram observados em células Caco-2 (Figuras 1, 2 e 3). Este resultado reforça a colocação feita por MARTINO et al. (1997) de que a adesão a células intestinais é essencial para emergência e persistência de *Klebsiella* no intestino humano e a de vários estudos epidemiológicos que revelam que o reservatório de *K. pneumoniae* envolvidas em infecções nosocomiais é o trato gastrointestinal de pacientes. Adicionalmente,

observou-se que estirpes de *K. pneumoniae* do hospital A, de uma forma geral, apresentaram maiores índices de adesão nesta linhagem de célula eucariótica.

A maioria das estirpes de *Klebsiella* sp. invadiu células Caco-2 e maiores índices foram verificados nos isolados do hospital A (Figura 4).

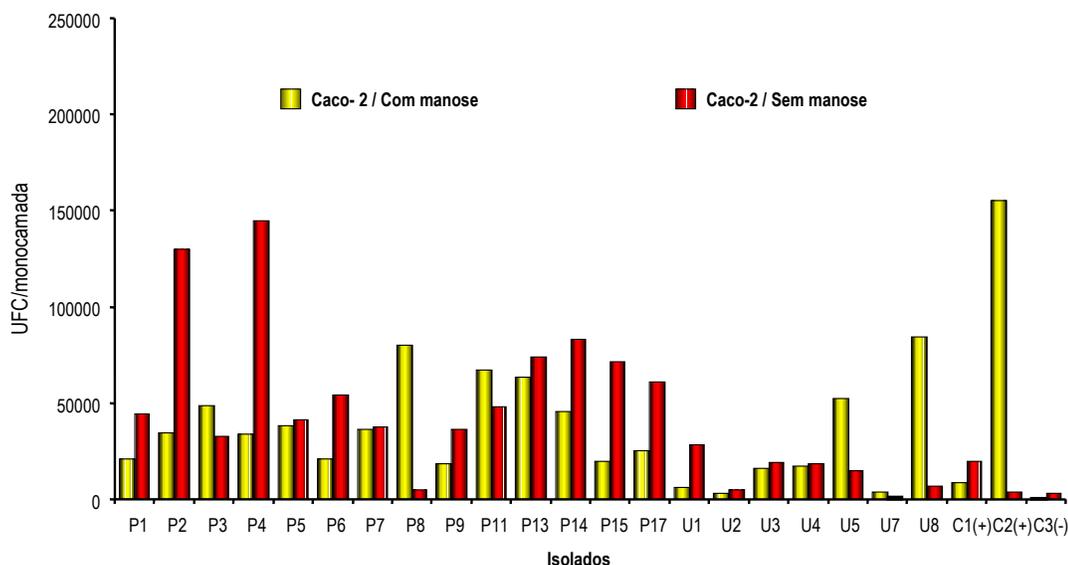


Figura 4 - Ensaio de invasão realizado com 21 isolados de *Klebsiella* de dietas enterais em células Caco-2, com dois tratamentos. Controles estão listados no Quadro 1. Os resultados são médias de contagens de colônias típicas de *Klebsiella* em duplicata, com duas repetições.

Invasão em células VERO foi observada, apesar dos índices terem sido baixos, sendo mais expressiva entre os isolados do hospital A (Figura 5) e apenas os isolados de *K. pneumoniae* invadiram as células HEp-2 (Figura 6).

Maiores índices de invasão foram registrados nas células Caco-2 e HEp-2 do que nas células VERO (Figuras 4, 5 e 6).

Foram verificadas diferenças significativas de invasão entre os isolados para os três tipos de células Caco-2, VERO e Hep-2 (Quadro 6). As análises de interação característica de invasão e manose foram significativas para as células

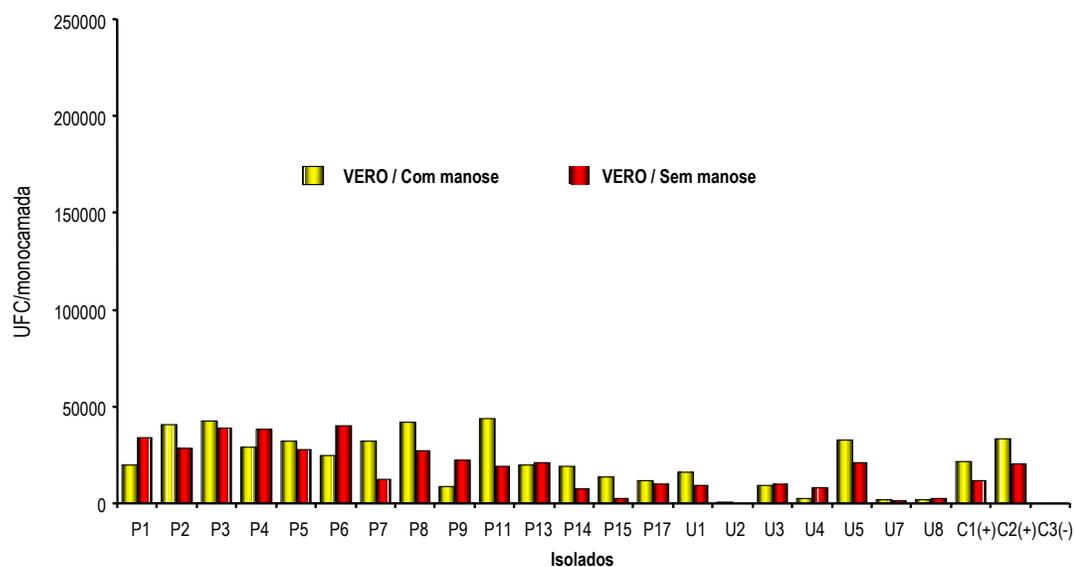


Figura 5 - Ensaio de invasão realizado com 21 isolados de *Klebsiella* de dietas enterais em células VERO, com dois tratamentos. Controles estão listados no Quadro 1. Os resultados são médias de contagens de colônias típicas de *Klebsiella* realizadas em duplicata com duas repetições.

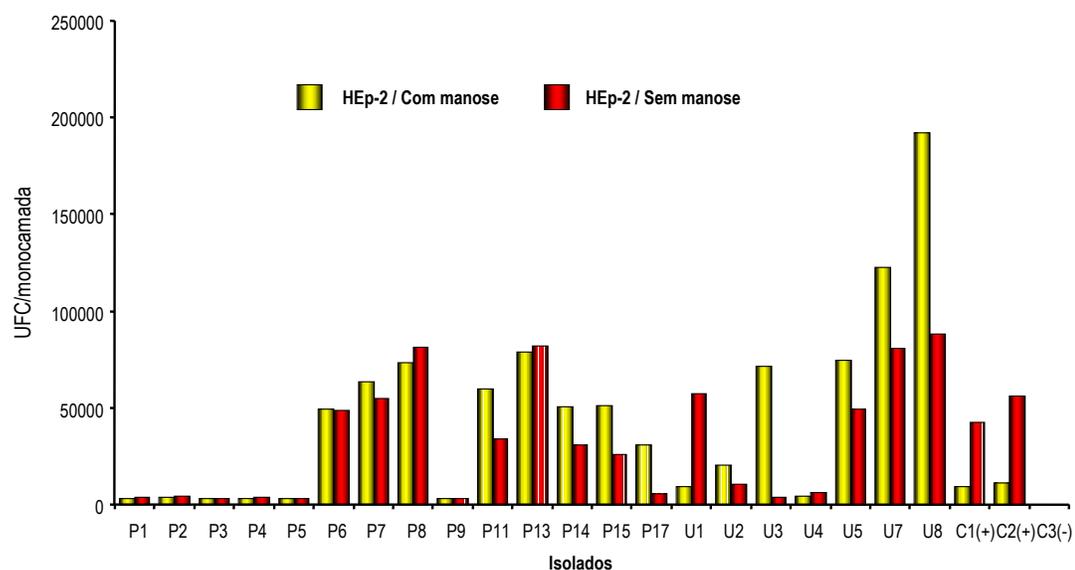


Figura 6 - Ensaio de invasão realizado com 21 isolados de *Klebsiella* de dietas enterais em células Hep-2, com dois tratamentos. Controles estão listados no Quadro 1. Os resultados são médias de contagens de colônias típicas de *Klebsiella* realizadas em duplicata com duas repetições.

Caco-2 e HEp-2, ou seja, existem isolados que apresentam comportamento diferenciado na presença ou não de manose. Embora a característica de invasão tenha apresentado na análise de variância, diferenças significativas entre si para os três tipos de células, o teste de média só evidenciou esta diferença para as células HEp-2 (Quadro 7). Neste caso, cinco grupos foram observados. O isolado U8 constituiu um grupo isolado, assim como o isolado U7. Os isolados U3, U4, P2, P5, P1, P4, P9, P3 e C3(+) constituíam um outro grupo, e os demais foram classificados em mais que um grupo.

Pode-se observar uma tendência ao agrupamento dos isolados do hospital A por espécies, ao passo que mesmas espécies dos isolados do hospital B ficaram alocadas em grupos distintos.

O mecanismo que capacita *K. pneumoniae* a invadir células epiteliais humanas ainda não é bem conhecido. Admite-se, com base nos resultados de um estudo com *Salmonella typhi* Ty2, que o mecanismo de invasão não é dependente somente de microfilamentos exibido por muitas bactérias entéricas, como estirpes de *E. coli* enteroinvasiva, *Salmonella*, *Shigella* e *Yersinia* e ainda, que ele ocorre por endocitose mediada por receptores (OELSCHLAEGER e TALL, 1997).

A presença de manose não resultou em diferenças expressivas na adesão e invasão dos isolados de *Klebsiella* nas diferentes linhagens de células eucarióticas avaliadas neste estudo (Figuras 1 a 6). A presença de manose inibe a expressão de adesinas fimbriais do tipo 1, que são amplamente distribuídas entre bactéria Gram-negativas (EDWARD e PUENTE, 1998). Este resultado pode sugerir que a expressão de fimbrias do tipo 1 não é determinante na adesão e invasão dos isolados de *Klebsiella* nas células eucarióticas utilizadas neste experimento.

Um dendrograma de agrupamento para as variáveis de adesão e invasão utilizando a distância generalizada de Mahalanobis foi feito pelo método hierárquico UPGMA (Figura 7). Percebe-se que a utilização da análise de agrupamento se mostrou mais eficiente para discriminação dos isolados, sendo possível o estabelecimento de vários grupos.

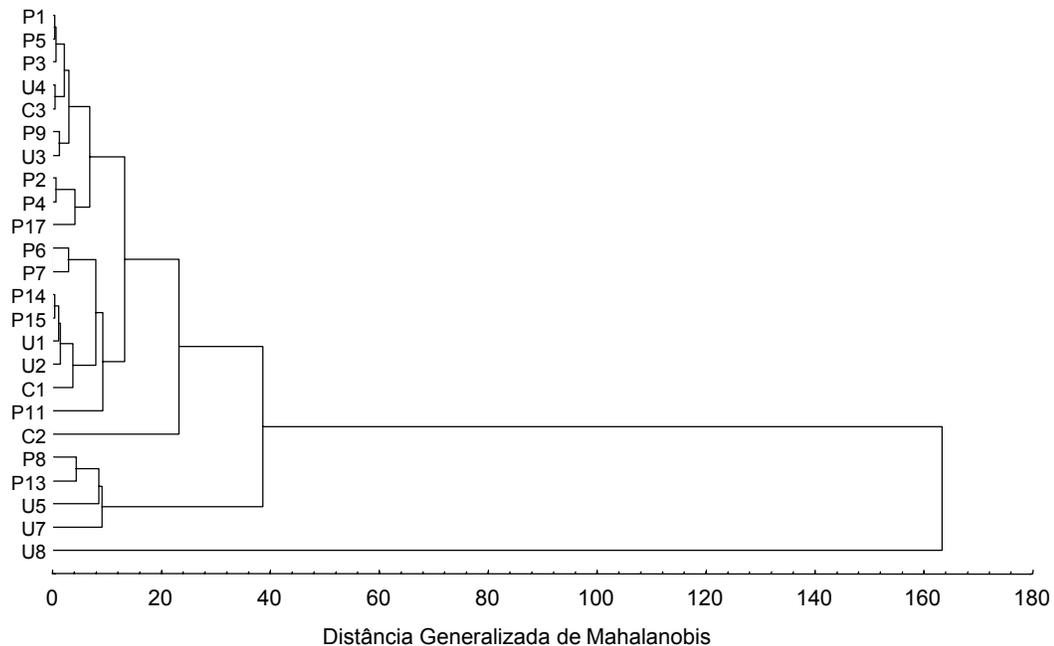


Figura 7 - Dendrograma de agrupamento hierárquico pelo método UPGMA, com base na distância, generalizada de Mahalanobis, entre as estirpes avaliadas no teste quantitativo de adesão e invasão, que incluem isolados de *Klebsiella* listados no Quadro 1 Capítulo 1 e controles listados no Quadro 2 deste capítulo.

Existe uma semelhança elevada entre os grupos formados pela análise de agrupamento com o teste média, uma vez que as distâncias de Mahalanobis são estabelecidas a partir das médias das características de adesão e invasão. Assim, isolados com menores valores de média para as várias características tendem a ficar agrupadas. Por exemplo, os isolados P1, P2, P3, P4 e P5 da espécie *K. oxytoca* ficaram agrupados por apresentarem a distância de Mahalanobis de até 12. Nas Figuras 5 e 6 as semelhanças entre estes isolados podem ser bem evidenciadas.

Nota-se que os isolados de *K. pneumoniae* ficaram distribuídos em diferentes grupos, enquanto que os isolados de *K. oxytoca* tenderam a se agrupar, pela característica de adesão e invasão. Esses dados concordam, de uma forma geral, com os dados de agrupamento pelo padrão de RAPD (Capítulo 1),

confirmando uma maior diversidade entre os isolados de *K. pneumoniae* quando comparados aos isolados de *K. oxytoca*.

3.3. Produção de aerobactina

Nas condições experimentais usadas os isolados de *Klebsiella* provenientes de dietas enterais não apresentaram produção de aerobactina (Quadro 5). Para muitos autores são raros os isolados de *Klebsiella* aerobactina positivos, independente da espécie ou fonte de isolamento (MARTINEZ et al., 1987; WILLIAMS et al., 1987 e PODSCHUN e ULLMANN, 1992). VERNET et al. (1992) registraram uma incidência de 3,7 % de *K. pneumoniae* produtora de aerobactina entre 190 isolados clínicos e concluíram que a produção de aerobactina não é um fenótipo disseminado entre isolados clínicos nosocomiais. VERNET et al. (1995) constataram que, em 241 isolados clínicos de *K. pneumoniae*, apenas 6,7% apresentaram produção de aerobactina. Em estudo comparativo de fatores de virulência entre isolados clínicos de *K. terrigena* e *K. pneumoniae*, PODSCHUN et al. (2000) verificaram que nenhuma das 74 estirpes de *K. terrigena* e apenas 5% das 50 estirpes de *K. pneumoniae* tinham a capacidade de sintetizar aerobactina.

Baseado nos resultados encontrados e nas informações da literatura consultada, *Klebsiella* poderia ser incluída no grupo de enterobactérias que apresentam baixa taxa de produtores de aerobactina. A divisão de grupos de acordo com a incidência de estirpes aerobactina positiva foi proposta por MARTINEZ et al. (1987). Um grupo constituído por gêneros que apresentam poucas (< 20%) estirpes produtoras de aerobactina, compreendendo *Serratia*, *Proteus* e *Salmonella* e o outro grupo, que inclui o gênero *Escherichia* que mostrou uma elevada incidência de síntese de aerobactina (40%).

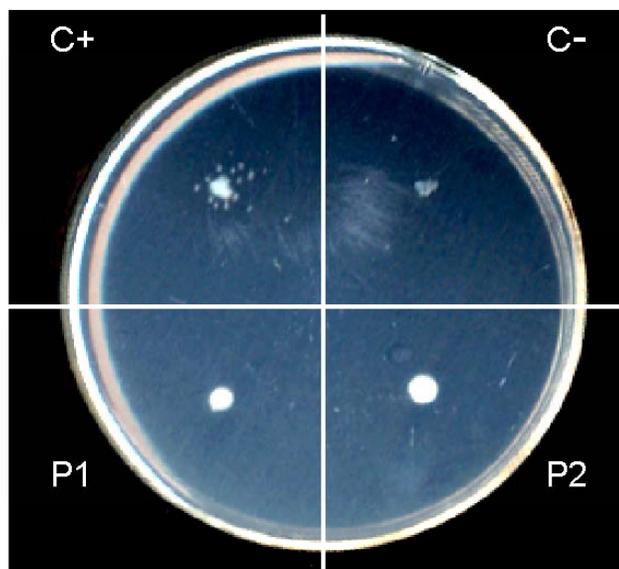


Figura 8 - Teste da produção de aerobactina em ágar M9 adicionado de 200µg de 2 2'-dipiridina. Teste positivo é indicado pela presença de colônias satélites ao redor do isolado avaliado, como verificado para o controle positivo (C+). C- = controle negativo, P1 e P2 são isolados descritos no Quadro 1, Capítulo 1.

Considerando que a biodisponibilidade de ferro no hospedeiro é extremamente baixa (10^{-18} M), que o ferro é essencial para o crescimento microbiano, que a incidência de aerobactina é baixa entre os isolados de *Klebsiella* podendo não ter papel chave na patogenicidade, levanta-se a questão sobre os mecanismos que poderiam garantir o suprimento de ferro no hospedeiro para essa bactéria. Sabe-se que, além de aerobactina, isolados de *Klebsiella* expressam um outro tipo de sideróforo, denominado enterobactina (WILLIAMS et al., 1987; REISSBROADT e RABSCH, 1988 e PODSCHUN e ULLMANN, 1992). Porém, estudos que avaliaram a contribuição de enterobactina para a virulência bacteriana produziram resultados contraditórios. YANCEY et al. (1979) reportou que mutantes de *Salmonella typhimurium* defectivos na capacidade de sintetizar esse sideróforo foram menos virulentos em camundongos, enquanto que BENJAMIN et al. (1985) não verificaram relação entre virulência de *Salmonella* e capacidade de sintetizar enterobactina. De

acordo com PODSCHUN e ULLMANN (1998), o papel da enterobactina na virulência de enteropatógenos permanece incerta.

Outra alternativa para a aquisição de ferro pelos isolados clínicos de *Klebsiella* não produtores de aerobactina seria a utilização de aerobactina introduzida exogenamente por outras bactérias (WILLIAMS et al., 1989). Por sintetizar somente o receptor aerobactina ferro, as estirpes poderiam apresentar uma vantagem sobre outras bactérias que sintetizam aerobactina, em uma infecção mista.

Klebsiella, assim como, *Haemophilus influenzae* ou *Neisseria meningitidis*, também poderia expressar receptores para transferrina ou lactoferrina que removeriam o ferro diretamente de proteínas ligadas ao ferro. Além disso, poderia utilizar o ferro em compostos liberados por trauma ou doenças no hospedeiro (BULEN et al., 2000).

3.4. Atividade hemolítica e de fosfatidilcolina (PC-PLC)

A atividade hemolítica em meio TSA, adicionado de 0,5% de eritrócitos de coelho não foi constatada em nenhum dos isolados de *Klebsiella* (Quadro 5). Estudos de incidência desse fator de virulência tanto em isolados clínicos quanto de alimentos não foram encontrados na literatura consultada. Esse fator de virulência foi detectado *in vitro*, em 1980 por ALBESA et al. em teste realizado em ágar sangue contendo eritrócitos de coelho. Desde então, esse grupo de pesquisadores vem estudando essa citolisina (ALBESA et al., 1985; ALBESA, 1989), sendo que a especificidade por eritrócitos de coelho foi sempre confirmada.

A ausência da atividade hemolítica nas condições deste trabalho pode estar relacionada a falta de ativadores para a expressão dos genes que codificam tal enzima, que muitas vezes não são reproduzíveis em condições *in vitro*. Outro aspecto relevante que é colocado por ALBESA et al. (1985), é a relação entre atividade hemolítica e atividade enterotóxica. Na revisão desses autores são

descritas as presenças desses dois fatores de virulência, simultaneamente, em espécies patogênicas.

A atividade de lecitinase ou PC-PLC foi ausente para todos os isolados nas condições em que foi determinada (Quadro 5). Esse resultado está de acordo com SINGH et al. (1999) que relataram que a atividade de lecitinase é rara em isolados de *Klebsiella*, uma vez que apenas 2,4% de 168 isolados clínicos de *K. pneumoniae* apresentaram essa atividade. Além disso, verificaram a ausência dessa atividade entre 11 isolados de *K. oxytoca*. Esse trabalho foi o primeiro relato de atividade lecitinase em isolados de *Klebsiella* e o papel desse fator de virulência na patogenidade desse gênero bacteriano ainda não é conhecido.

3.5. Produção de enterotoxina termoestável

Os isolados de *K. pneumoniae* e *K. oxytoca*, avaliados neste estudo, não demonstraram a produção de enterotoxina termoestável determinada pela metodologia dos camundongos recém-natos (Quadro 5). Outros autores também não registraram a presença de enterotoxinas em isolados de *Klebsiella*. LÁZARO et al. (1999) verificaram pela mesma metodologia que, entre 18 estirpes de *K. pneumoniae* isoladas de alimentos e manipuladores, apenas as estirpes provenientes de manipuladores foram toxigênicas. Entretanto, os resultados permitem caracterizar os isolados de *Klebsiella* como não toxigênicos, apenas quando considera-se a produção de enterotoxina termoestável, pois de acordo com alguns autores (ASNANI e JHANJEE, 1982; ARORA et al., 1983) estirpes de *Klebsiella* possuem capacidade de produzir tanto enterotoxinas estáveis, como sensíveis ao calor. Além disso, outros autores verificaram uma alta incidência de enterotoxina termossensível em estirpes de *K. pneumoniae* isoladas de alimentos. KAUR et al. (1988) verificaram que 61 de 100 estirpes de *K. pneumoniae* isoladas de alimentos, produziam enterotoxina termossensível.

3.6. Determinação da DL₅₀ em camundongos normais e imunodeprimidos

A determinação da DL₅₀ em camundongos normais e imunodeprimidos demonstrou que todos isolados avaliados foram avirulentos (Quadro 5). A imunodepressão dos camundongos antes da inoculação intraperitoneal da bactéria foi adotada neste trabalho, pelo fato da dose letal poder falhar em distinguir estirpes virulentas e avirulentas de bactérias que causam doenças, preferencialmente em pessoas com o sistema imunológico deprimido. Entretanto, isolados clínicos de *Klebsiella* foram virulentos para camundongos com o sistema imunológico normal (NASSIF e SANSONETTI, 1986; KABHA et al., 1995; LE ROY et al., 1995 e VERNET et al., 1995).

Muitos estudos de DL₅₀ conduzidos com isolados clínicos de *Klebsiella* relacionam o sorotipo capsular, o aspecto mucóide das colônias e a produção de aerobactina com a patogenicidade em camundongos. NASSIF e SANSONETTI (1986) verificaram que isolados clínicos de *K. pneumoniae* K1 e K2 contendo plasmídeo de 180 Kb, e com o gene que codifica aerobactina, foram virulentos e, estirpes dos mesmos sorotipos, mas sem o plasmídeo, foram avirulentos. No estudo comparativo dos sorotipos capsulares K2 e K21 de *K. pneumoniae*, KABHA et al. (1995) verificaram que o tipo capsular K2 apresentou virulência elevada em camundongo, enquanto que o sorotipo K21 foi classificado como avirulento. Porém, esses autores observaram que o tipo capsular contribui somente parcialmente, com a virulência dessa espécie bacteriana em camundongo. VERNET et al. (1995) demonstraram que isolados de *K. pneumoniae* de sorotipo K2 foram mais virulentos que estirpes de sorotipos K23 e K28, onde as estirpes analisadas apresentavam o fenótipo de aspecto mucóide das colônias e produção de aerobactina.

Nota-se, nos trabalhos citados, que a patogenicidade em modelos animais está na dependência da associação de fatores.

Considerando que a determinação de patogenicidade pela DL₅₀ tem como critério a letalidade de camundongos dose dependente, essa metodologia pode falhar em caracterizar a virulência de estirpes bacterianas, quando a infecção

desencadeada não resulta em septicemia letal. Outra metodologia em modelos animais utilizada para determinar a patogenicidade de isolados clínicos de *Klebsiella* é a indução experimental de lesões de pele. De acordo com essa metodologia SIMOONS-SMITH et al. (1984) verificaram que estirpes nosocomiais de *Klebsiella* pertencentes ao sorotipos K1, K2, K4 e K5 são mais virulentas que as do sorotipo K6 e sorotipos acima de K6. Baseado nessas observações e ao fato de ter sido isolado neste trabalho estirpes de *K. pneumoniae* dos sorotipos K4 e K5, sugere-se a utilização de um outro modelo animal, além desses descritos, para melhor caracterizar a patogênese dos isolados *in vivo*.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBESA, I. *Klebsiella pneumoniae* haemolysin adsorption to red blood cells. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 67, p. 263-266. 1989.
- ALBESA, I., BARBERIS, L. I., PAJARO, C., FARNOCHI, M. C., ERASO, A. J. A thiol-active hemolysin in Gram-negative bacteria. **Can. J. Microbiol.**, v.31, p. 297-300. 1985.
- ALBESA I., ERASO. A. J., FRIGERIO, C. I., LUBETKIN, A. M. Hospital outbreak in a care unit for infants, due to *Klebsiella* tribe. **Rev. Arg. Microbiol.**, v. 12, p. 39-43. 1980.
- ARORA, D. R., CHUGH, T. D., VADEHA, D. V. Enterotoxigenicity of *Klebsiella pneumoniae*. **Ind. J. Path. Microbiol.**, v. 26, p. 65-70. 1983.
- ASNANI, P. J., JHANJEE, A. *Klebsiella pneumoniae* enterotoxin. II. Physico-chemical properties of enterotoxin, **Acta. Microbiol., Acad. Aci. Hung.**, v.29, p. 139-145. 1982.
- BENJAMIN, W. H., TURNBOUGH, C. L., POSEY, B. S., BRILES, D. E. The ability of *Salmonella typhimurium* to produce the siderophore enterobactin is not a virulence factor in mouse typhoid. **Infect. Immun.**, v. 50, p. 392-397. 1985.
- BULLEN, J., GRIFFTHS, E., ROGERS, H., WARD, G. Sepsis: the critical role of iron. **Microb. Infect.**, v. 2, p. 409-415. 2000.

- CAMPRUBI, S., TOMAS, J., MUNOA, F., MADRID, C., JUAREZ, A. Influence of lipopolysaccharide on external hemolytic activity of *Salmonella typhimurium* and *Klebsiella pneumoniae*. **Curr. Microbiol.**, v. 20, p. 1-3. 1990.
- CASEWELL, M. W. The epidemiology of *Klebsiella aerogenes* in an intensive care unit. **Res. Clin. Forums**, 1, 101. 1977.
- COFFEY, A., ROMBOUTS, F. M., ABEE, T. Influence of environmental parameters on phosphatidylcholine phospholipase C production in *Listeria monocytogenes* from other *Listeria* species. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.62, p. 1252-1256. 1996.
- CRUZ, C.D. **Programa GENES** - aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa, MG: UFV, 1997. 442 p.
- CRUZ, C.D., REGAZZI, A.J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, Minas Gerais. 1994.
- DARFEUILLE-MICHAUD, A., JALLAT, C., AUBEL, D., SIROT, D., RICH, C., SIROT, J., JOLY, B. R-plasmid-encoded adhesive factor in *Klebsiella pneumoniae* strain responsible for human nosocomial infections. **Infect. Immun.**, v. 60, p. 44-45. 1992.
- DI MARTINO, P., LIVRELLI, V., SIROT, D., JOLY, B., DARFEUILLE-MICHAUD. A new fimbrial antigen harbored by CAZ-5/SHV-4- producing *Klebsiella pneumoniae* strains involved in nosocomial infection. **Infect. Immun.**, v. 64, p. 2266-2273. 1996.
- EDWARDS, R. A., PUENTE, J. L. Fimbrial expression in enteric bacteria: a critical step in intestinal pathogenesis. **Trends in Microbiology**, v.6, p.282-287. 1998.
- FADER, R. C., GONDESEN, K., TOLLEY, B., RITCHIE, D. G., MOLLER, P. Evidence that in vitro adherence of *Klebsiella pneumoniae* to ciliated hamster tracheal cells is mediated by type 1 fimbriae. **Infect. Immun.**, v.56, p.3011-3013. 1988.
- FAVRE-BONTES, S., DARFEUILLE-MICHAUD, A., FORESTIER, C. Aggregative adherence of *Klebsiella pneumoniae* to human Intestine-407 cells. **Infect. Immun.**, v. 63, p. 1318-1328. 1995.
- FAVRE-BONTES, S., JOLY, B., FORESTIER, C. Consequences of reduction of *Klebsiella pneumoniae* capsule expression on interactions of this bacterium with epithelial cells. **Infect. Immun.**, v. 67, p. 554-561. 1999.

- GALES, A. C. **Prevalência, sensibilidade a antimicrobianos e tipagem molecular de amostras de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de beta lactamases de espectro ampliado.** São Paulo, SP: EPM, 1997. 132p. Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas e Parasitárias) - Escola Paulista de Medicina, 1997.
- GIANELLA, R. A. 1976. Suckling mouse model for detection of heat-stable *Escherichia coli* enterotoxin: characteristics of the model. **Infect. Immun.**, v.14, p. 95-99.
- HARRIGAN, W. F., McCANCE, M. E. **Laboratory methods in food and dairy microbiology.** New York: Academic Press, 1976. 451p.
- HENÁNDEZ-ALLÉS, S., ALBERTÍ, S., ÁLVAREZ, D., et al. Porin expression in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. **Microbiol.**, v. 145, p. 673-679. 1999.
- HORNICK, D. B., ALLEN, B. L., HORN, M. A., CLEG, S. Adherence to respiratory epithelia by recombinant *Escherichia coli* expressing *Klebsiella pneumoniae* type 3 fimbrial gene products. **Infect. Immun.**, v.60, p.1577-1788. 1992.
- JARLIER, V. Enterobactéries et bétalactamases. In: COURVALIN, P.,GOLDSTEIN, F., PHILIPPON, A., SIROT, J. (Eds.) **L`antibiogramme.** Paris: MPC, Videocom., 1985.
- JONES, G. W., ISAACSON, A. Proteinaceous bacterial adhesins and their receptors. **Crit. Rev. Microbiol.**, v.10, p. 229-260. 1983.
- KABHA, K., NISSIMOV, L., ATHAMNA, A., et al. Relationships among capsular structure, phagocytosis, and mouse virulence in *Klebsiella pneumoniae*. **Infect. Immun.**, v. 63, p. 847-852. 1995.
- KAUR, J., KAUL, M., CHHIBBER, S. Enterotoxigenicity, klebocinogeny and antibiotic resistance pattern of food isolates of *Klebsiella pneumoniae*. **Folia Microbiol.**, v. 33, p. 500-506. 1988.
- KLIPSTEIN, F. A., ENGERT, R. F., HOUGHTEN, R. A. Immunological properties of purified *Klebsiella pneumoniae* heat-stable enterotoxin. **Infect. Immun.**, v.42, p. 838-841. 1983.
- LÁZARO, N. S., FARIAS, R. S., RODRIGUES, D. P., HOFER, E. *Enterobacteriaceae* oriundas de fontes humana e animal: produção de enterotoxina termoestável e nível de resistência a antimicrobianos. **Hig. Alim.**, v.13, p. 49-57. 1999.

- LIVRELLI, V., DE CHAMPS, C., DI MARTINO, P., DARFEUILLE-MICHAUD, FORESTIER, C., JOLY, B. Adhesive properties and antibiotic resistance of *Klebsiella*, *Enterobacter*, and *Serratia* clinical isolates involved in nosocomial infections. **J. Clin. Microbiol.**, v. 34, p. 1963-1969. 1996.
- LE ROY, D. CROUZIER, C., DHO-MOULIN, M., DUMONT, A. S., BOUCHET, A., LAFONT, J. P., ANDREMONT, A. Results of passive and active immunization directed against ferric aerobactin in experimental enterobacterial infections in mice and chickens. **Res. Microbiol.**, v. 146, p.167-174. 1995.
- MARTINEZ, J. L., CERCENADO, E., BAQUERO, F., PÉREZ-DÍAZ, J. C. e DELGADO-IRIBARREN, A. Incidence of aerobactin production in Gram-negative hospital isolates. **Appl. Microbiol.** v. 28, p. 351-353. 1987
- MARTINO, P., SIROT, D., JOLY, B., RICH, C., DARFEUILLE-MICHAUD, A. Relationship between adhesion to intestinal Caco-2 cells and multidrug resistance in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates. **J. Clin. Microbiol.**, v.35, p. 1499-1503. 1997.
- MATATOV, R., GOLDHAR, J., SKUTELSKY, E., SECHTER, I., PERRY, R., PODSCHUN, R., SAHLY, H., THANKAVEL, K., ABRAHAM, S. N., OKEK, I. Inability of encapsulated *Klebsiella pneumoniae* to assemble functional type 1 fimbriae on their surface. **FEMS Microbiol. Letters**, v.179, p. 123-130. 1999.
- NASSIF, X., FOURNIER, J. M., ARONDEL, J., SANSONETTI, P. J. Mucoid phenotype of *Klebsiella pneumoniae* is a plasmid-encoded virulence factor. **Infect. Immun.**, v. 57, p. 546-552. 1989.
- NASSIF, X., SANSONETTI, P. J. Correlation of the virulence of *Klebsiella pneumoniae* K1 and K2 with the presence of a plasmid encoding aerobactin. **Infect. Immun.**, v. 54, p. 603-608. 1986.
- NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS). **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing.** M100-S9 1 (19), 1999.
- OELSCHLAEGER, T. A., TALL, B. D. Invasion of cultured human epithelial cells by *Klebsiella pneumoniae* isolated from the urinary tract. **Infect. Immun.**, v. 65, p. 2950-2958. 1997.
- PODSCHUN, R. Phenotypic properties of *Klebsiella pneumoniae* and *K. oxytoca* isolated from different sources. **Zentbl. Hyg. Umweltmed.**, v.189, p.527-535. 1990.

- PODSCHUN, R., ULLMANN, U. *Klebsiella* capsular type K7 in relation to toxicity, susceptibility to phagocytosis and resistance to serum. **J. Med. Microbiol.**, v. 36, p. 250-254. 1992.
- PODSCHUN, R., ULLMANN, U. *Klebsiella* spp. As nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 11, p. 589-603. 1998.
- PODSCHUN, R., FISCHER, A., ULLMANN, U. Characterization of *Klebsiella terrigena* strains from humans: haemagglutinins, serum resistance, siderophore synthesis, and serotypes. **Epidemiol. Infect.**, v. 125, p. 71-78. 2000.
- PODSCHUN, R., PIETSCH, S., HOLLER, C., ULLMANN, U. Incidence of *Klebsiella* species in surface waters and their expression of virulence factors. **Appl. Environm. Microbiol.**, v. 67, p. 3325-3327. 2001.
- REED, L., MUENCH, H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. **Am. J. Hyg.**, v. 27, p. 493-497. 1938.
- REISSBRODT, R., RABSCH, W. Further differentiation of *Enterobacteriaceae* by means of siderophore-pattern analysis. **Zentbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. Ser. A**, v. 268, p. 306-317. 1988.
- SIMOONS-SMIT, A. M., VERWEIJI-VAN VUGHT, A. M. J. J., KANIS, L. Y. R., MACLAREN, D. M. Virulence of *Klebsiella* strains in experimentally induced skin lesions in the mouse. **J. Med. Microbiol.**, v. 17, p. 67-77. 1984.
- SIMOONS-SMIT, A. M., VERWEIJI-VAN VUGHT, A. M. J. J., MACLAREN, D. M. The role of K antigens as virulence factors in *Klebsiella*. **J. Med. Microbiol.**, v. 21, p. 133-137. 1986.
- SINGH, B.R., SHARMA, V. D., CHANDRA, R. Detection, prevalence, purification and characterization of lecithinase de *Klebsiella pneumoniae*. **Indian. J. Exp. Biol.**, v. 7, p. 925-932. 1999.
- TARKKANEN, A. M., ALLEN, B., WESTERLUND, B. et al. Type V collagen as target for type-3 fimbriae, enterobacterial adherence organelles. **Mol Microbiol.**, v. 4, p. 1353-1361. 1990.
- TARKKANEN, A. M., VIRKOLA, R., CLEGG, S., KORHONEN. Binding of the type 3 fimbriae of *Klebsiella pneumoniae* to human endothelial and urinary bladder cells. **Infec. Immun.**, v. 65, p. 1546-1549. 1997.

- VERNET, V., MADOULET, C., CHIPPAUX, C., PHILIPPON, A. Incidence of two virulence factors (aerobactin and mucoid phenotype) among 190 clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum β - lactamase. **FEMS Microbiol. Letters**, v. 96, p. 1-6. 1992.
- VERNET, V., PHILIPPON, C., MADOULET, C. et al. Virulence factors (aerobactin and mucoid phenotype) in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* blood culture isolates. **FEMS Microbiol. Letters**, 130: 51-57. 1995.
- WADSTROM, T. A. AUST-KETTIS, A., HABTE, D. et al. Enterotoxin producing bacteria and parasites in stools of Ethiopian children. **Arch. Dis. Child.**, v. 51, p. 865-870. 1976.
- WATANABE, H., HASHIMOTO, H., TANAKA, T., MITSUHASHI, S. Different patterns of drug resistance and R plasmids between indole-positive and -negative strains of *Klebsiella pneumoniae*. **Microbiol. Immunol.**, v.24, p. 169-171. 1980.
- WILLIAMS, P. H. Novel iron uptake system specified by Col V plasmids: an important component in the virulence of invasive strains of *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 26, p. 925-932. 1989.
- WILLIAMS, P., CHART, H., GRIFFITHS, E., STEVENSON, P. Expression of high affinity iron uptake by clinical isolates of *Klebsiella*. **FEMS Microbiol. Letters**, v. 44, p. 407-412. 1987.
- WILLIAMS, P., LAMBERT, P. A., BROWN, M. R. W., JONES, R. J. The role of the O and K antigens in determining the resistance of *Klebsiella aerogenes* to serum killing and phagocytosis. **J. Gen. Microbiol.**, v. 129, p. 2181-2191. 1983.
- WILLIAMS, P., TOMAS, J. M. The pathogenicity of *Klebsiella pneumoniae*. **Rev. Med. Microbiol.**, v, 1, p. 196-204. 1990.
- WÜRKER, M., BEUTH, J., KO, H. L., PRZONDO-MODARSKA, A. Types of fimbriation determines adherence of *Klebsiella* bacteria to human epithelial cells. **Zentbl. Bakteriol.**, v.274, p. 239-245. 1990.
- YANCEY, R. J., BREEDING, S. A. L., LANKFORD, C. E. Enterochelin (enterobactin): virulence factor for *Salmonella typhimurium*. **Infect. Immun.**, v. 24, p. 174-180. 1979.

YIGIT H., QUEENAM, A. M., ANDERSON, G. J., DOMENECH-SANCHEZ A., BIDDLE, J. W., STEWARD, C. D., ALBERTI, S., BUSH, K. TENOVER, F. C. Novel carbapenem-hydrolyzing β -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimic. Agents. Chemot.**, v. 45, p. 1151-1161. 2001.

CAPÍTULO 3

PATOGENICIDADE DE ISOLADOS DE *Klebsiella* sp. EM CAMUDONGOS

1. INTRODUÇÃO

Klebsiella é considerada um patógeno oportunista capaz de causar infecções em pessoas de grupos de riscos que incluem neonatos, idosos, portadores de doenças neoplásicas, cardíacas e, ou renais crônicas; ou de doenças de bases específicas como diabetes *mellitus*, doença pulmonar obstrutiva crônica ou alcoolismo (DOMENICO et al., 1982; 1989; CARPENTER, 1990). Essas infecções são mais freqüentes em ambiente hospitalar onde ocorrem com riscos maiores de letalidade, principalmente, em razão de terapias intensivas a base de drogas imunodepressoras (corticóides), de antibióticos e a exposição a um maior número de fontes de contaminação (BERG, 1983; BERG et al., 1988; FINLAY e FALKOW, 1989).

Embora exista a constatação de que dietas enterais estão freqüentemente contaminadas com *Klebsiella* (SCHOOTER et al., 1971; CASEWELL et al.,

1978; MONTGOMERIE, 1979; COOKE et al., 1980; THURN et al., 1990; COSTA et al., 1998; ARIAS et al., 1998; OKUMA et al., 2000), o envolvimento desses alimentos especiais na epidemiologia de infecções hospitalares é pouco considerado.

A avaliação do potencial patogênico de isolados clínicos e ambientais de *Klebsiella*, geralmente, envolve a presença de fatores de virulência, como presença e tipo de cápsula, fimbrias, resistência ao soro, produção de enterotoxinas e de sideróforos. Entretanto, deve-se considerar que a patogênese bacteriana é complexa e dependente de vários fatores de ativação e resposta do hospedeiro (FINLAY e FALKOW, 1989). A expressão do fenótipo virulento é, portanto, dependente das condições ambientais e pode ser melhor avaliada com a condução de estudos *in vivo*.

A translocação de bactérias inoculadas por via oral em cobaias é um procedimento proposto para se estudar *in vivo* a virulência de patógenos, especialmente aqueles veiculados por alimentos. Essa metodologia tem como critério de virulência, a capacidade bacteriana de ultrapassar a barreira da mucosa intestinal e causar infecção em órgãos vitais (LAMMEDING et al., 1992).

Estudos epidemiológicos mostraram que infecções hospitalares por *K. pneumoniae* são precedidas por colonização no trato intestinal (DE CHAMPS et al., 1989). Nesses pacientes, bactérias podem-se translocar do lúmen intestinal para a corrente sanguínea, causando infecções sistêmicas graves.

A translocação da microbiota autóctone ou da proveniente de alimentos pode ser facilitada em pacientes que apresentam comprometimento no sistema imunológico, seja por doenças graves ou por uso de medicação. BERG (1983) constatou que as drogas ciclofosfamida e prednisona foram as mais efetivas em propiciar a translocação da microbiota autóctone de camundongos, sendo *K. pneumoniae* uma das bactérias que apresentaram uma maior translocação. A translocação de bacilos Gram-negativos entéricos em camundongos foi aumentada pela administração de uma combinação de antibiótico e droga imunodepressora, via oral, e resultou em septicemia, quando esse tratamento combinado foi prolongado (BERG et al., 1988).

Com o objetivo de avaliar o potencial que isolados de *Klebsiella* provenientes de dietas enterais têm para infectar órgãos vitais do hospedeiro, verificou-se a translocação de seis estirpes inoculadas, via oral, em camundongos normais e imunodeprimidos .

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Origem e manutenção das culturas

As estirpes de *Klebsiella* spp. foram obtidas de amostras de dietas enterais provenientes de dois hospitais da Zona da Mata Norte (MG). Foram selecionados seis isolados, representativos de cada grupo gerado pelas análises de polimorfismo de fragmentos de DNA amplificadas ao acaso (RAPD) e de polimorfismo da região espaçadora do rDNA. Nesta seleção, foram também considerados os dados de sorotipagem, aspecto mucóide das colônias e antibiograma, para os isolados de *K. pneumoniae* (Quadro 1, Capítulo 1 e Quadro 3, Capítulo 2). Os isolados selecionados foram: P4, P14, P15, U4, U5 e U8. O isolado P4 foi identificado como *K. oxytoca* e os demais, como *K. pneumoniae*. As culturas foram mantidas congeladas a -18°C em caldo Tripticaseína e soja-TSB e glicerol, e foram descongeladas em temperatura ambiente e ativadas em TSB.

Quadro 1 - Características dos isolados de *Klebsiella*, provenientes de dietas enterais e selecionados para os estudos de translocação

N ^o	Espécie	Isolado	Sorogrupo	Padrão RAPD	Padrão PCR rDNA 16-23S	Aspecto mucóide	Antibiotipo
1	K. oxytoca	P4	-	I	I	++	I
2	<i>K. pneumoniae</i>	P14	Nd	IA	IA	++	X
3	<i>K. pneumoniae</i>	P15	Nd	IIA	IIA	+++	III
4	<i>K. pneumoniae</i>	U4	Nd	B	IB	++++	V
5	<i>K. pneumoniae</i>	U5	K4	B	IB	++	I
6	<i>K. pneumoniae</i>	U8	K5	B	IIB	++	IX

2.2. Concentrado de células viáveis de *Klebsiella*

Os isolados de *Klebsiella* foram ativados em 200 mL de TSB a 37°C, por 24 horas e coletados por centrifugação a 5.000 g, por 15 minutos. As células de cada cultura foram ressuspendidas em 2mL de dieta enteral (ENSURE[®], Abbott) sabor baunilha, preparada como recomendado pelo fabricante em água esterilizada. Alíquotas dessa dieta contaminada foram diluídas e plaqueadas em ágar Trypticaseína e soja-TSA, para o contagem do número de células viáveis por mililitro de dieta. Todos os seis concentrados celulares de *Klebsiella* foram reunidos em um único recipiente e o volume completado para 20 mL, obtendo-se uma suspensão contendo cerca de 10¹⁰ UFC por mL, de cada isolado.

2.3. Origem e manutenção dos animais

Foram utilizados camundongos albinos suíços, com 5 a 6 semanas de idade e pesando de 22 a 26g, obtidos no Laboratório de Imunologia e Virologia Molecular do Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de

Viçosa. Os camundongos foram divididos aleatoriamente, em grupos de 30 animais e mantidos em gaiolas desinfetadas, à temperatura ambiente de cerca de 25⁰C.

2.4. Delineamento experimental

A experimentação foi dividida em sete tratamentos e conduzida em uma única repetição.

O grupo basal, tratamento I, consistiu de seis camundongos que receberam apenas dieta AIN-93G, ração destinada a camundongos, durante duas semanas do experimento. Após este período, foram sacrificados para análise da presença de *Klebsiella* endógena no fígado, coração, baço, rins e pulmão.

O grupo controle ou tratamento II foi constituído de 30 animais que receberam, por via oral, apenas a dieta enteral Ensure®, durante o tempo da experimentação.

Os tratamentos III a VI constituíram os grupos testes, cada qual composto por 30 camundongos que tiveram livre acesso a dieta enteral Ensure®. Os camundongos do Tratamento III receberam apenas a dieta enteral, enquanto que os do tratamento IV receberam, por via oral, 10mg/kg/dia de prednisona, os do tratamento V receberam 200mg/kg/dia de carbenicilina e os do tratamento VI receberam uma combinação do corticóide com o antibiótico, nas concentrações citadas anteriormente.

Os camundongos do tratamento VII receberam uma combinação de prednisona e carbenicilina, nas mesmas condições do tratamento VI mas não receberam a dieta inoculada com a mistura de *Klebsiella* e consistiu de um segundo grupo controle.

Após quatro dias do início da administração do corticóide e do antibiótico, todos camundongos dos grupos testes (III, IV, V e VI) receberam, via oral, 100µL da dieta enteral contaminada com *Klebsiella*. Apenas o antibiótico

carbenicilina continuou a ser administrado, na dose diária de 200mg/kg/dia, até o final do experimento.

2.5. Determinação da translocação de *Klebsiella* para os diferentes órgãos

No período de tempo equivalente a 1, 2, 4, 6 e 9 dias após a administração da mistura de *Klebsiella* via oral, seis animais dos tratamentos II a VII foram sacrificados, por deslocamento nugal e seus órgãos: baço, coração, fígado, pulmão e rins, foram coletados, pesados e armazenados em sacos plásticos estéreis de polietileno (Whirl-Pak, Millipore). Uma porção equivalente a metade de cada órgão foi destinada a determinação analítica de *Klebsiella*, enquanto outra metade foi acondicionada em solução contendo 10% de formol neutro, para estudos histopatológicos.

No nono dia também foi realizada a contagem de colônias típicas de *Klebsiella* do trato intestinal de cada grupo de animais submetidos aos tratamentos de II a VII.

Para a contagem de colônias típicas de *Klebsiella*, os órgãos foram macerados (MACÍAS et al., 1992) e diluições apropriadas foram preparadas e plaqueadas em ágar seletivo MacConkey-Inositol-Carbenicilina (Merck), seguido de incubação a 37⁰C, por 48 horas (BAGLEY e SEIDLER, 1978). Foram selecionadas de 3 a 5 colônias típicas de cada grupo do mesmo órgão, a cada tempo de amostragem, para análise do perfil genético por RAPD. O resultado foi expresso em UFC de *Klebsiella* por grama do órgão e considerou-se contagem significativa, somente as placas com número de colônias acima de 20.

2.6. Caracterização genética dos isolados obtidos nos diferentes órgãos

Com o objetivo de identificar quais os isolados, administrados via oral, translocaram do intestino para os órgãos analisados, fez-se a comparação, com base no marcador molecular RAPD, entre as estirpes de *Klebsiella* que foram

inoculadas e aquelas isoladas dos órgãos. O DNA total dos isolados de *Klebsiella* administrados aos animais e dos isolados dos órgãos foi extraído de acordo com a metodologia descrita por BINGEN et al. (1991).

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados foram OPD03, OPD18 e OPD20 (Operon Technologies Inc. Alameda, CA, EUA) e o programa utilizado nas ampliações está descrito no Capítulo 1.

2.7. Histopatologia

As análises histopatológicas foram conduzidas no Laboratório de Patologia do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa. Foram colhidos fragmentos de pulmões, rins, fígado, baço e coração, fixados em formol neutro a 10%, processados segundo técnicas rotineiras em histopatologia, corados pela hematoxilina-eosina e examinados ao microscópio óptico.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Determinação analítica de *Klebsiella* sp. em diferentes órgãos de camundongos

No fígado, baço, coração, rim e pulmão dos camundongos do grupo basal (tratamento I) e no controle 1 (tratamento II) não se observou a presença de colônias típicas de *Klebsiella* em meio seletivo McConkey-Inositol-Carbenicilina. Esses resultados sugerem que, em hospedeiro com o sistema imunológico apto representado pelos camundongos dos tratamentos I e II, não inoculados e não submetidos ao tratamento com medicação imunodepressora, *Klebsiella* presente no intestino, não foi capaz de translocar para outros órgãos. Segundo BERG e CARLINGTON (1979), a microbiota autóctone gastrointestinal pode não ser normalmente encontrada em sítios extraintestinais de camundongos livres de patógenos específicos (LPE) ou gnotobióticos.

Em amostras de órgãos como fígado e pulmões dos camundongos do grupo controle 2 (tratamento VII) e grupos testes (tratamentos III a VI) constatou-se a presença de bactérias que apresentaram colônias típicas de *Klebsiella* (Figura 1). A presença de *Klebsiella* no fígado foi constatada nas amostras coletadas 5 e 6 dias após o início da medicação com a combinação das drogas prednisona e carbenicilina naqueles animais que não receberam a dieta

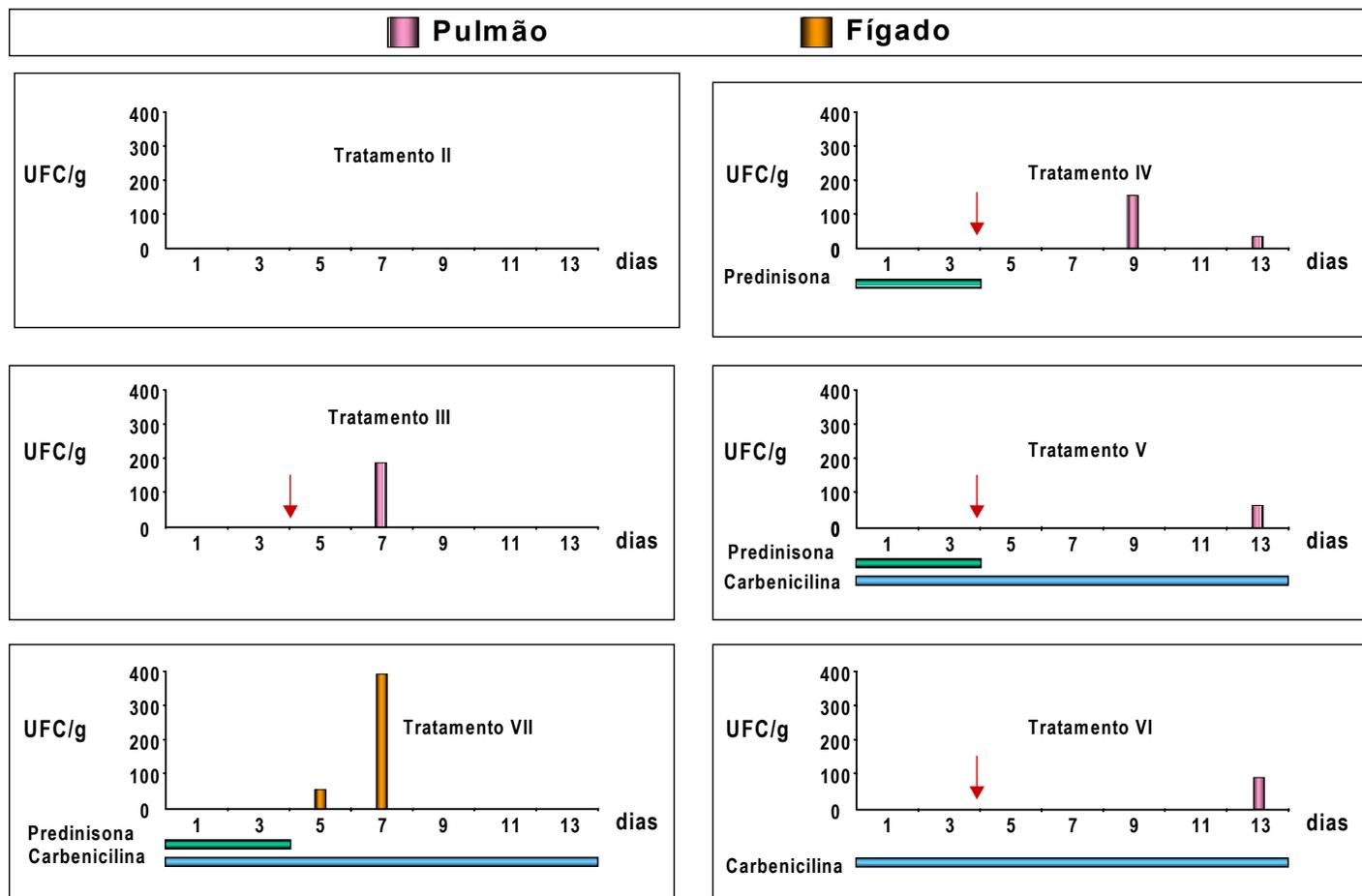


Figura 1 - Contagem de *Klebsiella* em órgãos de camundongos submetidos a diferentes tratamentos. As setas em vermelho indicam o dia da inoculação da mistura das estirpes de *Klebsiella* sp. Os tratamentos estão descritos em material e métodos.

enteral contaminada com isolados de *Klebsiella* (tratamento VII). A análise do perfil genético, pela técnica de RAPD, desses contaminantes não detectou similaridade com os padrões de bandas de DNA, das estirpes de *Klebsiella* administradas oralmente aos animais (Figura 2). Este resultado indica que, estirpes da microbiota intestinal autóctone foram capazes de translocar quando houve uma depressão do sistema imunológico e uma descontaminação seletiva, promovida pelo antibiótico. Estes resultados reforçam a constatação de BERG (1983) de que *K. pneumoniae* constitui uma das espécies bacterianas que mais translocam a partir do trato intestinal, em camundongos submetidos ao tratamento com prednisona e outros compostos imunodepressores. Além de *Klebsiella*, esses autores detectaram que *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis* e *Enterococcus faecalis* também apresentaram um índice elevado de translocação. Essas bactérias, coincidentemente, são espécies bacterianas que causam, em maiores proporções, septicemia em pacientes debilitados (STEFFEN et al., 1988).

A participação da carbenicilina no processo de translocação foi também relatada por BERG (1980), que constatou a translocação bacteriana para diferentes órgãos, quando o balanço ecológico do trato gastrointestinal foi alterado por antibióticos, que permitiram que, microrganismos resistentes, geralmente presentes em pequenos números, aumentassem sua população resultando em vários tipos de infecções. Em camundongos tratados com uma combinação de drogas imunodepressoras e antibióticos, via oral, as bactérias autóctones translocaram para a cavidade peritoneal e atingiram órgãos vitais como o fígado (BERG et al., 1988). Além disso, esses autores observaram que a extensão do tratamento com essas duas drogas por 12 dias causava morte dos camundongos com septicemia após o oitavo dia de administração, mostrando que a combinação de um maior crescimento bacteriano seletivo no intestino, promovido pelo uso de antibióticos, associado a imunodepressão do hospedeiro, decorrente do uso de corticóide, sinergisticamente, promove translocação bacteriana à partir do trato gastrointestinal, podendo levar a um quadro grave de

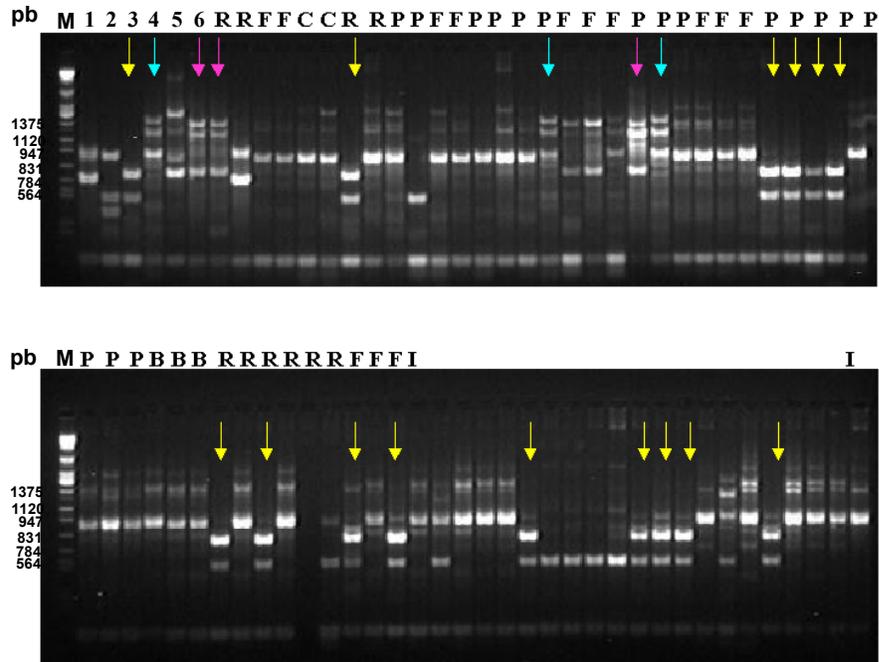


Figura 2 - Eletroforese em gel de agarose de DNA total amplificado por RAPD, utilizando o oligonucleotídeo iniciador OPD20. Números de 1 a 6 correspondem aos isolados de *K. pneumoniae* que foram administrados aos camundongos. Os isolados estão descritos no Quadro 1. As letras R, C, P, B, F e I, representam respectivamente, rins, coração, pulmão, baço, fígado e intestino. Marcador de tamanho de fragmentos de DNA (pb) está indicado pela letra M (DNA do fago λ , digerido com as enzimas *Hind*III, *Ban*HI e *Eco*RI). As setas de mesma cor indicam que os isolados possuem o mesmo padrão de bandas RAPD. Os números III, IV e VII, referem-se aos tratamentos recebidos pelos animais, dos quais os isolados foram obtidos. Os tratamentos estão descritos em material e métodos.

septicemia. Uma explicação possível para a ação combinada desses medicamentos facilitando a translocação de bactérias intestinais autóctone, foi dada por O'BOYLE et al. (1998), que atribuíram ao aumento da permeabilidade da mucosa intestinal, deficiências na imunidade do hospedeiro e desequilíbrio da microbiota intestinal.

A constatação de que o fígado foi o órgão que apresentou maior número de contaminantes típicos de *Klebsiella* (Figura 1) pode ser atribuído ao grande

número de bactérias que passa da mucosa intestinal para o sistema porta, passando, necessariamente, pelos seios hepáticos antes de alcançar a circulação sistêmica (GUITON, 1988). A presença de *Klebsiella* no fígado dos animais analisados não foi constante nos diferentes tempos de amostragem, sugerindo a dificuldade da instalação de um processo infeccioso. É provável que, uma vez atingido o fígado, essas bactérias tenham sido eliminadas por fagocitose pelas células Kupffer (GUITON, 1988). Aquelas bactérias que translocaram e que não foram retidas nas duas primeiras linhas de defesa do organismo, quais sejam, o fígado e o baço, podem ter atingido a circulação sanguínea porta e alcançado outros órgãos, como o pulmão.

A presença de *Klebsiella* foi confirmada nos pulmões de animais dos grupos testes, ou seja, naqueles grupos cujos animais receberam a dieta contaminada com a mistura de seis estirpes de *Klebsiella* (Figura 1). Nos animais que receberam prednisona e, ou carbenicilina, a constatação de *Klebsiella* nos pulmões foi feita após o 4º dia de inoculação enquanto nos animais que não receberam a medicação, foi possível contar colônias típicas de *Klebsiella* nas amostras após dois dias da inoculação (Figura 1). A análise do polimorfismo de isolados recuperados desse órgão por RAPD revelou similaridades com os padrões de bandas de DNA das estirpes de *Klebsiella* administradas oralmente aos animais, no tratamento III e IV (Figura 2).

A presença de *Klebsiella* em pulmões de camundongos que não receberam nenhuma medicação pode ser atribuída a um desequilíbrio da microbiota intestinal normal. De acordo com MACIÁS et al. (1992), fatores como, dietas contaminadas e mudanças ambientais podem resultar em desequilíbrio da microbiota intestinal e reduzir a resistência a colonização por bactérias exógenas. Isto frequentemente, capacita bactérias exógenas a se multiplicar, sendo uma das principais causas de infecções por bactérias oportunistas.

A presença de bactérias exógenas em resposta a uma alteração imunológica, como verificada no pulmão de camundongos submetidos ao tratamento IV (prednisona), foi também observada por GIANOTTI et al. (1996). Esses autores sugeriram que a terapia com o esteróide prednisona pode modular a

função da barreira do intestino, defesa do hospedeiro e sobrevivência nos camundongos injuriados e que há uma maior translocação de bactérias entéricas exógenas para órgãos vitais. Uma provável explicação para o efeito de corticoesteróides como facilitadores da translocação de bactérias exógenas para sítios extraintestinais foi apresentada por ALVERDY e AOYS (1991) ao demonstrarem que o tratamento com corticoesteróides reduz significativamente o nível de IgA secretório no intestino. Essas imunoglobulinas envolvem bactérias exógenas entéricas e reduzem a aderência do microrganismo na mucosa intestinal. Esses autores também verificaram maior recuperação de *E. coli* de tecidos em camundongos tratados com prednisona. Outra observação sobre o efeito da prednisona a translocação foi feita por JONES et al. (1991), que relacionaram a elevação do nível de corticóides em camundongos com a presença prolongada de bactérias exógenas nos tecidos. Além disso, esses autores observaram que prednisona aumenta a aderência dessas bactérias em células intestinais, facilitando a sua translocação e reduz a capacidade do hospedeiro em eliminar a bactéria translocada, permitindo sua sobrevivência.

Verificou-se um aumento na contagem de colônias típicas de *Klebsiella* nas amostras dos intestinos dos animais aos quais foi administrada a mistura de *Klebsiella*, representados pelos camundongos dos tratamentos de IV a VII (Quadro 2). Nota-se que foram os animais pertencentes aos grupos que receberam prednisona e, ou, carbenicilina, sendo que maior contagem foi verificada quando a combinação dos dois medicamentos, juntamente com a mistura de *Klebsiella*, foi administrada aos camundongos (tratamento VI).

A instalação de *Klebsiella* proveniente das dietas enterais no intestino foi, portanto, facilitada quando medicamentos imunodepressores e antimicrobianos foram utilizados. Antibióticos orais e sistêmicos levam a um supercrescimento bacteriano no intestino, pois ocorre descontaminação seletiva que remove determinadas bactérias, incluindo antagonistas, mas leva bactérias resistentes a exercer uma colonização persistente (BERG, 1988). Antibióticos de amplo espectro de ação, além de eliminar os patógenos responsáveis pela doença,

Quadro 2 - Análise da colonização intestinal da mistura de *Klebsiella* nos diferentes tratamentos

Tratamentos	Contagem de <i>Klebsiella</i> UFC/g de intestino	Similaridade de padrão RAPD de DNA com os isolados administrados
II	3,46 x10 ²	*n.c.
III	5,74x10 ²	n.c.
IV	4,46x10 ³	Isolado 3 (P15)
V	2,26x10 ³	n.c.
VI	6,55x10 ⁴	Isolado 3 (P15)
VII	3,87x10 ³	n.c.

* não constatada.

elimina também a microbiota protetora, onde microrganismos oportunistas, geralmente das famílias *Enterobacteriaceae* e *Micrococcus*, aumentam em número, provocando, quase sempre, diarréias (BENGMARK, 1998).

Alguns estudos em humanos foram conduzidos, sugerindo que os resultados de modelos animais, como os obtidos neste trabalho, podem ser aplicados a situações clínicas. Evidências diretas foram obtidas da translocação de *Candida albicans* a partir do trato gastrointestinal de humanos para o sangue e urina de voluntários que ingeriram grandes quantidades de células viáveis (KRAUSE et al., 1969). Bactérias translocadas também têm sido isoladas de linfonodos mesentéricos de pacientes com obstrução intestinal, câncer colo-retal ou doença de Crohns (BERG, 1992).

Conclui-se que três dos isolados de *K. pneumoniae* (P15, U4 e U8) foram capazes de translocar para o pulmão de camundongos testes que receberam a mistura de *Klebsiella*, confirmando assim, maior tropismo desse patógeno por esse órgão. O isolado P15 foi mais freqüentemente encontrado nos pulmões e

além disso, colonizou intestino de camundongos que receberam prednisona e a combinação de prednisona e carbenicilina (tratamentos IV e VI).

3.2. Análises histopatológicas

A análise histopatológica dos fragmentos de pulmões, rins e fígado revelou discreta alteração circulatória, caracterizada por uma hiperemia difusa, sem contudo apresentar fenômenos exsudativos que pudessem caracterizar alterações de natureza inflamatória. As alterações circulatórias observadas, hiperemia, em diferentes fragmentos de tecidos, são altamente subjetivas, isto é, estão presentes em várias patologias de natureza diversa e devido a ação de endotoxinas.

A ausência de elementos que pudessem caracterizar uma reação de natureza inflamatória nos tecidos examinados poderia indicar que os isolados não são patogênicos, ou que estavam em baixas concentrações nos órgãos, ou que o estado imunológico estava apto a conter uma infecção por *Klebsiella*, ou ainda, que o tempo entre a inoculação dessa mistura de bactéria e a análise foi insuficiente para produzir alterações.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVERDY, J., AOYS, E. The effect of glucocorticoid administration on bacteria translocation. **Am. Surg.**, v. 214, p. 719-723. 1991.
- ARIAS, M. L., MONGE, R., RODRÍGUES, J. Presencia de coliformes totales, *Escherichia coli* y *Listeria* sp. em fórmulas enterales. **Arch. Lat. Nut.**, v. 48, p. 68-70. 1998.
- BAGLEY, S. T., SEIDLER, R. J. Primary *Klebsiella* identification with MacConkey-inositol-carbenicilina agar. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.36, p.536-538. 1978.
- BENGMARK, S. Ecological control of the gastrointestinal tract. The role of probiotic flora. **Gut**, v.42, p. 2-7. 1998.
- BERG, R. D. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract of the mice receiving immunosuppressive chemotherapeutic agents. **Curr. Microbiol.**, v.8, p. 285-92. 1983.
- BERG, R. D., CARLINGTON, A. W. Translocation of certain indigenous bacteria from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymph nodes and other organs in a gnotobiotic mouse model, **Infect. Immun.**, v. 23, p.403-411. 1979.
- BERG, R. D. Mechanisms confinding indigenous bacteria to gastrointestinal tract. **The Amer. J. Clin. Nut.**, v.33, p. 2472-2484. 1980.
- BERG, R. D. Translocation and the indigenous gut flora. In: FULLER, R. (Ed.) **Probiotic: the scientific basis**. London: Chapman e Hall, 1992. p. 55-85.

- BERG, R. D., WOMMACK, E., DEITCH, E. A. Immunosuppression and intestinal bacterial overgrowth synergistically promote bacterial translocation. **Arch. Surg.**, v.123, p. 1359-1364. 1988.
- BIGEN, E., DENAMUR, E., LAMBERT-ZECHOVSKY, N., et al. DNA restriction fragment-length polymorphism differentiates crossed from independent infections in nosocomial *Xanthomonas maltophilia* bacteremia. **J. Clin. Microbiol.**, v. 29, p. 1348-1350. 1991.
- CARPENTER, J. L. *Klebsiella* pulmonary infections: Occurrence at one medical center an review. **Rev. Infect. Dis.**, v. 12, p. 672-682. 1990.
- CASEWELL, M., PHILLIPS, I. Food as source of *Klebsiella* species for colonization and infection of intensive care patients. **J. Clin. Pathol.**, v.31, p.841-849. 1978.
- COOKE E. M., SAZEGAR, T., EDMONSON, A. S., BRAYSON, J. C., HALL, D. *Klebsiella* species in hospital food and kitchens: a source of organisms in the bowel of patients. **J. Hyg.**, v. 84, p. 97-101. 1980.
- COSTA, G. P., SILVA, M. L. T., FERRINI, M. T. et al. Estudo comparativo da contaminação microbiana das dietas enterais em sistema aberto e fechado. **J. Bras. Nut. Parent Ent.**, p. 180-188. 1998.
- DE CHAMPS, C., SAUVANT, M. P., CHANAL, C. et al. Prospective survey on colonization and infection caused by expanded-spectrum- β -lactamase-producing members of the family *Enterobacteriaceae* in intensive care unit. **J. Clin. Microbiol.**, v. 27, p. 2887-2890. 1989.
- DOMENICO, P., JOHANSON, W. G., STRAUS, D. C. Lobar pneumoniae in rats produced by clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. **Infect. Immun.**, v.37, p. 327-335. 1982.
- DOMENICO, P., SCHWARTZ, S., CUNHA, B. A. Reduction of capsular polysaccharide production in *Klebsiella pneumoniae* by sodium salicylate. **Infect. Immun.**, v. 57, p. 3778-3782. 1989.
- FINLAY, B. B., FALKOW, S. Common themes in microbial pathogenicity, **Microbiol. Rev.**, v. 53, p. 210-230. 1989.
- GIANOTTI, L., ALEXANDER, J. W., FURUSHIMA, R., PYLES. B. A. Steroid therapy can modulate gut barrier function, host defense, and survival in thermally injured mice, **J. Surg. Res.**, v. 62, p. 53-58. 1996.
- GUYTON, A. C. **Fisiologia humana**, 6^a ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988. 348 p.

- JONES, W. G., BARBER, A. E., KAPUR, S., HAWES, A. J., et al. Pathophysilogic glucocorticoid levels and survival of translocating bacteria. **Arch. Surg.**, v. 126, p. 50-55. 1991.
- KRAUSE, W., MATHEIS, H., WULF, K. Fungaemia and funguria after oral administration of *Candida albicans*, **Lancet.**, v.1, p. 598-599. 1969.
- LAMMEDING, A. M., GLASS, K. A., GENDRON-FITZPATRICK, A., DOYLE, M. P. Determination of the virulence of different strains of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* by oral inoculation of pregnant mice. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 58, p. 3991-4000. 1992.
- MACÍAS, M. E. N., APELLA, M. C., ROMERO, N. C. et al. Inhibition of *Shigella sonnei* by *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus*. **J. Appl. Bacteriol.**, v., 73, p. 407-411. 1992.
- MONTGOMERIE, J. Z. Epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* and hospital-associated infections. **Rev. Infect. Dis.**, v. 1, p. 736. 1979.
- O'BOYLE, C. J., MACFIE, J., MITCHELL, C.J., JONSTONE, D., SAGAR, P., SEDMAN, P. C. Microbiology of bacterial translocation in humans. **Gut**, v.42, p. 29-35. 1998.
- OKUMA, T., NAKAMURA, M., TOTAKE, H., FUKUNAGA, Y. Microbial contamination of enteral feeding formulas and diarrhea, **Appl. Nut. Invest.**, v.16, p. 719-722. 2000.
- SCHOOTER, R. A., FAIERS, M. C., COOKE, E. M., BREADEN, A. L., O'FARRELL, S. M. Isolation of *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Klebsiella* from food in hospital, canteens and schools. **Lancet.**, v. 2, p.390-392. 1971.
- STEFFEN, E. K., BERG, R. D., DEITCH, E. A. Comparison of the translocation rates of various indigenous bacteria from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymph nodes. **J. Infect. Dis.**, v.157, p. 1032-1037. 1988.
- THURN, J., CROSSLEY, K., GERDTS, A., MAKI, M., JHNSON, J. Enteral hyperalimentation as a source of nosocomial infection. **J. Ent. Infec.**, v. 15, p.203-217. 1990.

RESUMO E CONCLUSÕES

Isolados obtidos de dietas enterais artesanais provenientes de dois hospitais da Zona da Mata Norte, (MG) foram identificados, sorotipados, e submetidos a caracterização genética, a avaliação quanto à susceptibilidade a agentes antimicrobianos e a detecção da produção de β -lactamase de espectro ampliado. A expressão de diferentes fatores de virulência, bem como a virulência dos isolados em um modelo animal também foi avaliada. Além disso, determinou-se a translocação de seis isolados de *Klebsiella* administrados, via oral, pela contagem do número de colônias em diferentes órgãos de camundongos submetidos a tratamentos com drogas imunodepressoras e antimicrobianas. O reconhecimento desses isolados como sendo aqueles administrados oralmente aos animais foi feita por RAPD.

Vinte e um isolados de amostras de dietas enterais foram identificados por testes morfo-tintorial e bioquímicos como *Klebsiella*, sendo 15 *K. pneumoniae* e seis *K. oxytoca*. A sorotipagem de *K. pneumoniae* identificou um isolado do sorotipo K4, cinco do sorogrupo K5, e os demais não reagiram com antissoros dos grupos K1 a K6.

A análise por RAPD dos isolados de *K. pneumoniae* geraram 31 fragmentos de DNA polimórficos e dois monomórficos. O agrupamento de *K. pneumoniae* com base nas distâncias genéticas, que variaram de 0 a 73,9%,

revelou três grupos distintos: grupos 1 e 2 contendo isolados obtidos no hospital A e o grupo 3 constituído pelos isolados do hospital B. A utilização de oito oligonucleotídeos iniciadores geraram nove fragmentos de DNA polimórficos e 16 monomórficos para os isolados de *K. oxytoca*. A distância genética variou de 2,4 a 20% com a divisão dos isolados em três grupos relacionados.

O polimorfismo maior entre os isolados de *K. pneumoniae* foi confirmado pela análise da região espaçadora 16S-23S do rDNA que resultou em três fragmentos monomórficos e cinco fragmentos polimórficos. As distâncias genéticas variaram de 0 a 45% e esses isolados foram separados em dois grupos: grupo I contendo isolados do hospital B e grupo II contendo isolados de ambos os hospitais. Além disso, pode-se também observar que o grupo II foi dividido em dois subgrupos: subgrupo I contendo isolados do hospital A e o subgrupo II contendo isolados de ambos os hospitais.

A correlação de Pearson entre os dados obtidos na análise por RAPD e na análise por PCR da região espaçadora do rDNA mostrou um coeficiente de 0,34 ($p < 0,05$). Embora essa correlação não tenha sido elevada, observou-se a tendência dos grupos formados pela análise RAPD corresponderem a grupos de isolados de mesmo genótipo na análise da região espaçadora.

O fragmento de DNA de 1420 pb, gerado pela amplificação da região 16S do rDNA, foi digerido por oito endonucleases de restrição, sendo observado o mesmo padrão RFLP para todos os 21 isolados. As análises por RAPD e por PCR da região espaçadora do rDNA mostraram-se apropriadas para avaliar a diversidade genética entre estes isolados.

Todos os isolados de *Klebsiella* apresentaram resistência aos antibióticos amoxicilina e ampicilina enquanto os percentuais de resistência para os demais antibióticos avaliados foram de 38,1% para ácido nalidíxico e aztreonam, 33,3% para cefotaxima, 28,6% para amoxicilina associada a ácido clavulânico, 23,8% para tetraciclina, 14,3% para Kanamicina e neomicina e 4,8% para amicacina, ceftazidima e ticarcilina associada a ácido clavulânico.

Observou-se que a frequência de aspecto mucóide das colônias entre os isolados foi baixa (23,8%) e a presença de cápsula foi verificada,

microscopicamente, somente entre os isolados que apresentaram aspecto mucóide.

A adesão e invasão dos isolados foram observadas, predominantemente, em células Caco-2 e HEp-2. Comparando a capacidade de adesão dos isolados entre as linhagens de células epiteliais humanas analisadas neste trabalho, constatou-se que, para a maioria dos isolados, as maiores taxas foram observadas em células Caco-2. Além disso, pode-se verificar que os isolados que apresentaram aspecto mucóide tiveram menores taxas de adesão nessas células. Apenas os isolados da espécie *K. pneumoniae* apresentaram adesão e invasão, expressivas, nas células HEp-2.

Nas condições usadas neste estudo não foram constatadas a atividade de hemolisina, de fosfolipases e a produção de enterotoxina termoestável, assim como do sideróforo aerobactina pelos isolados de *Klebsiella*.

A inoculação intraperitoneal de camundongos saudáveis e imunodeprimidos com isolados selecionados de *Klebsiella* para a determinação da DL₅₀ não determinou a morte dos animais e demonstrou que os isolados avaliados foram avirulentos.

Quando camundongos foram somente alimentados com dieta enteral ou ração não se observou a presença de colônias típicas de *Klebsiella* na análise do fígado, baço, coração, rim e pulmão desses animais que faziam parte do grupo controle e basal. Este resultado sugeriu que, em hospedeiros não imunodeprimidos *Klebsiella*, presente no intestino, não foi capaz de translocar para outros órgãos. Entretanto, em amostras de fígado e pulmão dos camundongos do grupo controle 2 (tratamento VII) e grupos testes (tratamentos III a VI), que receberam as drogas prednisona e carbenicilina, de forma combinada ou não e/ou a mistura de seis estirpes de *K. pneumoniae*, a presença de colônias típicas de *Klebsiella* foi constatada em órgãos analisados. A presença de *Klebsiella* administrada na dieta enteral foi confirmada no pulmão de animais dos grupos testes por meio da análise do perfil genético de isolados recuperados desse órgão.

A translocação de *Klebsiella* presente na dieta enteral para outros órgãos pode ser atribuída à presença do imunodepressor prednisona, o qual pode modular a função da barreira do intestino e a defesa do hospedeiro, e a um desequilíbrio da microbiota intestinal normal, permitindo que células em excesso fossem translocadas.

A presença de *Klebsiella* no fígado de camundongos que não receberam fonte exógena de *Klebsiella*, mas que foram tratados com a combinação das drogas imunodepressora e antimicrobiana sugere que estirpes da microbiota intestinal autóctone foram capazes de translocar quando houve uma imunodepressão e uma descontaminação seletiva, promovidas pelo corticóide e antibiótico, respectivamente.

Verificou-se um aumento na contagem de *Klebsiella* nas amostras dos intestinos dos animais que receberam a dieta contaminada com *Klebsiella*, sendo que, a maior contagem foi verificada nos animais que receberam a combinação dos dois medicamentos. A colonização de *Klebsiella* proveniente das dietas enterais no intestino foi, portanto, facilitada quando medicamentos imunodepressor e antimicrobiano foram utilizados.

A análise histopatológica dos fragmentos de pulmão, rim e fígado revelou discreta alteração circulatória, que é altamente subjetiva, pois está presente em patologias de natureza diversa.

Conclui-se que três dos isolados de *K. pneumoniae* (P15, U4 e U8) foram capazes de translocar para o pulmão de camundongos testes que receberam a mistura de *Klebsiella*, confirmando assim, maior tropismo desse patógeno por esse órgão. O isolado P15 foi mais freqüentemente encontrado nos pulmões e além disso, colonizou intestino de camundongos que receberam prednisona e a combinação de prednisona e carbenicilina (tratamentos IV e VI).

Os resultados sugerem que a administração de dietas enterais contaminadas por *Klebsiella* pode representar sérios riscos para pacientes imunodeprimidos, pois nessas condições este patógeno em potencial pode alcançar outros órgãos e provocar infecções generalizadas.