

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS E BIOMEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIAS APLICADAS À
FARMÁCIA

THATIANY CEVALLOS MENEGUCCI

Tipagem molecular, susceptibilidade antimicrobiana e pesquisa de mecanismos
de resistência em isolados hospitalares de *Klebsiella pneumoniae*

Maringá
2011

THATIANY CEVALLOS MENEGUCCI

Tipagem molecular, susceptibilidade antimicrobiana e pesquisa de mecanismos de resistência em isolados hospitalares de *Klebsiella pneumoniae*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia do Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biociências Aplicadas à Farmácia
Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia

Orientador: Prof.^a Dr.^a Maria Cristina Bronharo Tognim

Maringá
2011

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

M541t Menegucci, Thatiany Cevallos
Tipagem molecular, susceptibilidade antimicrobiana e pesquisa de mecanismos de resistência em isolados hospitalares de *Klebsiella pneumoniae* / Thatiany Cevallos Menegucci. -- Maringá, 2011.
64 f. : il. figs., tabs.

Orientador: Profa. Dra. Maria Cristina Bronharo Tognim.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia, 2011.

1. *Klebsiella pneumoniae*. 2. Betalactamase de espectro estendido. 3. Concentração inibitória mínima. 4. Resistência bacteriana. 5. Infecção hospitalar. 6. Tipagem molecular. I. Tognim, Maria Cristina Bronharo, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências da Saúde. Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina. Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia. III. Título.

CDD 21.ed. 616.0144

MN-0000172

FOLHA DE APROVAÇÃO

THATIANY CEVALLOS MENEGUCCI

Tipagem molecular, susceptibilidade antimicrobiana e pesquisa de mecanismos de resistência em isolados hospitalares de *Klebsiella pneumoniae*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia do Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biociências Aplicadas à Farmácia pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA

Prof^a Dr^a Maria Cristina Bronharo Tognim
Universidade Estadual de Maringá (Presidente)

Prof^a Dr^a Lourdes Botelho Garcia
Universidade Estadual de Maringá

Prof. Dr. Benício Alves de Abreu Filho
Universidade Estadual de Maringá

Prof. Dr. Celso Luíz Cardoso
Universidade Estadual de Maringá

Prof. Dr. Silvana Martins Caparroz-Assef
Universidade Estadual de Maringá

Aprovada em: 20/12/2011

Local de defesa: Sala 110, Bloco I-90, *campus* da Universidade Estadual de Maringá.

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho a todos aqueles
que contribuíram para sua
realização, à minha mãe, irmãs e ao
meu marido.*

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof. Dra. Maria Cristina Bronharo Tognim. Cris, obrigada pela oportunidade de ser tua aluna de mestrado, por ter confiado em mim, por ser minha amiga, minha professora, orientadora, minha mãe no laboratório. Você é meu exemplo de pesquisadora. Sou muito grata e tenho um carinho imenso por você =)

À professora Lourdes Botelho Garcia e aos professores Celso Luiz Cardoso e Benício Alves de Abreu Filho pelo apoio científico e por estarem de braços abertos pra me ajudar quando precisei.

Às funcionárias do laboratório de Microbiologia Básica, Maria, Lurdes, Vilma, Rosana, Adriana, Marinete e Tereza. Obrigada pela colaboração de vocês na realização da minha pesquisa e pelos momentos de descontração que foram tão legais e importantes nos meus dias.

À minha amiga Marina de Souza Bastos. Nesses dois anos de mestrado ganhei uma grande amiga... Obrigada Maroca por ter sido minha companheira de pesquisa, de experimentos, de quarta-feira a noite, de passeios e de tantas outras coisas... Você é muito especial pra mim e vai fazer uma falta imensa no laboratório e aqui em Maringá! Desejo o melhor pra ti minha irmãzinha!!!

Aos meus amigos de pesquisa, Nattaly Bonacin Pinto, Kelly Cristina Yamaguchi Luz, Camila Roseguini, Bruno Buranello Costa, Mirian Nicéa Zarpellon, Cleverson Antonio Poças e Rafael Renato Brondani Moreira. Obrigada pelo companheirismo, amizade e colaboração. Vocês vão ter sempre um lugarzinho especial no meu coração!

Aos amigos que fazem parte da minha vida Fernanda Giacomini Bueno e Gean Pier Panizzon e também à minha família em Maringá, minha sogra Mercedes meu sogro Antonio. Obrigada por sempre me apoiarem à realização do mestrado e estarem comigo nessa caminhada!

Aos meus cachorros DOG e Chicco! Obrigada meus filhotes por sempre me recepcionar de uma maneira maravilhosa quando chegava em casa. Alegre, empolgada, feliz, às vezes triste e desanimada por algo ter dado errado, vocês sempre me alegravam. Obrigada também por estarem ao meu lado nas noites que ficava até tarde escrevendo. Vocês são as minhas alegrias!

À minhas irmãs e pequenos por estarem mesmo longe, sempre comigo. Vocês também fazem parte dessa minha conquista. Amo vocês!

À minha mãe por ser meu exemplo de vida, por sempre ter acreditado em mim e principalmente por sempre ter me mandado estudar! Mais uma vez agradeço todas as vezes em que você me mandou estudar. Obrigada mamãe! Essa conquista também é tua! Esse trabalho também é pra você! Você é tudo pra mim =)

Ao meu amigo, melhor amigo, companheiro, namorado, meu marido Gileno. Você desde o início me incentivou a fazer mestrado e durante esses dois anos só me apoiou. A você eu só tenho que agradecer por ser tão compreensivo e companheiro, até pra escrever! Amo você! Você é minha paixão!

Por último e mais importante, obrigada a Deus, por estar sempre ao meu lado, nunca me deixando desistir e colocando sempre pessoas certas no meu caminho. Obrigada Senhor por essa conquista!

Tipagem molecular, susceptibilidade antimicrobiana e pesquisa de mecanismos de resistência em isolados hospitalares de *Klebsiella pneumoniae*

RESUMO

Infecções causadas por bactérias produtoras de β -lactamases de espectro estendido (ESBL) é um problema de saúde pública hospitalar e epidemiológico, principalmente devido ao fato de seu tratamento ser relacionado a falhas terapêuticas e estar limitado aos carbapenems. O objetivo do presente estudo foi avaliar o perfil de sensibilidade às cefalosporinas de cepas hospitalares de *Klebsiella pneumoniae* produtoras e não produtoras de ESBL isoladas consecutivamente de um hospital terciário de Maringá, PR. A identificação e os testes de sensibilidade aos antimicrobianos foram realizados pelo sistema automatizado BD Phoenix. Adicionalmente para as cefalosporinas e os carbapenêmicos houve determinação da concentração inibitória mínima pelo método de diluição em ágar. A detecção de ESBL e *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) foi realizada pelos testes de disco duplo aproximação e teste de Hodge modificado respectivamente. O teste genotípico para pesquisa de ESBL e KPC, assim como a tipagem molecular das amostras foi realizada pela reação em cadeia de polimerase (*Polymerase Chain Reaction*) – PCR e suas variações. De 92 cepas testadas, todas foram sensíveis ao imipenem e meropenem e nenhuma apresentou gene de resistência *bla*_{KPC}. Em relação à ESBL, 64% apresentaram um ou mais de um genes para ESBL sendo o teste fenotípico positivo para 50% dos isolados. Das amostras positivas para ESBL 13, 22 e 32% apresentaram sensibilidade à ceftriaxona, ceftazidima e cefepima respectivamente, assim como, apenas 80% das amostras não produtoras de ESBL apresentaram sensibilidade a essas drogas. A tipagem molecular detectou 21 clones distintos, o mais prevalente, incluiu 15 amostras, sendo 73% produtoras de ESBL e este clone foi presente em 3 setores hospitalares. A presença de cepas sensíveis às cefalosporinas contendo genes para ESBL sugere que a detecção de ESBL e a determinação das CIMs para cefalosporinas devem ser realizadas pelos laboratórios clínicos e que com base nestes dados os clínicos possam decidir o melhor antimicrobiano a ser utilizado no tratamento de infecções causadas por cepas produtoras de ESBL.

Palavras – chave: *Klebsiella pneumoniae*. β -lactamases de espectro estendido. Concentração inibitória mínima. Tipagem molecular.

Molecular typing, antimicrobial susceptibility and research of mechanisms of resistance in hospital isolates of *Klebsiella pneumoniae*

ABSTRACT

Infections caused by bacteria producing extended spectrum β -lactamases is a public health hospitalar problem and epidemiological, mainly due the fact that its treatment was related to therapeutic failures and be limited to carbapenems. The aim of this study was to evaluate the sensitivity to cephalosporins of *Klebsiella pneumoniae* hospitalar strains, producing or not ESBL, isolated consecutively from a tertiary hospital in Maringá, PR. The identification and antimicrobial susceptibility tests were performed by the BD Phoenix automated system. Additionally for cephalosporins and carbapenems the determination of minimum inhibitory concentration were determination by agar dilution method. The phenotypic detection of ESBL and KPC was performed by double disk approximation and modified Hodge test respectively. The genotypic detection for ESBL and carbapenemase, like *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC), as well as molecular typing of the samples was performed by Polymerase Chain Reaction – PCR and its variations. Of 92 strains tested, all were susceptible to imipenem and meropenem and none showed resistance gene *bla*_{KPC}. In relation to ESBL, 64% had one or more of the genes and for phenotypic test, 50 % of the isolates was positive. Of the positive samples for ESBL, 13, 22 and 32% were susceptibility to ceftriaxone, ceftazidime and cefepime respectively, and only 80% of samples not producing ESBL were susceptibility to these drugs. Molecular typing detected 21 different clones, clone J was the most prevalent with 15 samples, 73% positive to ESBL and the clone was present in three hospital sectors. The presence of strains containing ESBL genes and susceptibility to cephalosporins suggests that the ESBL detection and MICs determination should be performed by clinical laboratories and from these data, clinicians decide the best antibiotic to be used in the treatment of infections caused by ESBL producing strains

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*. Extended spectrum β -lactamase. Minimum inhibitory concentration. Molecular typing.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1	Comparação das CIMs entre os documentos do CLSI 2009 e 2010-2011	17
Tabela 2	Distribuição dos breakpoints dos anos 2009, 2010 e 2011 referentes aos documentos do CLSI e EUCAST	18

Capítulo 2

Tabela 1	Perfil de sensibilidade do total de amostras para os principais antimicrobianos e perfil de sensibilidade de cepas produtoras e não produtoras de ESBL pelo método automatizado	46
Tabela 2	Distribuição das CIM para Ceftriaxona, Ceftazidima e Cefepima entre todas as amostras testadas e cepas produtoras ou não de ESBL	47
Figura 1	Dendograma obtido pelo “ <i>Enterobacterial repetitive intergenic consensus</i> ” – <i>Polymerase Chain Reaction</i> (ERIC-PCR) dos clones mais comuns de <i>K. pneumoniae</i> isolados da unidade hospitalar	48

Dissertação elaborada e formatada conforme
as normas da publicação científica:

International Journal of Antimicrobial Agents

Disponível em:

http://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws_home/505521/description

SUMÁRIO

CAPÍTULO I

Taxonomia do gênero <i>Klebsiella</i> e sua importância como patógeno	12
Resistência bacteriana a antimicrobianos	13
Resistência aos β -lactâmicos – β -lactamases em <i>K. pneumoniae</i>	13
Métodos para identificação de ESBL	16
Testes fenotípicos	18
Testes genotípicos	19
<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase – KPC	19
Métodos para identificação de KPC	20
Tipagem molecular	20
Justificativa	21
Objetivos	22
Referências bibliográficas	23

CAPÍTULO II

Distribuição da MIC de cefalosporinas em amostras de <i>Klebsiella pneumoniae</i> .	29
A detecção de ESBL é necessária?	

CAPÍTULO III

Conclusões, limitações do estudo e perspectivas futuras	53
---	----

ANEXO

Normas para publicação no periódico	55
-------------------------------------	----

CAPÍTULO I

TAXONOMIA DO GÊNERO *Klebsiella* E SUA IMPORTÂNCIA COMO PATÓGENO

O gênero *Klebsiella* é constituído de bacilos Gram-negativos, anaeróbios facultativos, pertencentes à família *Enterobacteriaceae*. Em ágar MacConkey, apresenta colônias grandes, com pigmento vermelho (característico da fermentação da lactose) e na grande maioria das vezes, colônias com aspecto mucóide, devido à presença de espessa camada de polissacarídeo ⁽¹⁻²⁾.

Três espécies estão associadas às doenças humanas: *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* e *Klebsiella granulomatis*, sendo *Klebsiella pneumoniae* a espécie mais comum, responsável por infecções hospitalares e comunitárias, como por exemplo, infecções urinárias, septicemia, meningite e pneumonia ⁽²⁻⁴⁾. *K. pneumoniae* é normalmente encontrada colonizando a nasofaringe (1 a 6%) e o trato intestinal (5 a 38%) de humanos, tendo sua taxa de colonização aumentada quanto maior o tempo de internação e uso de antibióticos. Devido à sua sobrevivência nas mãos e superfícies, adaptam-se com facilidade aos ambientes hospitalares, sendo transmitidos de paciente a paciente pelas mãos dos profissionais da saúde que podem atuar como carreadores transitórios ou persistentes deste microrganismo ^(1,3).

No ambiente hospitalar, *K. pneumoniae* está relacionada a casos de infecções respiratórias ⁽⁵⁾, abscessos hepáticos ⁽⁶⁾, infecções sanguíneas, além de infecções em neonatos internados em unidades de terapia intensiva ⁽⁷⁾. Entre as infecções de corrente sanguínea causada por bactérias Gram negativas, *K. pneumoniae* é a segunda enterobactéria mais isolada ⁽⁸⁾. Estudo realizado pelo programa MYSTIC (*Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection*) analisou a susceptibilidade antimicrobiana em bactérias Gram negativas isoladas em hospitais brasileiros no ano de 2003 e *K. pneumoniae* foi o terceiro microrganismo mais isolado, ficando atrás de *Pseudomonas aeruginosa* e *E.coli*, com uma prevalência de 16,9% e o principal sítio de isolamento foi urina (18,6%) seguido de sangue (17,2%) ⁽⁹⁾. Em outro estudo de vigilância epidemiológica realizado pelo programa SENTRY (*Antimicrobial Surveillance Program*) durante os anos de 1997 a 2001 utilizando-se dados brasileiros e latino americanos, *K. pneumoniae* foi o quinto microrganismo mais isolado, ficando atrás apenas da *E. coli* entre as enterobactérias. O principal sítio de isolamento foi o sangue, seguido de infecções do trato respiratório baixo de pacientes hospitalizados ⁽¹⁰⁾.

RESISTÊNCIA BACTERIANA A ANTIMICROBIANOS

Uma grande variedade de patógenos, que, há algum tempo, eram normalmente bastante sensíveis, tem adquirido resistência a um número cada vez maior de antimicrobianos. Além disso, microrganismos intrinsecamente mais resistentes e até há pouco tempo extremamente raros no ambiente hospitalar, têm se tornado cada vez mais frequentes. Este fato acarreta uma série de problemas que atingem não somente o paciente como também o hospital e a indústria farmacêutica ⁽¹¹⁾.

O aumento da resistência ocorre devido a mutações progressivas em genes que codificam cromossomos e também devido à aquisição de integrons e plasmídeos, que são elementos móveis, capazes de transferir a informação genética entre microrganismos ^(5,12).

Infecções por microrganismos multirresistentes como *P. aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* e *K. pneumoniae* têm se tornado um problema mundial cada vez mais emergente ⁽¹³⁻¹⁴⁾.

O aumento da resistência representa uma grave situação clínica, limitando o tratamento antimicrobiano pelo clínico, resultando em implicações na saúde pública, já que o médico fica com praticamente nenhuma escolha racional de antimicrobiano ⁽¹⁵⁾. Devido esse fato, antimicrobianos que deixaram de ser utilizados, voltaram ao uso, como a polimixina ⁽¹⁴⁻¹⁵⁾. Além disso a resistência bacteriana tem sido associada a maior morbi-mortalidade e maiores custos hospitalares, uma vez que a dificuldade no controle da infecção prolonga a internação hospitalar e implica na necessidade de um maior número de exames subsidiários e medicamentos coadjuvantes ⁽⁹⁾.

RESISTÊNCIA AOS β -LACTÂMICOS: β -LACTAMASES EM *K. pneumoniae*

Antimicrobianos β -lactâmicos como penicilinas, cefalosporina e carbapenens são os principais agentes utilizados no tratamento para bactérias Gram negativas e a hidrólise desses antimicrobianos por β -lactamases é o mecanismo mais comum de resistência a *K. pneumoniae* ⁽¹⁶⁻¹⁷⁾.

Estudo realizado pelo programa de vigilância SENTRY durante o período de 1997 a 2001, do total de 292 amostras, 143 foram identificadas como *K. pneumoniae*, destas, aproximadamente 40% apresentaram resistência à ceftriaxona e ceftazidima dentre as quais em torno de 40% indicavam a possibilidade de serem produtoras de β -lactamases de espectro estendido - ESBL ⁽¹⁰⁾. Já, um trabalho realizado pelo programa de vigilância MYSTIC Brasil,

durante o ano de 2003, aproximadamente 52% dos isolados de *K. pneumoniae* eram resistentes às cefalosporinas de terceira geração e todas susceptíveis aos carbapenems. A susceptibilidade à piperacilina-tazobactam encontrada foi de 87% ⁽⁹⁾.

A classificação das β -lactamases é baseada nas características funcionais das enzimas, ⁽¹⁷⁻¹⁹⁾ ou em sua estrutura primária, divididas em 4 grupos moleculares (A a D) ^(17,19,20).

Nas classes A, C e D de Ambler, estão enzimas que possuem serina em seu sítio ativo. Na classe B de Ambler estão inseridas as metalo enzimas, as quais necessitam de um ou dois íons zinco para sua atividade ⁽¹⁶⁾. As metalo enzimas, são capazes de degradar todos os β -lactâmicos, incluindo os carbapenems e não são inibidas pelo ácido clavulânico e sim por quelantes de metais como o EDTA ⁽¹⁶⁻¹⁷⁾. Devido sua capacidade de degradação de carbapenems, são consideradas carbapenemases ⁽¹⁹⁾.

As ampicilinasas do tipo AmpC estão inseridas na classe C de Ambler, grupo 1 de Bush, Jacoby e Medeiros. São enzimas codificadas por genes cromossômicos e induzíveis por β -lactâmicos. Este gene está ausente nas espécies de *Klebsiella* spp, porém ampicilinasas mediadas por plasmídeos podem conferir resistência antimicrobiana às espécies ausentes desse gene ⁽¹⁷⁾.

Oxacilinasas (OXA), enzimas capazes de hidrolisar oxacilina, são enzimas pertencentes à classe D de Ambler e ao grupo 2d de Bush, Jacoby e Medeiros. Podem ser consideradas β -lactamases de espectro estendido, quando degradam β -lactâmicos, com exceção aos carbapenems ou carbapenemases, quando são capazes de hidrolisar os carbapenems. São principalmente encontradas em genes cromossômicos de *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*, porém OXA mediada por plasmídeos já foi encontrada em enterobactérias ⁽¹⁷⁾.

A classe A de Ambler está inserida no grupo 2 de Bush, Jacoby e Medeiros -1995 ⁽¹⁸⁾ e são enzimas que possuem serina em seu sítio ativo e hidrólise preferencial por penicilinas. ^(17,21). Nesse grupo são inseridas as β -lactamases de espectro estendido (ESBL), pertencentes ao subgrupo 2be de Bush, Jacoby e Medeiros, as carbapenemases, responsável pela hidrólise dos carbapenems e outras β -lactamases de amplo espectro, porém ausentes de fenótipo de ESBL ^(17,19,21).

Encontrada em uma amostra de *E. coli* de hemocultura na Grécia, TEM-1 foi a primeira β -lactamase descrita em bactérias Gram negativas. Seu nome é devido ao nome da paciente em que a amostra foi isolada, Temoniera. Plasmídeos e transposons facilitaram sua dispersão para outras espécies de bactérias no mundo todo ⁽²¹⁾. Substituições de aminoácidos na enzima TEM-1 deram origem a enzima TEM-2 e então a TEM-3, primeiro fenótipo de

ESBL descrito ^(19,21). E são as substituições nos aminoácidos 104, 164, 238 e 240 que conferem à enzima TEM o fenótipo de ESBL. Os substratos preferenciais da maioria das ESBL do tipo TEM são ceftazidima e aztreonam, porém uma substituição na posição 238 de seu cromossomo, confere boa resistência também à cefotaxima ^(17,19).

A enzima SHV-1 (Sulfidril Variável) foi a primeira enzima do tipo SHV detectada, e é comumente encontrada em *K. pneumoniae*, sendo responsável por 20% da resistência à ampicilina mediada por plasmídeo. A maioria das variantes de SHV possuem um fenótipo de ESBL caracterizado por uma substituição de glicina por serina na posição 238 de seu cromossomo ⁽²¹⁾. Esta posição também é responsável pela hidrólise de cefalosporinas. A presença de serina nesta posição determina hidrólise por ceftazidima e a presença de lisina é responsável pela hidrólise da cefotaxima ^(19,21). Assim como a TEM, é principalmente encontrada em espécies de *Klebsiella* spp., *Escherichia*, *Salmonella* sp. e em alguns casos em *Pseudomonas* sp. ^(17,19,22).

Até o final da década de 1990, as enzimas TEM e SHV eram as mais comumente encontradas em infecções causadas por bactérias Gram negativas. Em 1989, foi relatado um novo membro da classe das ESBL denominado CTX-M – cefotaximases e partir do ano 2000, estas se tornaram as ESBL mais comumente detectadas e na maioria das vezes, relacionada à infecções comunitárias ⁽²³⁾. Estas enzimas possuem maior atividade contra cefotaxima em relação à ceftazidima ⁽²³⁾ e diferente da TEM e SHV, as enzimas CTX-M, possuem melhor inibição pelo tazobactam, em relação ao ácido clavulânico ^(17,19). São divididas em cinco grupos, CTX-M1, CTX-M2, CTX-M8, CTX-M9 e CTX-M25 ^(23,24).

Outras ESBL já foram detectadas, porém são incomuns e limitadas a algumas regiões, como a PER-1, isolada na Turquia, França e Itália; VEB-1 e VEB-2, isoladas em amostras do sudeste da Ásia; GES-1, GES-2 e IBC-2, isoladas na África do Sul e outras como BEL-1, BES-1, SFO-1, TLA-1 e TLA-2 ^(17,19).

Devido à resistência que as enzimas β -lactamases conferem a uma grande variedade de agentes β -lactâmicos, incluindo penicilinas de espectro estendido, cefalosporinas de terceira geração e monobactâmicos ⁽²⁵⁾, o tratamento de infecções causadas por cepas produtoras de ESBL limita-se aos carbapenêmicos, como o imipenem, ertapenem e meropenem, tornando o tratamento desses organismos um desafio terapêutico ⁽²⁶⁻²⁷⁾.

Os carbapenêmicos possuem alta estabilidade à hidrólise por ESBL, e se distribuem em alta concentração em todos os tecidos do corpo não sofrendo o efeito inóculo, por isso são considerados drogas de escolha para o tratamento de infecções causadas por bactérias produtoras de ESBL ⁽²⁷⁾. As desvantagens de seu uso incluem alto custo, necessidade de via

parenteral para administração e largo espectro de atividade, podendo causar infecções secundárias em pacientes imunodeprimidos⁽²⁷⁾.

Além da presença de ESBL, o fenótipo de resistência em isolados de *K. pneumoniae*, pode ocorrer pela diminuição da concentração de antimicrobiano no microrganismo, pela alteração de alvos ou devido a hiper produção de bombas de efluxo, associada ou não à perda de porinas⁽²⁸⁻²⁹⁾. A perda dos canais de porina e a não regulação das bombas de efluxo, facilitam a hidrólise do fármaco pelas enzimas β -lactamases⁽³⁰⁾.

Métodos para identificação de ESBL

Muitos métodos fenotípicos têm sido desenvolvidos com a finalidade de detectar ou confirmar a produção de ESBL em enterobactérias. A grande maioria dos guias e diretrizes recomenda que seja feito um *screening* inicial baseado na redução da sensibilidade às cefalosporinas de terceira geração ou monobactâmicos e então utilizar um teste confirmatório para detecção de ESBL^(19,27,31).

Dois comitês são responsáveis pela elaboração dos principais documentos de padronização utilizados por laboratórios clínicos, comitê americano: “*Clinical and Laboratory Standards Institute*” (CLSI) e europeu, o “*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*” (EUCAST). Algumas diferenças são encontradas entre os dois comitês, como a representatividade, valores de documentos, metodologias de trabalho, entre outras, entretanto ambos estabelecem roteiros e pontos de corte anuais em seus suplementos para nortear a interpretação e a realização dos testes de sensibilidade.

Desde o ano de 2005 até o ano de 2009, o CLSI preconizava a realização de detecção de ESBL sempre que amostras de enterobactérias possuísem *screening* inicial positivos, ou seja, amostras com redução da sensibilidade às cefalosporinas de amplo espectro ou aos monobactâmicos. Este teste era baseado na inibição enzimática, da enzima ESBL, pela adição do ácido clavulânico. Ainda, até 2009 era recomendado pelo CLSI que se um isolado fosse confirmado como produtor de ESBL, a categoria de sensibilidade para as penicilinas, cefalosporinas, e aztreonam, deveria ser mudada para resistente, independentemente do resultado da concentração inibitória mínima ou halo de inibição obtido no teste. Já, no ano de 2010 o CLSI reduziu os valores dos pontos de corte das CIM de cefalosporinas de terceira geração e ainda de carbapênicos para enterobactérias em relação à determinação de sensibilidade para estas drogas⁽³²⁻³⁴⁾. Esses valores estão relatados na tabela 1. Utilizando-se os novos critérios interpretativos do CLSI, com redução das CIMs para cefalosporinas de amplo espectro como cefotaxima, ceftriaxona e ceftazidima, o Comitê do CLSI considera

desnecessário a realização de testes fenotípicos para detecção de ESBL para edição laudos, entretanto o considera ainda importante em termos epidemiológicos ⁽³⁵⁾.

Tabela 1. Comparação das CIMs entre os documentos do CLSI 2009 e 2010-2011

	CLSI 2009			CLSI 2010-2011		
	Sensível	Intermediário	Resistente	Sensível	Intermediário	Resistente
Cefotaxima						
e	$\leq 8\mu\text{g/mL}$	$16 - 32 \mu\text{g/mL}$	$\geq 64\mu\text{g/mL}$	$\leq 1\mu\text{g/mL}$	$2\mu\text{g/mL}$	$\geq 4\mu\text{g/mL}$
Ceftriaxona						
Ceftazidima	$\leq 8\mu\text{g/mL}$	$16 \mu\text{g/mL}$	$\geq 32\mu\text{g/mL}$	$\leq 4\mu\text{g/mL}$	$8\mu\text{g/mL}$	$\geq 16\mu\text{g/mL}$
Cefepima	$\leq 8\mu\text{g/mL}$	$16 \mu\text{g/mL}$	$\geq 32\mu\text{g/mL}$	$\leq 8\mu\text{g/mL}$	$16 \mu\text{g/mL}$	$\geq 32\mu\text{g/mL}$
Imipenem	$\leq 4\mu\text{g/mL}$	$8 \mu\text{g/mL}$	$\geq 16\mu\text{g/mL}$	$\leq 1\mu\text{g/mL}$	$2\mu\text{g/mL}$	$\geq 4\mu\text{g/mL}$
Meropenem	$\leq 4\mu\text{g/mL}$	$8 \mu\text{g/mL}$	$\geq 16\mu\text{g/mL}$	$\leq 1\mu\text{g/mL}$	$2\mu\text{g/mL}$	$\geq 4\mu\text{g/mL}$

Apesar da mudança dos pontos de corte para as cefalosporinas de terceira geração, em relação à de quarta geração, como o cefepime, tal mudança não foi realizada (34).

Do ponto de vista clínico, a determinação da sensibilidade da bactéria às drogas pela determinação da CIM é mais importante do que a realização de testes adicionais para detecção de ESBL, os quais aumentam o custo e o tempo para liberação dos resultados, porém a realização desses testes tem importância epidemiológica externa e interna ao hospital, possibilitando uma terapia empírica mais correta e também no controle de infecções hospitalares ⁽³⁶⁾.

Em relação ao EUCAST, os pontos de corte para cefalosporinas já eram menores quando comparados ao CLSI sendo até mesmo para cefepime mais baixo do que existe atualmente no CLSI, entretanto o comitê europeu sempre recomendou o uso da realização de teste para ESBL e também a edição de laudos. A tabela 2 mostra as diferenças entre os *breakpoints* do CLSI e do EUCAST.

Tabela 2. Distribuição dos breakpoints dos anos 2009, 2010 e 2011 referentes aos documentos do CLSI e EUCAST

		CIM - µg/mL					
		2009		2010		2011	
		Sensível	Resistente	Sensível	Resistente	Sensível	Resistente
CLSI	Cefotaxima e Ceftriaxona	≤8	≥64	≤1	≥4	≤1	≥4
	Ceftazidima	≤8	≥32	≤4	≥16	≤4	≥16
	Cefepima	≤8	≥32	≤8	≥32	≤8	≥32
EUCAST	Cefotaxima e Ceftriaxona	≤1	≥2	≤1	≥2	≤1	≥2
	Ceftazidima	≤2	≥8	≤1	≥8	≤1	≥4
	Cefepima	ND	ND	≤1	≥8	≤1	≥4

ND – Não determinado

Testes fenotípicos:

Um dos primeiros testes descritos foi o disco-duplo aproximação, utilizando cefalosporinas de terceira geração e aztreonam como substratos ⁽³⁷⁾. O teste se baseia na utilização do método de disco difusão em ágar, com a utilização de discos de antimicrobianos do tipo aztreonam, ceftazidima, cefotaxima, cefopodoxima e um disco central de amoxicilina adicionado de ácido clavulânico. A presença de uma zona de inibição de crescimento bacteriano aumentada próximo ao disco contendo ácido clavulânico (zona fantasma) é considerada como cepa produtora de ESBL ^(21,31,37- 38). Além deste, outros testes fenotípicos também podem ser utilizados para detectar cepas produtoras de ESBL como o E-test – ESBL, teste quantitativo que utiliza uma fita de E-test denominada ESBL –Etest contendo em um dos lados ceftazidima, ou cefotaxima ou ainda cefepima e do outro lado a cefalosporina correspondente adicionada de ácido clavulânico. O teste é considerado positivo quando ocorre uma diminuição de mais de três diluições no halo da ponta contendo apenas antimicrobiano em relação ao antimicrobiano adicionado de clavulanato. Pode também ser considerado positivo quando ocorre o aparecimento de zona fantasma exatamente abaixo da menor concentração do antimicrobiano adicionado de ácido clavulânico ^(21, 31, 38).

O teste fenotípico recomendado pelo CLSI para detecção de ESBL é o teste de disco combinado. Assim como o teste de disco-duplo aproximação e o E-test, também é baseado em disco difusão. Discos contendo ceftazidima, cefotaxima ou cefopodoxima e discos contendo as mesmas drogas adicionadas de ácido clavulânico são colocados em placa contendo Müller

Hinton ágar e incubadas a 35-37 °C por 16 a 18 horas. O teste é considerado positivo quando ocorre aumento maior ou igual a cinco milímetros no halo do disco contendo ácido clavulânico ^(21, 31,35, 38).

Métodos automatizados também podem ser utilizados para detecção de ESBL e estes são baseados na redução da sensibilidade as cefalosporinas de amplo espectro adicionadas ou não de ácido clavulânico ^(31, 38).

Os métodos fenotípicos possuem resultados de difícil interpretação quando testados para microrganismos produtores de AmpC, como *Enterobacter* spp. Isso ocorre devido o fato do ácido clavulânico, que inibe a ESBL, ser mascarado pela presença de AmpC ^(27, 31).

Testes genotípicos

Como método genotípico, o principal utilizado para detecção de ESBL é a amplificação por *Polymerase Chain Reaction* -PCR, seguida de sequenciamento. A PCR pode ser do tipo simples, quando se deseja detectar apenas um tipo da enzima, TEM ou CTX-M ou SHV, ou PCR do tipo Multiplex, quando em uma mesma amplificação pode-se detectar a presença de dois ou mais tipos de ESBL. O sequenciamento é importante para discriminar entre enzimas não ESBL, como por exemplo, TEM-1, TEM-2 e SHV-1 e também identificar novas variantes ^(21, 27).

***Klebsiella pneumoniae* CARBAPENEMASE – KPC**

A produção de carbapenemases, principalmente do tipo KPC, é um importante problema clínico e também para a saúde pública, já que enzimas do tipo KPC são capazes de hidrolisar até a última geração de β -lactâmicos, os carbapenêmicos, restando poucas ou nenhuma opção terapêutica ⁽³⁹⁻⁴⁰⁾. O grupo KPC tem um alto potencial de disseminação devido à sua localização em plasmídio e é mais frequentemente encontrado em *K. pneumoniae*. Esta disseminação dificulta o controle de epidemias, e preocupa os profissionais da área de saúde, pois o tratamento destas infecções é extremamente difícil, elevando as taxas de mortalidade ⁽⁴¹⁾.

As enzimas KPC são capazes de hidrolisar eficientemente penicilinas cefalosporinas, aztreonam, e carbapenens, e são inibidas pelo ácido clavulânico e tazobactam ⁽⁴²⁾. Primeiramente isolada na cidade de Carolina do Norte, EUA ⁽⁴³⁾ foi rapidamente disseminada e alteração em apenas um de seus aminoácidos fez com que surgisse a KPC-2. Um novo sequenciamento detectou que as duas enzimas eram idênticas e então a KPC-1 perdeu sua

designação ^(40, 43-44) Hoje já são 11 as KPC descobertas, KPC-2 a KPC-12 (www.lahey.org/studies - acessado dia 09-11-2011) sendo estas diferentes das demais, por aproximadamente duas variações de aminoácidos ^(40, 42).

No Brasil a primeira detecção de KPC ocorreu em 2006 no estado de Pernambuco, cujos pacientes hospitalizados estavam contaminados por cepas de *K. pneumoniae* produtoras de KPC-2 ⁽⁴⁵⁾. Depois foram detectadas cepas produtoras de KPC-2 nos estados do Rio de Janeiro e São Paulo ⁽⁴⁵⁻⁴⁷⁾. KPC-2 também foi relatada em amostras de *Enterobacter cloacae* e de *E. coli* isoladas no estado do Rio Grande do Sul e Rio de Janeiro ^(39, 48-49).

Métodos para identificação de KPC

O teste para detecção de KPC preconizado pelo CLSI é o teste de Hodge modificado. Uma cultura pura de *E. coli* (ATCC25922) na concentração de 10^7 Unidades Formadoras de Colônia por mililitros (UFC/mL) é semeada em ágar Müller Hinton e um disco de meropenem ou ertapenem é colocado no centro da placa. Com os isolados suspeitos de produção de KPC, é feita uma listra, do disco à borda da placa. É considerado teste positivo quando ocorre crescimento de *E. coli* próximo ao disco contendo antimicrobiano ou ao lado da listra ^(35,40). Outro teste fenotípico que pode ser utilizado para detecção de cepas produtoras de KPC são os discos de carbapenems adicionados de ácido fenilborônico. Os testes são considerados positivos quando ocorre aumento igual ou superior a cinco milímetros no halo do disco com adição de ácido fenilborônico ⁽⁵⁰⁾.

Como método genotípico, a PCR é considerada a técnica mais utilizada para detectar cepas produtoras de KPC.

TIPAGEM MOLECULAR

Hoje, a capacidade de realizar estudos epidemiológicos a fim de determinar as fontes de contaminação bacteriana é de extrema importância para saúde pública ⁽⁵¹⁾.

A técnica de tipagem molecular, uma importante ferramenta epidemiológica para reconhecer surtos de infecção, colabora com o centro de controle de infecções a fim de tentar controlar a disseminação de importantes patógenos, detectar transmissão cruzada entre patógenos hospitalares, determinar a fonte da infecção, reconhecer cepas virulentas e em alguns casos, monitorar programas de vacinação ⁽⁵²⁻⁵⁴⁾.

Os requisitos para se obter um bom método de tipagem molecular são reprodutibilidade, alto índice de discriminação e a capacidade de fornecer resultados para

cada tipo de microrganismo ⁽⁵²⁻⁵⁴⁾. O método considerado como padrão ouro e que atinge esses requisitos é o PFGE (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*). Um dos fatores que limita o uso do PFGE pelos laboratórios clínicos é o tempo do procedimento, que pode ser entre dois e três dias além do custo das análises ⁽⁵²⁻⁵³⁾.

Estudo realizado por Silbert e colaboradores teve como objeto avaliar três métodos de tipagem molecular, o PFGE, a ribotipagem e o *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus* (ERIC-PCR). Este último, descrito por Versalovic e colaboradores ⁽⁵⁵⁾ consiste em realizar amplificações em elementos repetidos presentes no genoma bacteriano. Segundo Silbert e colaboradores a técnica de ERIC-PCR possuiu semelhança no poder discriminatório à técnica de PFGE para certo tipos de microrganismos, sendo ainda que o sistema ERIC apresentou 100% de tipeabilidade ⁽⁵³⁾. O ERIC também possui a vantagem de possuir uma metodologia simples e mais rápida quando comparado ao PFGE ⁽⁵³⁾.

Resultados obtidos pelo ERIC ainda não estão bem estabelecidos, alguns autores consideram uma única banda como sinônimo de cepas diferentes e outros consideram cepas da mesma linhagem quando existe um coeficiente de similaridade superior a 90% ⁽⁵³⁾. Van Belkum em sua revisão a respeito de métodos de tipagem sugere que agrupamentos de espécies sejam feitos com grupos de bactérias com diferenças de 50%, para agrupamentos clonais, seja utilizada similaridade acima de 80% e agrupamentos de surtos similaridade de 90% ⁽⁵⁶⁾.

JUSTIFICATIVA

A infecção hospitalar representa um problema de saúde pública mundial, exigindo dos órgãos públicos medidas emergentes que possibilitem a ampliação e abrangência de ações de vigilância e controle, visando a redução das taxas de morbidade e mortalidade.

Utilizando-se os novos critérios interpretativos do CLSI, com redução das CIMs para cefalosporinas de amplo espectro torna-se desnecessário a realização de testes fenotípicos para detecção de ESBL para edição de laudos. Do ponto de vista clínico, a determinação da sensibilidade da bactéria às drogas pela determinação da CIM é mais importante do que a realização de testes adicionais para detecção de ESBL, porém a realização desses testes tem importância epidemiológica externa e interna ao hospital, possibilitando uma terapia empírica mais correta e também no controle de infecções.

Assim como a infecção hospitalar, a presença de enterobactérias produtoras de ESBL também é um importante problema de saúde pública e hospitalar, principalmente devido o

fato de seu tratamento ser limitado ao uso de carbapenems, o que o torna caro e problemático, pois nos dias de hoje já temos resistência a esses antimicrobianos e presença de cepas produtoras de carbapenemases, principalmente do tipo KPC, o que limita ainda mais o tratamento.

Esse trabalho tem como um dos objetivos verificar a presença de cepas produtoras de ESBL e relacioná-las ao seu perfil de sensibilidade a outras drogas, pois o fato da presença de cepas produtoras de ESBL sensíveis a algumas cefalosporinas e também a outras drogas, de certa forma possibilitaria o uso de outros antimicrobianos e não apenas os carbapenêmicos, reservando o uso destes para casos mais graves, evitando dessa maneira o aumento de sua resistência.

OBJETIVOS

GERAL:

Caracterizar isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* quanto à sensibilidade aos β -lactâmicos, presença fenotípica e genotípica de β -lactamases e caracterização molecular.

ESPECÍFICOS:

Isolar, identificar e estocar todas as amostras de origem clínica de *K. pneumoniae*, isoladas no período de Setembro de 2009 a Dezembro de 2010 no hospital Santa Casa de Maringá;

Determinar o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos das cepas estocadas de *K. pneumoniae*;

Determinar em todos os isolados a concentração inibitória mínima (CIM) para os antimicrobianos ceftazidima, ceftriaxona, cefepime, imipenem e meropenem pela técnica de diluição em ágar.

Pesquisar fenotipicamente em todos os isolados a presença de ESBL e KPC;

Detectar genotipicamente em todos os isolados, pela técnica de PCR Simples a presença de *bla*_{KPC};

Detectar genotipicamente em todos os isolados, pela técnica de PCR Multiplex a presença das classes de ESBL *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M};

Caracterizar molecularmente pela técnica de ERIC-PCR todos os isolados de *K. pneumoniae* utilizados neste estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Gupta A, Della Latta P, Todd B et al. Outbreak of Extended Spectrum β -Lactamase Producing *Klebsiella pneumoniae* in a Neonatal Intensive Care Unit Linked to Artificial Nails. *Infection Control and Hospital Epidemiology* 2004; 25(3):210-215.
- (2) López-Ibáñez C, Vidal Verdú E, Rivero A, Torre-Cisneros J. Infecciones por bacilos gramnegativos no fermentadores (I): *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter* sp., *Serratia marcescens* y otros. *Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado* 2010; 10(52):3475-3481.
- (3) Pérez-Moreno MO, Centelles-Serrano MJ, Cortell-Ortolá M et al. Molecular epidemiology and resistance mechanisms involved in reduced susceptibility to amoxicillin/clavulanic acid in *Klebsiella pneumoniae* isolates from a chronic care centre. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2011; 37(5):462-466.
- (4) Hartman LJ, Selby EB, Whitehouse CA et al. Rapid Real-Time PCR Assays for Detection of *Klebsiella pneumoniae* with the *rmpA* or *magA* Genes Associated with the Hypermucoviscosity Phenotype: Screening of Nonhuman Primates. *The Journal of Molecular Diagnostics* 2009; 11(5):464-471.
- (5) Kaczmarek FM, Dib-Hajj F, Shang W, Gootz TD. High-Level Carbapenem Resistance in a *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolate Is Due to the Combination of *bla*_{ACT-1} β -Lactamase Production, Porin OmpK35/36 Insertional Inactivation, and Down-Regulation of the Phosphate Transport Porin Pho E. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50(10):3396-3406.
- (6) Lee CH, Liu JW, Su LH, Chien CC, Li CC, Yang KD. Hypermucoviscosity associated with *Klebsiella pneumoniae*-mediated invasive syndrome: a prospective cross-sectional study in Taiwan. *International Journal of Infectious Diseases* 2010; 14(8):e688-e692.
- (7) Cassettari VC, da Silveira IR, Dropa M et al. Risk factors for colonisation of newborn infants during an outbreak of extended-spectrum β -lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* in an intermediate-risk neonatal unit. *Journal of Hospital Infection* 2009; 71(4):340-347.
- (8) Meatherall BL, Gregson D, Ross T, Pitout JDD, Laupland KB. Incidence, Risk Factors, and Outcomes of *Klebsiella pneumoniae* Bacteremia. *The American Journal of Medicine* 2009; 122(9):866-873.

- (9) Kiffer C, Hsiung A, Oplustil C et al. Antimicrobial susceptibility of Gram-negative bacteria in Brazilian hospitals: the MYSTIC Program Brazil 2003. *Brazilian Journal of Infectious Diseases* 2005; 9:216-224.
- (10) Sader HS, Jones RN, Gales AC, Silva JB, Pignatari AC. SENTRY antimicrobial surveillance program report: latin american and brazilian results for 1997 through 2001. *Brazilian Journal of Infectious Diseases* 2004; 8:25-79.
- (11) Rahal JJ. Antimicrobial Resistance among and Therapeutic Options against Gram-Negative Pathogens. *Clinical Infectious Diseases* 2009; 49(Supplement 1):S4-S10.
- (12) Jiang Y, Yu D, Wei Z, Shen P, Zhou Z, Yu Y. Complete Nucleotide Sequence of *Klebsiella pneumoniae* Multidrug Resistance Plasmid pKP048, Carrying *bla*_{KPC-2}, *bla*_{DHA-1}, *qnr*_{B4}, and *arm*_A. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54(9):3967-3969.
- (13) Hadadi A, Rasoulinejad M, Maleki Z, Yonesian M, Shirani A, Kourorian Z. Antimicrobial resistance pattern of Gram-negative bacilli of nosocomial origin at 2 university hospitals in Iran. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2008; 60(3):301-305.
- (14) Falagas M, Bliziotis I, Kasiakou S, Samonis G, Athanassopoulou P, Michalopoulos A. Outcome of infections due to pandrug-resistant (PDR) Gram-negative bacteria. *BMC Infectious Diseases* 2005; 5(1):24.
- (15) Falagas ME, Bliziotis IA. Pandrug-resistant Gram-negative bacteria: the dawn of the post-antibiotic era? *International Journal of Antimicrobial Agents* 2007; 29(6):630-636.
- (16) Carine B. Metallo- β -lactamases (classification, activity, genetic organization, structure, zinc coordination) and their superfamily. *Biochemical Pharmacology* 2007; 74(12):1686-1701.
- (17) Bush K, Jacoby GA. Updated Functional Classification of β -Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54(3):969-976.
- (18) Bush, K., G. A. Jacoby, and A. A. Medeiros. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemother* 1995; 39:1211-1233.
- (19) Jacoby GA, Munoz-Price LS. The New β -Lactamases. *N Engl J Med* 2005; 352(4):380-391.
- (20) Ambler RP. The Structure of β -Lactamases. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B, Biological Sciences* 1980; 289(1036):321-331.
- (21) Bradford PA. Extended-Spectrum β -Lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14(4):933-951.

- (22) Jiang X, Zhang Z, Li M, Zhou D, Ruan F, Lu Y. Detection of Extended-Spectrum β -Lactamases in Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50(9):2990-2995.
- (23) Chong Y, Ito Y, Kamimura T. Genetic evolution and clinical impact in extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Infection, Genetics and Evolution* 2011; 11(7):1499-1504.
- (24) Suzuki S, Shibata N, Yamane K, Wachino Ji, Ito K, Arakawa Y. Change in the prevalence of extended spectrum β -lactamase producing *Escherichia coli* in Japan by clonal spread. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2009; 63(1):72-79.
- (25) Nasa P, Juneja D, Singh O, Dang R, Singh A. An observational study on bloodstream extended spectrum β -lactamases infection in critical care unit: Incidence, risk factors and its impact on outcome. *European Journal of Internal Medicine* 2011; Jul.
- (26) Saely S, Kaye KS, Fairfax MR, Chopra T, Pogue JM. Investigating the impact of the definition of previous antibiotic exposure related to isolation of extended spectrum β -Lactamase producing *Klebsiella pneumoniae*. *American Journal of Infection Control* 2011; 39(5):390-395.
- (27) Pitout JD, Laupland KB. Extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: an emerging public-health concern. *The Lancet Infectious Diseases* 2008; 8(3):159-166.
- (28) Tran QT, Dupont M, Lavigne JP et al. Occurrence of Efflux Mechanism and Cephalosporinase Variant in a Population of *Enterobacter aerogenes* and *Klebsiella pneumoniae* Isolates Producing Extended-Spectrum β -Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53(4):1652-1656.
- (29) Garcia-Sureda L, Juan C, Domenech-Sanchez A, Alberti S. Role of *Klebsiella pneumoniae* LamB Porin in Antimicrobial Resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55(4):1803-1805.
- (30) Chen LF, Chopra T, Kaye KS. Pathogens Resistant to Antibacterial Agents. *The Medical clinics of North America* 95[4], 647-676. 1-7-2011.
- (31) Garrec H, Drieux-Rouzet L, Golmard JL, Jarlier V, Robert J. Comparison of Nine Phenotypic Methods for Detection of Extended Spectrum β -Lactamase Production by *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol* 2011; 49(3):1048-1057.
- (32) Clinical Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twentieth Informational Supplement, M100-S15. Wayne (PA): CLSI; 2005.

- (33) Clinical Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twentieth Informational Supplement, M100-S19. Wayne (PA): CLSI; 2009.
- (34) Clinical Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twentieth Informational Supplement, M100-S20. Wayne (PA): CLSI; 2010.
- (35) Clinical Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twentieth Informational Supplement, M100-S21. Wayne (PA): CLSI; 2011.
- (36) Hawser SP, Badal RE, Hsueh Po-Ren. Comparison of CLSI 2009, CLSI 2010 and EUCAST cephalosporin clinical breakpoints in recent clinical isolates of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* from the SMART Global Surveillance Study. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2010; 36: 288–294.
- (37) Jarlier, V., M. H. Nicolas, G. Fournier, and A. Philippon. Extended broad-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer β -lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev. Infect. Disease* 1988; 10:867–878.
- (38) Drieux L, Brossier F, Sougakoff W, Jarlier V. Phenotypic detection of extended-spectrum β -lactamase production in *Enterobacteriaceae*: review and bench guide. *Clinical Microbiology and Infection* 2008; 14:90-103.
- (39) Leão RS, Pereira RHV, Folescu TW et al. KPC-2 Carbapenemase producing *Klebsiella pneumoniae* isolates from patients with Cystic Fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis* 2011; 10(2):140-142.
- (40) Nordmann P, Cuzon G, Naas T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *The Lancet Infectious Diseases* 2009; 9(4):228-236.
- (41) Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the Versatile β -Lactamases. *Clin Microbiol Rev* 2007; 20(3):440-458.
- (42) Bradford PA, Bratu S, Urban C et al. Emergence of Carbapenem-Resistant *Klebsiella* Species Possessing the Class A Carbapenem-Hydrolyzing KPC-2 and Inhibitor-Resistant TEM-30 β -Lactamases in New York City. *Clinical Infectious Diseases* 2004; 39(1):55-60.
- (43) Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ et al. Novel Carbapenem-Hydrolyzing β -Lactamase, KPC-1, from a Carbapenem-Resistant Strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45(4):1151-1161.

- (44) Virgincar N, Iyer S, Stacey A et al. *Klebsiella pneumoniae* producing KPC carbapenemase in a district general hospital in the UK. *Journal of Hospital Infection* 2011; 78(4):293-296.
- (45) Monteiro J, Santos AF, Asensi MD, Peirano G, Gales AC. First Report of KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae* Strains in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53(1):333-334.
- (46) Pavez M, Mamizuka EM, Lincopan N. Early Dissemination of KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae* Strains in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53(6):2702.
- (47) Peirano G, Seki LM, Val Passos VLc, Pinto MC, Guerra LR, Asensi MD. Carbapenem hydrolysing β -lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2009; 63(2):265-268.
- (48) Zavaski AP, Machado ABMP, de Oliveira KRP et al. KPC-2 producing *Enterobacter cloacae* in two cities from Southern Brazil. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2009; 34(3):286-288.
- (49) Seki LM, Pereira PS, de Souza MdP et al. Molecular epidemiology of KPC-2- producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Brazil: the predominance of sequence type 437. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2011; 70(2):274-277.
- (50) Tsakris A, Kristo I, Poulou A et al. Evaluation of Boronic Acid Disk Tests for Differentiating KPC Possessing *Klebsiella pneumoniae* Isolates in the Clinical Laboratory. *J Clin Microbiol* 2009; 47(2):362-367.
- (51) Foley SL, Lynne AM, Nayak R. Molecular typing methodologies for microbial source tracking and epidemiological investigations of Gram-negative bacterial foodborne pathogens. *Infection, Genetics and Evolution* 2009; 9(4):430-440.
- (52) Olive DM, Bean P. Principles and Applications of Methods for DNA-Based Typing of Microbial Organisms. *J Clin Microbiol* 1999; 37(6):1661-1669.
- (53) Silbert S, Pfaller MA, Hollis RJ, Barth AL, Sader HSM. Evaluation of Three Molecular Typing Techniques for Nonfermentative Gram Negative Bacilli. *Infection Control and Hospital Epidemiology* 2004; 25(10):847-851.
- (54) Andrei A, Zervos MJ. The Application of Molecular Techniques to the Study of Hospital Infection. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 2006; 130(5):662-668.
- (55) Versalovic J, Koeuth T, Lupski R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research* 1991; 19(24):6823-6831.

- (56) Van Belkum A, Struelens M, Visser A, Verbrugh H, Tibayrenc M. Role of Genomic Typing in Taxonomy, Evolutionary Genetics, and Microbial Epidemiology. *Clinical Microbiology Reviews* 2001,14 (3): 547–560.

CAPÍTULO II

Artigo: Distribuição da MIC de cefalosporinas em amostras de *Klebsiella pneumoniae*. A detecção de ESBL é necessária?

O Manuscrito abaixo foi elaborado segundo as normas da revista “*International Journal Antimicrobial Agents*” em anexo

Título: Distribuição da MIC de cefalosporinas em amostras de *Klebsiella pneumoniae*. A detecção de ESBL é necessária?

Title: Cephalosporins MIC distribution of *Klebsiella pneumoniae* species. ESBL detection is required?

Authors names and affiliations: Thatiany Cevallos Menegucci¹, Marina de Souza Bastos¹, Lourdes Botelho Garcia¹, Celso Luíz Cardoso¹, *Maria Cristina Bronharo Tognim¹

¹ Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Avenida Colombo 5790. CEP 87020-900. Maringá, Paraná, Brazil

Correspondent author: * Laboratório de Microbiologia, Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Avenida Colombo 5790. CEP 87020-900. Maringá, Paraná, Brazil. Phone: 55-44-3261-4952. Fax: 55-44-3261-4860. E-mail: mcbtognim@uem.br.

Título: Distribuição da MIC de cefalosporinas em amostras de *Klebsiella pneumoniae*. A detecção de ESBL é necessária?

Resumo: O objetivo deste trabalho foi correlacionar a MIC para cefalosporinas e carbapenêmicos e a presença de genes de ESBL e KPC em diferentes clones de *K. pneumoniae*. A confirmação da sensibilidade aos carbapenêmicos e cefalosporinas foi realizada pelo método de diluição em ágar. Os testes fenotípicos para pesquisa de ESBL e KPC foram realizados pelos testes de disco aproximação e teste de Hodge modificado. O teste genotípico para pesquisa de β -lactamases e a genotipagem foram realizados pela *Polymerase Chain Reaction* – PCR. De 92 cepas testadas, todas foram sensíveis ao imipenem e meropenem e nenhuma apresentou gene *bla*_{KPC}. O teste genotípico para presença de ESBL foi positivo para 59 amostras (64%). Das amostras positivas para genes de ESBL, 17 não apresentaram a expressão do fenótipo. Os genes mais prevalentes encontrados foram *bla*_{TEM} e *bla*_{CTX-M} associados em 42% das amostras. O clone mais prevalente foi representado por 15 amostras, isoladas num período de três meses, em três setores hospitalares diferentes sendo 73% positivas para ESBL. Nosso estudo demonstra que levando em consideração os parâmetros de farmacocinética-farmacodinâmica dos β -lactâmicos, as cefalosporinas poderiam ser utilizadas na presença de ESBL. No sentido de facilitar a liberação de laudos, ao utilizar os novos pontos de corte do CLSI, torna-se desnecessário a detecção de ESBL, entretanto os dados de disseminação de clones com ESBL positivas demonstram que esta pesquisa é necessária por razões epidemiológicas e para auxiliar no controle das infecções causadas por estas cepas.

Palavras – chave: *Klebsiella pneumoniae*, ESBL, cefalosporinas.

1 INTRODUÇÃO

Klebsiella pneumoniae é um importante patógeno hospitalar encontrado principalmente em unidade de terapia intensiva (UTI). Sua capacidade de permanecer no ambiente hospitalar e a multirresistência aos antimicrobianos apresentada por algumas amostras tem gerado grande preocupação em relação ao controle de infecções hospitalares ⁽¹⁾.

Extended spectrum β -lactamases (ESBL) são enzimas que possuem a capacidade de hidrolisar cefalosporinas de amplo espectro e são consideradas o principal mecanismo de resistência em *K. pneumoniae*. A presença de vários tipos de genes codificadores de ESBL determinam diferentes graus de afinidade para os antibióticos β -lactâmicos ⁽²⁾.

O tratamento de infecções causadas por bactérias produtoras de ESBL é baseado no uso de carbapenêmicos, entretanto, nos últimos anos amostras de *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemases (KPC) tem restringido o uso deste antimicrobiano e dificultado o tratamento destas infecções ⁽³⁾.

O “*Clinical and Laboratory Standards Institute*” - CLSI até o ano de 2009 recomendava o teste de detecção fenotípica de ESBL para amostras clínicas de *K. pneumoniae* e outras enterobactérias que apresentassem concentração inibitória mínima (CIM) igual ou superior a 2 $\mu\text{g/mL}$ para ceftriaxona ou cefotaxima ou ceftazidima ou cefpodoxima ou aztreonam ⁽⁴⁻⁵⁾. Em 2010 foram publicados os documentos M100-S20 e M100-S20-U os quais apresentavam reduções nos pontos de corte para o grupo das cefalosporinas e carbapenêmicos na família *Enterobacteriaceae*. Adotando-se esses novos critérios interpretativos, o tratamento de infecções causadas por enterobactérias seria baseado apenas no conhecimento da CIM para essas drogas, não havendo a necessidade da realização de testes fenotípicos para detecção de ESBL e KPC ⁽⁶⁻⁷⁾.

O presente estudo teve como objetivo correlacionar a concentração inibitória mínima para cefalosporinas e carbapenêmicos e a presença de genes de ESBL e KPC em diferentes

clones de *K. pneumoniae* isoladas no período de setembro de 2009 a dezembro de 2010 em um hospital terciário da região sul do Brasil e discutir a necessidade da detecção destas enzimas nos laboratórios clínicos.

2 MÉTODOS

2.1 Amostras bacterianas

Foram incluídos nesse estudo 92 isolados de *K. pneumoniae* provenientes de pacientes atendidos em um hospital terciário da região noroeste do Paraná, Brasil, no período de setembro de 2009 a dezembro de 2010.

Todas as amostras foram identificadas como *K. pneumoniae* no sistema automatizado Phoenix-BD (Becton e Dickinson, Sparks, USA). Os isolados foram estocados à temperatura de -20 °C até o momento de uso.

2.2 Teste de sensibilidade aos antimicrobianos

O teste de sensibilidade para os antimicrobianos amicacina, amoxicilina/ácido clavulânico, ampicilina, cefazolina, cefoxitina, cefepima, ceftazidima, ceftriaxona, ciprofloxacino, ertapenem, gentamicina, imipenem, levofloxacino, meropenem, nitrofurantoína, piperacilina/tazobactam, tetraciclina, tobramicina, e trimetoprim/sulfametoxazol foi realizado pelo sistema automatizado Phoenix-BD.

A sensibilidade aos carbapenêmicos (imipenem e meropenem), e às cefalosporinas de amplo espectro (ceftazidima, ceftriaxona e cefepime) foi confirmada pela metodologia de diluição em ágar segundo normas estabelecidas pelo CLSI no documento M07-A8 ⁽⁸⁾, e os critérios interpretativos de sensibilidade segundo as normas estabelecidas no documento M100-S21 ⁽⁹⁾. Os sais de antimicrobianos utilizados para o teste de diluição em ágar foram: imipenem (Tienam® - Merck Sharp & Dome), meropenem (Meronem® – AztraZeneca),

ceftazidima (Fortaz® - GlaxoSmithKline), ceftriaxona (Rocefin® - Roche) e cefepime (Maxcef® - Bristol).

2.3 Detecção fenotípica e genotípica de beta-lactamases

A detecção fenotípica de ESBL foi realizada pela técnica de aproximação de discos⁽¹⁰⁾, utilizando discos de amoxicilina adicionado de ácido clavulânico (20/10µg), aztreonam (30µg), cefpodoxima (10µg), ceftazidima (30µg) e ceftriaxona (30µg). Para detecção fenotípica de KPC foi utilizada a técnica de Hodge modificada, preconizado pelo CLSI, documento M100-S21⁽⁹⁾.

A detecção genotípica de β -lactamases foi realizada pelo método de PCR. A partir de uma cultura pura de *K. pneumoniae*, foi preparada uma suspensão bacteriana densa em microtubos contendo 200µL de água ultrapura. Em seguida, os tubos foram incubados à temperatura de 100°C por 15 minutos. Após este período de lise bacteriana, as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm por 5 minutos à temperatura ambiente. Uma alíquota de 1µL do sobrenadante contendo DNA bacteriano foi adicionado aos diferentes ensaios de PCR. A detecção dos genes de ESBL foi realizada pela técnica de PCR-Multiplex e os *primers* utilizados foram previamente descritos por Monstein *et al.*, 2007⁽¹¹⁾. A concentração de cada *primer* na mistura de PCR foi de 20 pico moles. Os parâmetros de ciclagem foram: 95 °C por 15 minutos, seguidos de 30 ciclos de 94 °C por um minuto, anelamento a 60 °C por um minuto e extensão a 72 °C por dois minutos.

A detecção do gene *bla*_{KPC} foi realizada utilizando-se a metodologia e os *primers* previamente descritos por Bradford *et al.*, 2004⁽¹²⁾.

Os produtos da amplificação da PCR para ESBL e KPC foram analisados em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídeo. Após corrida por 40 minutos à voltagem constante de 100 V, o gel foi visualizado e fotografado contra luz ultravioleta em transiluminador (LOCCUS® L-PIX HE).

2.4 Tipagem molecular – ERIC-PCR

As amostras de *K. pneumoniae* foram tipadas pela técnica de *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus* - ERIC-PCR segundo Silbert *et al.*, 2004 ⁽¹³⁾. Uma alíquota de 1 µl do DNA bacteriano extraído conforme descrito anteriormente foi utilizada em cada reação. A eletroforese foi realizada sob voltagem constante de 100V por duas horas de corrida. A interpretação dos padrões de bandas gerados pelo ERIC-PCR foi realizada utilizando-se o *software* Bionumerics, versão 6,5 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium). Para análise da similaridade dos isolados foi utilizado o coeficiente de Dice. Os isolados foram considerados pertencentes ao mesmo clone quando o coeficiente de similaridade foi igual a 0,80 ou maior ⁽¹⁴⁾.

3 RESULTADOS

3.1 Amostras bacterianas

Entre os isolados clínicos incluídos neste estudo, o maior número foi obtido da urina (38/92 – 42%), seguido de sangue (22/92 - 24%) e secreção traqueal (11/92 - 12%). Duas amostras foram isoladas de secreção de ferida (2%), duas de ponta de cateter (2%), uma de secreção cirúrgica (1%) e uma de lavado brônquico (1%). Quinze amostras vindas de swab de colonização também foram incluídas (15/92 – 16%).

O setor hospitalar onde houve maior isolamento de *K.pneumoniae* foi a UTI adulto (Setor 1 - 50/92 - 54%), seguida da ala referente a internamentos de pacientes atendidos pelo Sistema Único de Saúde - SUS (Setor 2 - 16/92 - 17%). Os setores de atendimento onde se encontram principalmente pacientes cirúrgicos (Setor 3) e o setor de atendimento a pacientes provenientes de planos de saúde e particulares, de caráter clínico e com cirurgias eletivas (Setor 4), apresentaram menor frequência de *K.pneumoniae* com 11% e 4% de isolamento respectivamente.

3.2 Teste de sensibilidade aos antimicrobianos

Os antimicrobianos mais efetivos foram imipenem e meropenem cuja sensibilidade encontrada foi de 100%, seguido de amicacina (85%), cefoxitina (73%), tetraciclina (65%), sulfametoxazol-trimetoprim (62%), levofloxacina e tobramicina (56%). O perfil de sensibilidade de todos antimicrobianos testados, assim como a diferença entre as taxas de sensibilidade entre amostras produtoras e não produtoras de ESBL estão descritos na Tabela 1.

Na tabela 2 são apresentadas às concentrações inibitórias mínimas (CIM) para cefalosporinas de amplo espectro nas amostras produtoras e não produtoras de ESBL. Entre as amostras produtoras, o CIM₅₀ para ceftriaxona e ceftazidima foi superior a 32µg/mL e para cefepima, foi igual a 16µg/mL. A CIM₉₀ foi superior a 32µg/mL para todas as cefalosporinas testadas. Nas amostras negativas para ESBL houve maior distância entre os valores de CIM₅₀ e CIM₉₀ sendo a CIM₅₀ menor que 0,25µg/mL para todas as cefalosporinas e a CIM₉₀ superior a 8µg/mL.

3.3 Detecção fenotípica e genotípica de β -lactamases

Todas as amostras apresentaram teste de Hodge modificado negativo, sendo todas negativas para presença do gene *bla*_{KPC} mesmo não apresentando sensibilidade ao ertapenem.

O teste fenotípico para presença de ESBL foi positivo para 51% das amostras. Em relação à pesquisa genotípica, nosso trabalho detectou a presença de um ou mais genes em 64% das amostras (59/92).

No total de amostras positivas para a pesquisa de algum gene de ESBL, 17(29%) não apresentaram a expressão do fenótipo e sete amostras positivas para o gene *bla*_{TEM} foram negativas para o teste de disco aproximação e eram sensíveis às cefalosporinas (CIM para ceftazidima e ceftriaxona $\leq 2\mu\text{g/mL}$). Três amostras mostraram resistência às cefalosporinas e inibição pelo ácido clavulânico e não apresentaram genes de ESBL mesmo em três pesquisas

repetidas. Do total de amostras testadas, cinco não apresentaram testes fenotípico e genotípico positivos, porém apresentaram resistência às cefalosporinas testadas.

O PCR *Multiplex* para ESBL detectou em 42% das amostras a associação de enzimas TEM e CTX-M, em 5% associação de TEM com SHV e em uma amostra a associação de CTX-M e SHV. Todas as amostras que apresentaram mais de um gene de ESBL foram resistentes tanto para ceftazidima como para cefotaxima e cefepime. A presença do gene *bla*_{TEM} isoladamente foi verificada em 39% das amostras (23/59), *bla*_{CTX-M} em 7% (4/59) e *bla*_{SHV} em 5% (3/59) (Figura 1). Dentre 30 amostras positivas para um único gene, 50% eram negativas fenotipicamente e nove sensíveis às cefalosporinas.

3.4 Tipagem molecular – ERIC-PCR

Foram verificados 21 clones distintos (A a U) entre as 92 amostras testadas. O clone J foi o predominante (15/92), seguido do clone Q (12/92), clone C (9/92), clone R (8/92), clone O (7/92), clones H e N (6/92), clone S (5/92) e clones E e T (4/92), conforme esquematizados na Figura 1. O clone U e os clones F e P apresentaram respectivamente dois e três representantes cada, e os clones A, B, D, G, I, K, L e M apresentaram apenas um representante cada.

O clone Q foi encontrado em cinco setores hospitalares diferentes, sendo sua presença verificada primeiramente em setembro de 2009, voltando a ser encontrado em maio, agosto e outubro de 2010. Das doze amostras pertencentes a esse clone, nove possuíam genes para ESBL.

O clone T foi caracterizado por amostras provenientes de secreção traqueal de pacientes hospitalizados na UTI durante o mês de dezembro de 2009, e todos carregavam dois tipos de ESBL (TEM e CTX-M).

O maior clone, denominado J, é representado por 73% de amostras produtoras de ESBL isoladas num período de três meses (setembro a novembro de 2009), encontradas tanto na UTI como nos setores 2 e 4 (Figura 1).

4 DISCUSSÃO

A presença de ESBL em isolados clínicos de *K.pneumoniae* por duas décadas foi utilizada como parâmetro para a recomendação do uso de carbapenêmicos e ainda para que o laboratório reportasse os laudos de resistência para todas as penicilinas e cefalosporinas independente da sensibilidade detectada *in vitro*. Em 2010, com o uso de novos pontos de corte estabelecidos pelo CLSI, isto se tornou desnecessário. No presente estudo, com a utilização dos novos pontos de corte, 71% das amostras de *K. pneumoniae* produtoras de ESBL possuíam CIM elevados para a cefalosporinas inviabilizando seu uso, entretanto 17 amostras portadoras dos genes *bla*_{TEM}, e *bla*_{SHV} foram sensíveis a estas drogas possibilitando o uso terapêutico das mesmas.

As amostras de *K. pneumoniae* isoladas consecutivamente e avaliadas neste estudo foram provenientes principalmente de infecções urinárias (38/92 – 42%), seguido de bacteremia (22/92 - 24%). Apesar de avaliado apenas um hospital a frequência de isolados nos diferentes sítios foi semelhante ao estudo publicado pelo programa MYSTIC-Brasil (*Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection - Brazil*) em 2003 ⁽¹⁵⁾. Entretanto, em outro estudo epidemiológico realizado pelo programa SENTRY (*Antimicrobial Surveillance Program*) na América Latina e Brasil, o sítio com maior número de isolados foi o sangue, seguido do trato respiratório baixo e a urina aparece em quarto lugar com 10% de todas as infecções ⁽¹⁶⁾.

A sensibilidade antimicrobiana de patógenos isolados em 2008 na América Latina incluindo *K. pneumoniae* produtoras e não produtoras de ESBL avaliada pelo grupo SMART

1 - “*Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends*” mostrou resultados semelhantes ao
2 obtidos no presente estudo em relação aos aminoglicosídeos e quinolonas, entretanto, para
3 cefalosporinas, como cefoxitina, ceftazidima e ceftriaxona os resultados foram diferentes. Em
4 nosso estudo, 42% e 70% das amostras positivas e negativas para presença de ESBL
5 respectivamente foram sensíveis à cefoxitina, enquanto que no estudo publicado pelo
6 SMART, a porcentagem encontrada foi de 61,4% e 87,2%, respectivamente. Para ceftazidima,
7 o SMART detectou 14% e 96,8% de sensibilidade nas amostras positivas e negativas para
8 ESBL e nosso estudo pode detectar 22% e 85% de sensibilidade respectivamente. A
9 sensibilidade encontrada para ceftriaxona em nosso estudo foi de 13% e 82% entre as
10 amostras positivas e negativas para ESBL, já no estudo publicado pelo SMART a
11 sensibilidade encontrada foi de 3,5% e 95,7%⁽¹⁷⁾.

12 Apesar das ESBLs terem sido descritas no início dos anos 80, somente no final da
13 década de 90 e início do ano 2000 elas passaram a representar um problema clínico
14 significativo. Relatos de falha terapêutica associados ao uso de cefalosporinas de amplo
15 espectro no tratamento das infecções causadas por enterobactérias produtoras dessas enzimas
16 foram publicados⁽¹⁸⁾.

17 Desta forma, em 2005, o CLSI emitiu instruções para a detecção de ESBL no
18 laboratório de microbiologia clínica, recomendando a execução do teste de detecção
19 fenotípica de ESBL para amostras clínicas de *K. pneumoniae* e outras enterobactérias que
20 apresentassem CIM ≥ 2 $\mu\text{g/mL}$ para ceftriaxona, ou cefotaxima, ou ceftazidima, ou
21 cefpodoxima ou aztreonam⁽⁴⁾. Assim, até o ano de 2009, amostras que tivessem entre
22 $2\mu\text{g/mL}$ e $8\mu\text{g/mL}$ para cefalosporinas apesar de serem consideradas sensíveis deveriam ser
23 encaminhadas para o teste fenotípico de ESBL e caso este fosse positivo, os resultados dos
24 laudos deveriam ser editados, mudando a categoria de cefalosporinas e penicilinas de amplo
25 espectro para resistentes, sendo nestes casos os carbapenêmicos a melhor opção terapêutica⁽⁵⁾.

Entretanto em 2010, o CLSI em seus documentos M100-S20 e M100-S20-U, reduziu os pontos de corte para o grupo das cefalosporinas e carbapenêmicos para isolados pertencentes à família *Enterobacteriaceae* e retirou a recomendação do teste fenotípico para detecção de ESBL e KPC sendo liberados os CIMs sem a edição de laudos ⁽⁶⁻⁷⁾. Adotando-se esses novos critérios interpretativos, o tratamento de infecções causadas por enterobactérias, produtoras ou não de ESBL, seria baseado apenas no conhecimento da CIM podendo assim, serem utilizadas as cefalosporinas na terapia de isolados ESBL positivos caso as cepas fossem sensíveis a estas drogas.

De acordo com a tabela 2, observamos isolados positivos para genes de ESBL apresentando CIM inferior a 0,5µg/mL para cefalosporinas de ampla espectro e ao contrário, amostras com CIM superior a 32µg/mL com ausência de genes ESBL. Nestes casos poderíamos realmente afirmar que a determinação da CIM, independentemente da presença de genes ESBL, seria suficiente ao tratamento concordando com o CLSI de 2010 e 2011 onde descarta a necessidade de detecção de ESBL.

Outro fato que nos aponta positivamente levar em consideração a CIM independente da presença de ESBL para terapia é que, até mesmo os trabalhos que observaram falhas terapêuticas e aumento significativo da mortalidade no uso de cefalosporinas para o tratamento de pacientes com bacteremia por *K. pneumoniae* produtora de ESBL determinaram que a falha terapêutica ocorreu quando a CIM para as cefalosporinas era maior ou igual a 8µg/ml. Para estes casos, o uso dos novos pontos de corte do CLSI caracterizaria essas amostras como resistentes, eliminando a indicação do uso de cefalosporinas para tal tratamento ⁽¹⁸⁾.

Estudos baseados em farmacocinética-farmacodinâmica (PK/PD) dos antimicrobianos determinam que, para β-lactâmicos, o tempo que o antimicrobiano se mantém acima da CIM está relacionado à sua eficácia, assim como, quanto maior a razão da concentração do

antimicrobiano sobre a CIM do microrganismo se relaciona a eficácia para outras classes de drogas ⁽¹⁹⁾. Assim, do ponto de vista clínico, o conhecimento da CIM verdadeira é muito importante para o tratamento e independe da realização de testes fenotípicos para a pesquisa de mecanismos de resistência.

Nossos dados demonstram com clareza pela distribuição das CIMs na Tabela 2, que ao menos 10% das cepas produtoras de ESBL possuem CIMs muito baixas, inferiores a 0,25µg/ml para todas as cefalosporinas de amplo espectro e, nestes casos, o uso destes antimicrobianos no tratamento de infecções causadas por estas amostras poderia ter sido otimizado independente da presença da ESBL. Entretanto, apenas a experiência clínica demonstrando sucesso terapêutico com o uso de cefalosporinas em amostras produtoras de ESBL com CIMs baixas para cefalosporinas é que poderia validar tal recomendação.

Uma revisão publicada em 2008, a qual analisa os principais estudos observacionais sobre tratamento de infecções causadas por cepas produtoras de ESBL e tratadas com antimicrobianos com sensibilidade *in vitro* conhecida concluiu que não há estudos comparativos suficientes para recomendar o tratamento dessas infecções com cefalosporinas, sendo os carbapenêmicos ainda a melhor escolha para o tratamento de infecções sanguíneas, porém as quinolonas podem apresentar resultados semelhantes se o isolado for sensível *in vitro* ⁽²⁰⁾. Dados mais recentes demonstram que o tratamento de infecções causadas por bactérias produtoras de ESBL foi mais efetivo com o uso de carbapenêmicos ou outra droga para a qual a cepas isoladas mostrasse sensibilidade *in vitro*, incluindo-se as penicilinas associadas a inibidores de β-lactamases e as quinolonas ⁽²¹⁾.

Após o surgimento e disseminação das enzimas carbapenemases pelo mundo, principalmente do tipo *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC), deve-se considerar de uma forma mais cautelosa o uso de carbapenêmicos ⁽³⁾. Em nosso estudo nenhum isolado, apresentou o teste de Hodge modificado positivo ou o gene *bla*_{KPC}, mesmo nas amostras com

resistência intermediária ou plena ao ertapenem. Dessa maneira, verificamos que o teste de Hodge modificado foi mais indicado para excluir a presença de KPC do que um teste de indicação da presença destas enzimas ⁽²²⁾.

As cefamicinas, incluindo cefoxitina e cefotetan são estáveis à hidrólise por ESBL produzidas por enterobactérias, porém há um cuidado com o uso desses agentes devido sua relativa capacidade em diminuir a expressão das proteínas de membrana e sua alta capacidade de indução de outras β -lactamases como ampicilinase - AmpC ⁽²⁰⁾.

Não podemos esquecer que uma das desvantagens da determinação da CIM é que na maioria das vezes apenas uma ou duas colônias são testadas e subpopulações resistentes podem dessa maneira não ser detectadas ocorrendo falhas terapêuticas ⁽²³⁾. Outro fato muito importante a ser considerado é que se fizemos apenas a determinação da CIM sem a pesquisa de ESBL teríamos uma grande perda dos dados epidemiológicos, a respeito da presença de ESBL nos hospitais, além do fato de que estas enzimas são mediadas por genes plasmidiais e, a não detecção da presença das mesmas em infecções poderia influenciar a utilização de medidas de barreira tão importantes para o controle das infecções hospitalares ⁽²⁴⁾.

De acordo com a Figura 1, quando analisada a presença de ESBL, 59 amostras (64%) apresentaram genes para ESBL e a maior frequência desses genes foi encontrada em amostras provenientes da UTI (32/59 – 54%) corroborando com outros estudos ⁽²⁵⁾.

O teste fenotípico foi positivo para 45 amostras (49%) enquanto o genotípico foi positivo para 59 isolados (64%). Das amostras positivas para a pesquisa de algum gene de ESBL 17 (29%) não apresentaram a expressão do fenótipo, o que pode ser explicado pelo fato do teste fenotípico utilizado ser de difícil e subjetiva leitura, já que ele é baseado na interpretação visual do sinergismo entre as drogas utilizadas ⁽²⁶⁾.

O fato de três amostras apresentarem teste fenotípico de ESBL positivo e não apresentaram genes decodificadores destas enzimas mesmo em três pesquisas repetidas, pode

ser explicado pelo fato da PCR *multiplex* utilizada no presente estudo detectar apenas as três principais famílias de enzimas ESBL (TEM, CTX-M e SHV). No entanto, existem outras enzimas que apresentam atividade de ESBL, como BES-1, CME-1, GES-1, IBI-1, IBI-2, PER-1, PER-2, VEB-1, SFO-1 e derivados da OXA, sendo estas também encontradas com menor frequência ⁽²⁷⁾.

Por outro lado a presença de gene do tipo *bla*_{TEM} em sete amostras com CIM para ceftazidima e ceftriaxona $\leq 2\mu\text{g/mL}$ e teste fenotípico negativo pode ser devido ao fato do *primer* utilizado ser capaz de detectar a presença de TEM-1 e TEM-2 que são β -lactamases de espectro reduzido. Para confirmar a presença de ESBL nessas amostras, deveria ter sido realizado o sequenciamento ou a detecção do ponto isoelétrico de cada enzima detectada, a fim de se excluir a presença de enzimas TEM-1 e TEM-2 (Figura 1).

Do total de amostras testadas, cinco apresentaram resistência às cefalosporinas sem apresentarem testes fenotípico e genotípico positivos para ESBL e, neste caso a principal explicação é a super expressão de AmpC associada ou não à perda de porina.

De acordo com os tipos de genes encontrados em nosso estudo a associação dos genes *bla*_{TEM} e *bla*_{CTX-M} foi a mais prevalente, sendo detectada em 42% das amostras (25/59), seguido da associação *bla*_{TEM} e *bla*_{SHV} em 5% das amostras (3/59). Apenas em uma amostra foi detectado a associação *bla*_{CTX-M} e *bla*_{SHV}. Em relação aos genes isolados, o gene *bla*_{TEM} foi o mais prevalente em 39% das amostras (23/59), seguido do *bla*_{CTX-M} em 7% (4/59) e *bla*_{SHV} em 5% (3/59). A resistência foi maior em amostras que apresentaram dois genes em relação àquelas que possuíam apenas um gene (Figura 1).

Resultados um pouco distintos ao nosso, foi verificado em um estudo brasileiro publicado em 2007 ⁽²⁸⁾ e também em um estudo africano, publicado em 2009 ⁽²⁹⁾. De acordo com os dados brasileiros, 74% das amostras produtoras de ESBL apresentaram gene do tipo *bla*_{TEM}, seguido de *bla*_{CTX-M} (69% - 16/23) e da associação dos genes *bla*_{TEM} e *bla*_{CTX-M} (52% -

12/23). Já o estudo africano, obteve 87% de amostras positivas para ESBL, em que 36% possuíam os três genes concomitantemente. O gene isolado mais prevalente foi o *bla*_{TEM} (24%), seguido do *bla*_{SHV} (4%). A presença de dois genes concomitantes foi detectada em 24% das amostras, sendo 12% de amostras produtoras de *bla*_{TEM} associado ao *bla*_{CTX-M} e 12% produtoras de *bla*_{TEM} associado ao *bla*_{SHV}.

Os dados epidemiológicos de nosso estudo mostram uma diversidade clonal entre os isolados de *K. pneumoniae* produtoras ou não de ESBL sendo verificado em 92 amostras a presença de 21 clones distintos (A a U) sendo os principais demonstrados na Figura 1. O maior clone, denominado J, representado por 73% de amostras produtoras de ESBL isoladas num período de três meses, disseminadas tanto no setor 1 como nos setores 2 e 4 pode sugerir que a presença de ESBL na maioria dos isolados pertencentes a este clone pode ter facilitado sua disseminação pelos diferentes setores hospitalares uma vez que estas cepas possuem resistência aumentada aos antimicrobianos (Figura 1).

Estudos demonstram que *K. pneumoniae* produtoras de ESBL podem se disseminar de maneira intra e inter hospitalar havendo clones encontrados em diferentes regiões do mundo ⁽³⁰⁾. No presente estudo, a disseminação entre diferentes setores hospitalares também foi verificada em outros clones, como o clone Q, o qual apresentou isolados em cinco setores hospitalares.

Métodos de tipagem molecular são essenciais para estabelecer o perfil epidemiológico de infecções hospitalares, pois muitas vezes são demonstrados microrganismos com estreita relação clonal tendo fonte ou origem comum, apresentando as mesmas características bioquímicas, os mesmos fatores de virulência e características genômicas e quando isto ocorre medidas de barreira devem ser implementadas para possivelmente bloquear a disseminação destas cepas ⁽³⁰⁾.

1 Em nosso estudo verificamos que o clone T foi responsável por uma rápida e curta
2 disseminação. Sua presença foi verificada em quatro pacientes da UTI, todos isolados de
3 secreção traqueal. As amostras deste clone apresentavam alta similaridade e possuíam dois
4 tipos de enzimas e eram altamente resistentes as cefalosporinas. Os achados demonstram que
5 os clones de maior disseminação foram aqueles onde a maior parte das amostras eram ESBL
6 positivas demonstrando a maior facilidade de disseminação destas cepas independentemente
7 do seu perfil de sensibilidade.

8 Em conclusão, o nosso estudo demonstra que levando em consideração os parâmetros
9 de PK/PD dos β -lactâmicos, as cefalosporinas poderiam ser utilizadas mesmo na presença de
10 ESBL, pois em sete amostras produtoras de ESBL a CIM para maioria das cefalosporinas foi
11 abaixo de 0,25 μ g/mL. Assim, no sentido de facilitar a liberação de laudos microbiológicos,
12 acreditamos que ao utilizar os novos pontos de corte do CLSI, o laboratório não teria a
13 necessidade de detecção de ESBL para direcionar o tratamento, entretanto os dados de
14 disseminação de clones com ESBL positivas demonstram que esta pesquisa é necessária por
15 razões epidemiológicas podendo ser realizada paralelamente, sendo emitidos laudos
16 alternativos para auxiliar no controle de infecções hospitalares por *K. pneumoniae*.

17

18

19

20

21

22

23

Tabela 1. Perfil de sensibilidade do total de amostras para os principais antimicrobianos e perfil de sensibilidade de cepas produtoras e não produtoras de ESBL

Antimicrobianos testados	Sensibilidade geral	% de cepas sensíveis	
	Número sensível / Número de amostras testadas (% de sensibilidade)	ESBL positivas	ESBL negativas
Amicacina	75/89 (85)	74	91
Amoxicilina/Ác. Clavulânico	36/89 (41)	17	76
Ampicilina	1/87 (1)	ND	3
Cefazolina	34/85 (40)	17	73
Cefoxitina	48/66 (73)	42	70
Ceftriaxona†	35/92 (62)	13	82
Ceftazidima†	41/92 (40)	22	85
Cefepima†	48/92 (52)	32	88
Ciprofloxacino	42/90 (47)	25	82
Ertapenem	ND	ND	ND
Gentamicina	40/88 (45)	24	79
Levofloxacino	47/85 (56)	34	82
Nitrofurantoína	14/48 (29)	10	24
Piperacilina/Tazobactam	41/88 (47)	22	88
Tetraciclina	40/61 (65)	34	61
Tobramicina	48/85 (56)	34	85
Sulfametoxazol/Trimetoprim	53/86 (62)	70	91

† - Perfil de sensibilidade obtido por ágar diluição; os demais foram obtidos pelo método automatizado Phoenix-BD; ND – valores encontrados igual a zero.

Tabela 2- Distribuição das CIM para Ceftriaxona, Ceftazidima e Cefepima entre todas as amostras testadas e cepas produtoras ou não de ESBL

Antimicrobiano		CIM µg/mL / % Cumulativa									
		≤0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	≥32
Ceftriaxona	Amostras Total	30	5	ND	ND	ND	ND	1	ND	ND	56
		33%	38%					39%			100%
	ESBL Positivo	6	2	ND	ND	ND	ND	1	ND	ND	50
		10%	13%					15%			100%
	ESBL Negativo	24	3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	6
		73%	82%								100 %
Ceftazidima	Amostras Total	1	19	12	1	4	3	1	10	8	33
		1%	22%	35%	36%	40%	43%	45%	55%	64%	100%
	ESBL Positivo	ND	4	3	1	1	3	1	8	8	30
			7%	12%	14%	15%	20%	22%	36%	49%	100%
	ESBL Negativo	1	15	9	ND	3	ND	ND	2	ND	3
		3%	48%	76%		85%			90%		100%
Cefepima	Amostras Total	21	13	4	1	ND	ND	4	5	13	31
		23%	37%	41%	42%			47%	52%	66%	100,00%
	ESBL Positivo	6	1	4	1	ND	ND	3	4	11	29
		10%	12%	19%	20%			25%	32%	51%	100%
	ESBL Negativo	15	12	ND	ND	ND	ND	1	1	2	2
		45%	82%					85%	88%	94%	100%

ND – Valores obtidos iguais a zero.

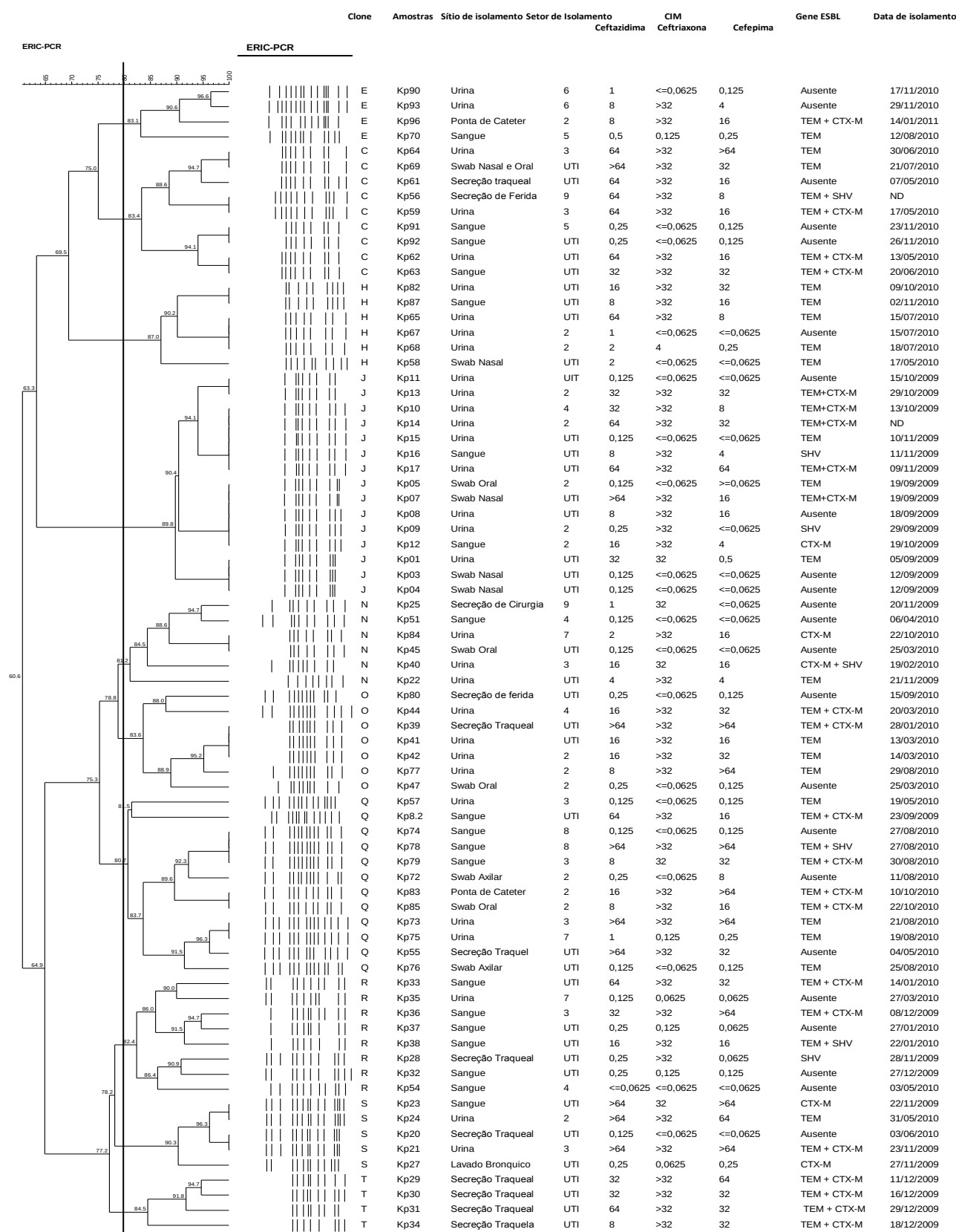


Figura 1. Dendrograma obtido pelo “*Enterobacterial repetitive intergenic consensus*” – Polymerase Chain Reaction (ERIC-PCR) dos clones mais comuns de *K. pneumoniae* isolados da unidade hospitalar

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS:

- (1) Orsi GB, García-Fernández A, Giordano A et al. Risk factors and clinical significance of ertapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in hospitalised patients. *J Hosp Infect* 2011; 78(1):54-58.
- (2) Bush K, Jacoby GA. Updated Functional Classification of β -Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54(3):969-976.
- (3) Nordmann P, Cuzon G, Naas T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase producing bacteria. *Lancet Infect Dis* 2009; 9(4):228-236.
- (4) Clinical Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twentieth Informational Supplement. Document M100-S15. Wayne, PA: CLSI; 2005.
- (5) Clinical Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twentieth Informational Supplement. Document M100-S19. Wayne, PA: CLSI; 2009.
- (6) Clinical Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twentieth Informational Supplement. Document M100-S20. Wayne, PA: CLSI; 2010.
- (7) Clinical Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twentieth Informational Supplement. Document M100-S20 - U. Wayne, PA: CLSI; 2010.
- (8) Clinical and Laboratory Standards Institute. 2009. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. Document M7-A8, vol. 29, No.2, 2009.

- (9) Clinical Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twentieth Informational Supplement. Document M100-S21. Wayne, PA: CLSI; 2011.
- (10) Jarlier V, Nicolas MH, Fournier G, Philippon A. Extended broad-spectrum β -lactamases conferring transferable resistance to newer β -lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. Rev Infect Dis 1988; 10:867–878.
- (11) Monstein HJ, Östholm-Balkhed A, Nilsson MV, Nilsson M, Dornbusch K, Nilsson L. E. Multiplex PCR amplification assay for the detection of *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM} and *bla*_{CTX-M} genes in *Enterobacteriaceae*. APMIS. 2007;115: 1400–8
- (12) Bradford PA, Bratu S, Urban C et al. Emergence of Carbapenem-Resistant *Klebsiella* Species Possessing the Class A Carbapenem-Hydrolyzing KPC-2 and Inhibitor-Resistant TEM-30 β -Lactamases in New York City. Clin Infect Dis 2004; 39(1):55-60.
- (13) Silbert S, Pfaller MA, Hollis RJ, Barth AL, Sader HSM. Evaluation of Three Molecular Typing Techniques for Nonfermentative Gram Negative Bacilli. Infec Control Hosp Epidemiol 2004; 25(10):847-851.
- (14) Van Belkum A, Struelens M, Visser A, Verbrugh H, Tibayrenc M. Role of Genomic Typing in Taxonomy, Evolutionary Genetics, and Microbial Epidemiology. Clin Microbiol Rev 2001;14 (3): 547–560
- (15) Kiffer C, Hsiung A, Oplustil C et al. Antimicrobial susceptibility of Gram-negative bacteria in Brazilian hospitals: the MYSTIC Program Brazil 2003. Braz J Infect Dis 2005; 9:216-224.
- (16) Sader HS, Jones RN, Gales AC, Silva JB, Pignatari AC. SENTRY antimicrobial surveillance program report: latin american and brazilian results for 1997 through 2001. Braz J Infect Dis 2004; 8:25-79.

- (17) Villegas MV, Blanco MG, Sifuentes-Osornio J, Rossi F. Increasing prevalence of extended spectrum β -lactamase among Gram-negative bacilli in Latin America: 2008 update from the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART). *Braz J Infect Dis* 2011; 15:34-39.
- (18) Paterson DL, Ko WC, Von Gottberg A, Casellas JM, Mulazimoglu L, Klugman KP, Bonomo RA, Rice LB, McCormack JG, Yu VL. Outcome of cephalosporin treatment for serious infections due to apparently susceptible organisms producing extended-spectrum β -lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol*. 2001 Jun; 39(6):2206-12.
- (19) Scaglione F, Paraboni L. Pharmacokinetics/pharmacodynamics of antibacterials in the Intensive Care Unit: setting appropriate dosing regimens. *Int J of Antimicrob Agents* 2008; 32: 294–301.
- (20) Pitout JD, Laupland KB. Extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: an emerging public-health concern. *Lancet Infect Dis* 2008; 8(3):159-166.
- (21) De Rosa FG, Pagani N, Fossati L, Raviolo S, Cometto C, Cavallerio P, et al. The effect of inappropriate therapy on bacteremia by ESBL-producing bacteria. *Infection* (2011) 39:555–561
- (22) Anderson KF, Lonsway DR, Rasheed JK et al. Evaluation of Methods To Identify the *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase in *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol* 2007; 45(8):2723-2725.
- (23) Olofsson SK, Cars O. Optimizing Drug Exposure to Minimize Selection of Antibiotic Resistance. *Clin Infect Dis* 2007; 45:S129–36
- (24) Andrei A, Zervos MJ. The Application of Molecular Techniques to the Study of Hospital Infection. *Arch Pathol Lab Med* 2006; 130(5):662-668.

- (25) Cassettari VC, da Silveira IR, Dropa M et al. Risk factors for colonisation of newborn infants during an outbreak of extended-spectrum β -lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* in an intermediate-risk neonatal unit. J Hosp Infec 2009; 71(4):340-347.
- (26) Garrec H, Drieux-Rouzet L, Golmard JL, Jarlier V, Robert J. Comparison of Nine Phenotypic Methods for Detection of Extended Spectrum β -Lactamase Production by *Enterobacteriaceae*. J Clin Microbiol 2011; 49(3):1048-1057.
- (27) Stürenburg E, Mack D. Extended-spectrum β -lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory, therapy, and infection control J Infect 2003; 47(4):273-295.
- (28) Minarini LAR, Gales AC, Palazzo ICV, Darini ALC. Prevalence of Community-Occurring Extended Spectrum β -Lactamase Producing *Enterobacteriaceae* in Brazil. Curr Microbiol 2007; 54: 335–341.
- (29) Ehlers M M, Veldsman C, Makgotlho EP, Dove MG, Hoosen AA, Kock MM. Detection of *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM} and *bla*_{CTX-M} antibiotic resistance genes in randomly selected bacterial pathogens from the SteveBiko Academic Hospital. FEMS Immunol Med Microbiol 2009; 56: 191–196.
- (30) Olive DM, Bean P. Principles and Applications of Methods for DNA-Based Typing of Microbial Organisms. J Clin Microbiol 1999; 37(6):1661-1669.

CAPÍTULO III

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Conclusões:

1. O perfil de resistência dos isolados de *Klebsiella pneumoniae* do hospital estudado é elevado, principalmente em cepas produtoras de ESBL;
2. Todas as amostras apresentaram teste de Hodge modificado negativo sendo todas negativas para presença do gene *bla_{KPC}* mesmo não apresentando sensibilidade ao ertapenem, assim percebemos pelos nossos dados que o teste de Hodge modificado foi importante para excluir a presença de KPC.
3. O teste fenotípico para detecção de ESBL foi positiva para 50% das amostras, enquanto que o genotípico 64%;
4. Os genes específicos para ESBL mais prevalentes foram *bla_{TEM}* associado ao *bla_{CTX-M}* (42%), em 5% *bla_{TEM}* em associação com *bla_{SHV}* e uma amostra apresentando a associação *bla_{CTX-M}* e *bla_{SHV}*;
5. Cepas produtoras de mais de um tipo de gene de resistência para ESBL apresenta taxas de sensibilidade inferior às cefalosporinas quando comparadas às amostras produtoras de apenas um gene,
6. Os genes isolados foram verificados em 39% das amostras (23/59) para *bla_{TEM}*, 7% das amostras (4/59) *bla_{CTX-M}* e 5%, *bla_{SHV}*. (3/59). Dessas amostras, 50% (15/30) apresentaram testes fenotípicos negativos e 9 delas, sensíveis para as cefalosporinas.
7. 13%, 22% e 32% das amostras ESBL positivas apresentaram sensibilidade à ceftriaxona, ceftazidima e cefepima respectivamente, assim como, apenas 80% das amostras não produtoras de ESBL apresentaram sensibilidade a essas drogas;
8. Do total de amostras produtoras do gene para ESBL, 15 não apresentaram a expressão do fenótipo
9. Os resultados de tipagem molecular revelaram a presença de 21 clones distintos, sendo o mais prevalente apresentando 15 amostras,

Limitações do estudo

Análise da terapia realizada em pacientes com presença ou não de ESBL, afim de verificar a sua eficácia quando tratados ou não com carbapenêmicos.

Perspectivas futuras:

1. Divulgação do estudo junto a CCIH e a equipe médica seria de suma importância para uma vigilância hospitalar mais atuante e responsável, prevenindo surtos, reduzindo a incidência de infecções nosocomiais causados por infecções por *Klebsiella pneumoniae* produtora de ESBL.
2. Analisar a presença de amostras de origem comunitária produtoras ou não do genótipo de ESBL, além de verificar a presença de cepas genotipicamente idênticas entre amostras hospitalares e comunitárias;
3. Verificar o tipo de tratamento adotado em casos de infecções por ESBL, afim de otimizar a terapia antimicrobiana, evitando falhas terapêuticas e gastos hospitalares desnecessários;

ANEXOS

Normas para publicação no periódico: International Journal of Antimicrobial Agents

Guide for Authors

These guidelines generally follow the "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals". The complete document appears at <http://www.icmje.org>.

Submission

The Journal now accepts online submissions only. Manuscripts can be submitted at <http://ees.elsevier.com/ijaa/>. Once the manuscript has been uploaded, our system automatically generates an electronic pdf proof, which is then used for reviewing. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revisions, will be managed via this system. Authors may also track the progress of their paper using this system to final decision.

If you have any problems submitting your paper through this system, please contact the Editorial Office on: e-mail: ijaa@elsevier.com; tel: +44 (0)1865 843270; fax: +44 (0)1865 843992.

Journal Publishing Agreement

Upon acceptance of an article, authors will be asked to sign a "Journal Publishing Agreement" (for more information on this and copyright see <http://www.elsevier.com/authors>).

Acceptance of the agreement will ensure the widest possible dissemination of information. An e-mail (or letter) will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form.

If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: contact Elsevier's Rights Department, Philadelphia, PA, USA: phone (+1) 215 239 3804, fax (+1) 215 239 3805, e-mail healthpermissions@elsevier.com. Requests may also be completed online via the Elsevier homepage (<http://www.elsevier.com/locate/permissions>).

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the Publisher.

Authorship

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted.

Article types

The following types of manuscripts are routinely accepted (please note that word count is

from abstract to references but excluding references):

Original Articles: The form of these articles is discussed fully below; an abstract is required. They should be no longer than 4000 words and 30 references (as above, please note that word count also excludes tables, figures and legends). IJAA will be happy to consider papers of veterinary origin as long as there is some linkage of the scientific work back to human antibiotic use.

Letters: Headings should not be used in a letter; no abstract or keywords are required. The text should be no more than 800 words; there should be a maximum of 5 references and one table or figure may be included.

Reviews: An abstract and keywords are required. The text should be divided into sections by suitable headings. Tables and figures may be used as appropriate for the text. They should be no longer than 5000 words.

Opinions and Commentaries: These take the same form as a review.

Short Communications: These should be no more than 2,500 words, with up to 15 references and a maximum of 3 figures or tables.

Leaders: These tend to be invited papers but unsolicited Leaders are welcome. There are no abstract, keywords or section headings.

It is strongly advised that Authors provide a list of 4 or 5 potential reviewers (e-mail, phone and fax numbers) who are knowledgeable in the subject matter, have no conflict of interest, and are likely to agree to review the manuscript. Please ensure that 1 of the potential reviewers is from a different country to the authors.

Submission Checklist

Please ensure that the following are including in your submission:

- " One author designated as corresponding author:
- " Their E-mail address
- " Full postal address
- " Telephone and fax numbers
- " Keywords
- "Cover letter addressed to the Editor, introducing the manuscript and confirming that it is not being submitted concurrently elsewhere"
- " All figure captions
- " All tables (including title, description, footnotes)
- " All necessary files have been uploaded as attachments to the e-mail
- " Manuscript has been spell checked
- " All text pages have been numbered
- " References are in the correct format for this journal
- " All references mentioned in the Reference list are cited in the text and vice versa
- " Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- " Colour figures are clearly marked as being intended for colour reproduction or to be reproduced in black-and-white

Manuscripts

Please type all pages with double spacing and wide margins on one side of the paper. Words to be printed in italics are to be underlined. Title page, abstract, tables, legends to figures and reference list should each be provided on separate pages of the manuscript.

Use a true type font such as Times New Roman or Arial. The text should be in single-column format. Number the pages. In order to help our reviewers please number each line of the manuscript. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. Do not embed 'graphically designed' equations or tables, but prepare these using the facility in Word or as a separate file in Excel. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. Do not prepare tables in Powerpoint. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also: <http://www.elsevier.com/authors>). Do not import the figures into the text file but, instead, indicate their approximate locations directly in the electronic text and on the manuscript. See also the section on *illustrations*.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the spellchecker.

The title page should include: the title, the name(s) and affiliation(s) of the author(s), an address for correspondence, and telephone/fax numbers for editorial queries. All articles should include an Abstract (a single paragraph) of no more than 250 words and 3-6 key words for abstracting and indexing purposes.

Please **do not split** the article into separate files (title page as one file, text as another, etc.). Ensure that the letter 'l' and digit '1' (also letter 'O' and digit '0') have been used properly, and structure your article (tabs, indents, etc.) consistently. Characters not available on your computer (Greek letters, mathematical symbols, etc.) should not be left open but indicated by a unique code (e.g., α , @, #, etc., for the Greek letter). Such codes should be used consistently throughout the entire text. Please make a list of such codes and provide a key. Do not allow your computer to introduce word splits and do not use a 'justified' layout. Please adhere strictly to the general instructions on style/arrangement and, in particular, the reference style of the journal. It is very important that you save your file in the standard format for the program you are using. If your computer features the option to save files 'in flat ASCII', please do not use it.

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Italics are not to be used for expressions of Latin origin, for example, *in vivo*, *et al.*, *per se*. Use decimal points (not commas); use a space for thousands (10 000 and above).

Provide the following data in your submission (in the order given). This is required for all types of paper submitted.

Title. Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

Author names and affiliations. Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name.

Corresponding author. Clearly indicate who is willing to handle correspondence at all stages

of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address.**

Present/permanent address. If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract. A concise and factual abstract is required (maximum length 250 words). The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. Do not cite references in the abstract. Non-standard or uncommon abbreviations should be avoided in the abstract, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Keywords. Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using British spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations. Define abbreviations that are not standard in this field at their first occurrence in the article: in the abstract but also in the main text after it. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Subdivision of the article. Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ?), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text.' Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction. State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Experimental/Materials and methods. Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Include in figure legends and table texts technical details of methods used, while describing the methods themselves in the main text.

Results/Discussion. This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate in a Short Communication but not in an Original Article. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Acknowledgement. Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. When the work included in a paper has been supported by a grant from any source, this must be indicated. A connection of any author with companies producing any substances or

apparatus used in the work should be declared. Authors will be asked to respond to a form e-mailed to them when their paper is accepted (see the 'conflict of interest' section below). All contributors who do not meet the criteria for authorship as defined above should be listed in an acknowledgements section. Examples of those who might be acknowledged include a person who provided purely technical help, writing assistance, or a department chair who provided only general support. Authors should disclose whether they had any writing assistance and identify the entity that paid for this assistance.

References. References should be numbered consecutively (with parentheses) as they appear in the text. Type the reference list with double spacing on a separate sheet. References should accord with the system used in *Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals* (N Engl J Med 1991;324:424-428).

Examples:

1 Taylor DN, Sanchez JL, Candler W et al. Treatment of traveller's diarrhea: ciprofloxacin plus loperamide compared with ciprofloxacin alone. *Ann Intern Med* 1991;114:731-734.

2 Mackowiak PA, ed. *Fever. Basic Mechanisms and Management*. New York: Raven Press, 1991.

3 Rubin M, Pizzo PA. Monotherapy in neutropenic cancer patients. In: Peterson PK, Verhoef J, eds. *Antimicrobial Agents Annual 3*. Amsterdam: Elsevier, 1988.

Please note that all authors should be listed when six or less; when seven or more, list only the first six and add 'et al.'. Do not include references to personal communications, unpublished data or manuscripts either 'in preparation' or 'submitted for publication'. If essential, such material may be incorporated into the appropriate place in the text. *Recheck references in the text against reference list after your manuscript has been revised.*

Illustrations. Photographs should be presented as high quality jpg (jpeg) or tiff files with high contrast. Magnification should be indicated by a line representing the actual scale of reproduction (0.1 mm, 1mm or 10 mm); the use of magnification factors is to be avoided where possible. Illustrations will not be redrawn by the Publisher: line figures should be suitable for direct reproduction. They should be prepared with black on white background, or be black-and-white images; *they should be completely and consistently lettered, the size of the lettering being appropriate to that of the illustration, taking into account the necessary reduction in size.*

Illustrations should be designed to fit either a single column (84 mm wide) or the full text width (175mm). However, if specifically requested by the author(s), plates may be reproduced larger than the typeset area; all originals for these should have the same proportions to achieve uniformity in their presentation. *N.B. When plates are required to fill the entire page, the originals should have the dimensions 215 x 285 mm and contain no essential information or labelling near the edges.* Further information about artwork can be found on the World Wide Web: access under <http://www.elsevier.com/locate/authorartwork>

Colour figures. Colour figures will be included subject to the authors' agreement to defray the cost.

Specific remarks *Mathematical formulae.* Present simple formulae in the line of normal text

where possible. In principle, variables are to be presented in italics. Use the solidus (/) instead of a horizontal line,

e.g., X_p/Y_m

Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separate from the text (if referred to explicitly in the text).

Tables. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

Nomenclature and units. Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI.

DNA sequences and GenBank Accession numbers. Many Elsevier journals cite 'gene accession numbers' in their running text and footnotes. Gene accession numbers refer to genes or DNA sequences about which further information can be found in the databases at the National Center for Biotechnical Information (NCBI) at the National Library of Medicine. Elsevier authors wishing to enable other scientists to use the accession numbers cited in their papers via links to these sources, should type this information in the following manner:

For each and every accession number cited in an article, authors should type the accession number in **bold, underlined text**. Letters in the accession number should always be capitalised. (See example below.) This combination of letters and format will enable Elsevier's typesetters to recognise the relevant texts as accession numbers and add the required link to GenBank's sequences.

Example: GenBank accession nos. **AI631510** , **AI631511** , **AI632198** , and **BF223228**), a B-cell tumour from a chronic lymphatic leukaemia (GenBank accession no. **BE675048**), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. **AA361117**).

Authors are encouraged to check accession numbers used very carefully. **An error in a letter or number can result in a dead link.** In the final version of the *printed article*, the accession number text will not appear bold or underlined. In the final version of the *electronic copy*, the accession number text will be linked to the appropriate source in the NCBI databases enabling readers to go directly to that source from the article.

Editorial Review

All manuscripts are subject to peer review. If changes are requested, revisions received later than 3 months after this request will be treated as new submissions.

Accepted Papers

Once a paper has been accepted, the only changes possible are in relation to any queries raised by the Technical Editor or Typesetter.

Proofs

One set of page proofs in PDF format will be sent by e-mail to the corresponding author (if

we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post). Elsevier now sends PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 available free from ➞ <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs. The exact system requirements are given at the Adobe site: ➞

<http://www.adobe.com/products/acrobat/acrrsystemreqs.html#70win>. If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post.

Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

Language and language services

Authors who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission please visit <http://www.elsevier.com/languageediting> or our customer support site at ➞ <http://epsupport.elsevier.com> for more information.

Page charges

The Journal does not charge a submission fee.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use.

Queries

All questions arising after acceptance of a manuscript by the editor, especially those relating to proofs, publication and reprints should be directed to the publishers, Elsevier Ireland Ltd., Elsevier House, Brookvale Plaza, East Park, Shannon, Co. Clare, Ireland. Tel: +353 61 709600, Fax: +353 61 709100, E-mail: support@elsevier.com. In the USA and Canada: For further information, contact Elsevier Inc., Attn: Journal Information Center, 360 Park Avenue South, New York, NY 10010, USA. Tel: +1 212 6333750; Fax: +1 212 6333990; Telex: 420-643 AEP Ui; E-mail: usinfo-f@elsevier.com.

Policy and Ethics

Declarations

Upon submission you will be required to complete and upload this form ([pdf version](#) or [word version](#)) to declare funding, conflict of interest and to indicate whether ethical approval was

sought. This information must also be inserted into your manuscript under the acknowledgements section with the headings below. If you have no declaration to make please insert the following statements into your manuscript:

Funding: None

Competing interests: None declared

Ethical approval: Not required

Ethics

Work on human beings that is submitted to IJAA should comply with the principles laid down in the Declaration of Helsinki; Recommendations guiding physicians in biomedical research involving human subjects. Adopted by the 18th World Medical Assembly, Helsinki, Finland, June 1964, amended by the 29th World Medical Assembly, Tokyo, Japan, October 1975, the 35th World Medical Assembly, Venice, Italy, October 1983, and the 41st World Medical Assembly, Hong Kong, September 1989. The manuscript should contain a statement that the work has been approved by the appropriate ethical committees related to the institution(s) in which it was performed and that subjects gave informed consent to the work (see declarations section above). Studies involving experiments with animals must state that their care was in accordance with institution guidelines. Patients' and volunteers' names, initials, and hospital numbers should not be used.

Competing interests

See the declarations section above. All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organisations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding.

Role of the funding source

See the declarations section. All sources of funding should be declared. Authors should declare the role of study sponsors, if any, in the study design, in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the manuscript; and in the decision to submit the manuscript for publication. If the study sponsors had no such involvement, the authors should so state.

Randomised controlled trials

All randomised controlled trials submitted for publication in IJAA should include a completed Consolidated Standards of Reporting Trials (CONSORT) flow chart. Please refer to the CONSORT statement website at <http://www.consort-statement.org> for more information. IJAA has adopted the proposal from the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) which require, as a condition of consideration for publication of clinical trials, registration in a public trials registry. Trials must register at or before the onset of patient enrolment. The clinical trial registration number should be included at the end of the abstract of the article. For this purpose, a clinical trial is defined as any research project that prospectively assigns human subjects to intervention or comparison groups to study the cause-and-effect relationship between a medical intervention and a health outcome. Studies designed for other purposes, such as to study pharmacokinetics or major toxicity (e.g. phase I trials) would be exempt. Further information can be found at www.icmje.org. Revisions received later than 3 months after this request will be treated as new submissions.

Authors in Japan please note: If you would like information about how to have the English

of your paper checked, corrected and improved (*before submission*), please contact our Tokyo office who will inform you of the services provided by language correctors: Elsevier Japan, 9-15 Higashi-Azabu 1-chome, Minato-ku, Tokyo, 106 Japan, Tokyo; Tel: +81-3-5561-5032; Fax: +81-3-5561-5032.

Proofs will be sent to the authors to be carefully checked for printer's errors. *Changes or additions to the edited manuscript cannot be allowed at this stage.* Corrected proofs should be returned to the publisher by email within two days of receipt.

Page charges will not be made.

Twenty-five free reprints will be supplied. The publisher will send authors a form enabling further reprints to be ordered at prices listed on the form.

Illustrations Photographs should be presented as high quality jpg (jpeg) or tiff files with high contrast. Magnification should be indicated by a line representing the actual scale of reproduction (0.1 mm, 1mm or 10 mm); the use of magnification factors is to be avoided where possible. Illustrations will not be redrawn by the Publisher: line figures should be suitable for direct reproduction. They should be prepared with black on white background, or be black-and-white images; *they should be completely and consistently lettered, the size of the lettering being appropriate to that of the illustration, taking into account the necessary reduction in size.*

Illustrations should be designed to fit either a single column (84 mm wide) or the full text width (175mm). However, if specifically requested by the author(s), plates may be reproduced larger than the typeset area; all originals for these should have the same proportions to achieve uniformity in their presentation. *N.B. When plates are required to fill the entire page, the originals should have the dimensions 215 x 285 mm and contain no essential information or labelling near the edges.* Further information about artwork can be found on the World Wide Web: access under <http://www.elsevier.com/locate/authorartwork>

Colour figures will be included subject to the authors' agreement to defray the cost.

Tables All tables must be cited in the text and have titles. Number them consecutively with Arabic numerals. Table titles should be complete but brief. Information other than that defining the data should be presented as footnotes. Only horizontal rules should be included, and kept to a minimum.

All questions arising after acceptance of a manuscript by the editor, especially those relating to proofs, publication and reprints should be directed to the publishers, Elsevier Ireland Ltd., Elsevier House, Brookvale Plaza, East Park, Shannon, Co. Clare, Ireland. Tel: +353 61 709600, Fax: +353 61 709100, E-mail: Editors@elsevier.ie. **In the USA and Canada:** For further information, contact Elsevier Inc., Attn: Journal Information Center, 360 Park Avenue South, New York, NY 10010, USA. Tel: +1 212 6333750; Telefax: +1 212 6333990; Telex: 420-643 AEP Ui; E-mail: usinfo-f@elsevier.com.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about the existing

agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>

Sponsored Articles:

International Journal of Antimicrobial Agents offers authors the option to sponsor non-subscriber access to their articles on Elsevier's electronic publishing platforms. For more information please view our Sponsored Articles information page.<http://www.elsevier.com/wps/find/authorsview.authors/sponsoredarticles>.

