



Persistência de *Klebsiella pneumoniae* em doentes de unidades pediátricas do Hospital de Santa Maria, em Lisboa

Sofia Arriaga Cerqueira¹, Paula Machado¹, Joana Marto¹, Luís Lito², José Melo-Cristino², Aida Duarte¹

1. Laboratório de Investigação em Microbiologia, Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa

2. Laboratório de Microbiologia, Hospital de Santa Maria, Faculdade de Medicina, Universidade de Lisboa

Resumo

Introdução: A *Klebsiella pneumoniae* é responsável por infecções nosocomiais e adquiridas na comunidade. A produção de β-lactamases de espectro alargado (ESBLs) e os factores de virulência assumem particular importância nestas infecções.

Métodos: Este estudo incluiu 47 isolados de *K. pneumoniae*, obtidos de dez pacientes de unidades pediátricas de um hospital central, entre 2001 e 2009. Os antibiogramas foram determinados pelo método da difusão em disco. A caracterização genotípica foi efectuada por *M13 fingerprinting* e, nos perfis representativos, por *Multilocus Sequence Typing* (MLST). Os genes de resistência *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-2} e *bla*_{SHV}, e os genes de virulência *k*_{2A}, *rmpA*, *magA*, *fimH*, *mrkD*, *khe* e *iucC*, foram identificados por reacção em cadeia da polimerase e sequenciados.

Resultados: Encontraram-se três antibiótipos predominantes, R1, R2 e R3, de acordo com a susceptibilidade dos isolados à cefotaxima, ceftazidima, ciprofloxacina e gentamicina. Todos os isolados eram sensíveis ao imipenemo. O *M13 fingerprinting* distinguiu dois perfis genómicos principais, M1 e M2, detectados em vários momentos entre 2001 e 2009. Entre os isolados com perfil M1, 38,5% tinham o antibiótipo R1 e 53,8% tinham o antibiótipo R2; no perfil M2, 12,5% e 56,25% dos isolados apresentavam os antibiótipos R1 e R3, respectivamente. Verificou-se uma associação entre o perfil M1 e o *Sequence Type* (ST) 15, assim como entre o perfil M2 e os STs 133 e 276. 89,4% dos isolados possuíam genes codificantes para ESBLs; a sequenciação identificou os genes das enzimas CTX-M-15, SHV-1, -2a e -11. A incidência dos genes *fimH*, *mrkD* e *khe* foi elevada; *k*_{2A}, *rmpA*, *magA* e *iucC* não foram detectados.

Discussão e conclusão: A presença dos mesmos perfis de *M13 fingerprinting* durante alguns anos sugere uma endemia nas unidades pediátricas do hospital. Além disso, a elevada incidência dos genes das adesinas fimbriais pode justificar a

persistência do mesmo clone no mesmo doente durante longos períodos de tempo.

Palavras-chave: MLST, endemia, persistência, adesinas fimbriais

Acta Pediatr Port 2011;42(2):49-53

Persistent *Klebsiella pneumoniae* in patients from paediatric units of Santa Maria Hospital, in Lisbon

Abstract

Introduction: *Klebsiella pneumoniae* is responsible for nosocomial and community-acquired infections. Extended-spectrum β-lactamases (ESBLs) production and virulence factors are particularly important in these infections.

Methods: This study included 47 *K. pneumoniae* isolates, obtained from ten patients of paediatric units in a central hospital, between 2001 and 2009. Antibiograms were determined by disk diffusion method. Genotypic characterization was performed by *M13 fingerprinting* and, in representative profiles, by *Multilocus Sequence Typing* (MLST). Resistance genes *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-2} and *bla*_{SHV}, and virulence genes *k*_{2A}, *rmpA*, *magA*, *fimH*, *mrkD*, *khe* and *iucC*, were identified by polymerase chain reaction and sequenced.

Results: Three predominant antibiotypes were found, R1, R2 and R3, according to the susceptibility of isolates to cefotaxime, ceftazidime, ciprofloxacin and gentamicin. All isolates were imipenem-susceptible. *M13 fingerprinting* distinguished two main genomic profiles, M1 and M2, detected between 2001 and 2009. Among M1 isolates, 38,5% showed antibiotype R1 and 53,8% showed antibiotype R2; among M2 isolates, 12,5% and 56,25% showed antibiotypes R1 and R3, respectively. We found a relationship between M1 profile and *Sequence Type* (ST) 15, as well as between M2 profile and STs 133 and 276. 89,4% of isolates had genes codifying for

Recebido: 11.05.2010

Aceite: 09.06.2011

Correspondência:

Aida Duarte
Laboratório de Investigação em Microbiologia
Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa
Av. Forças Armadas
1649-049 Lisboa.
aduarte@ff.ul.pt

ESBLs; sequencing identified genes codifying for the enzymes CTX-M-15, SHV-1, -2a and -11. The incidence of genes *fimH*, *mrkD* and *khe* was high; *k₂A*, *rmpA*, *magA* and *iucC* were not detected.

Discussion and conclusion: The presence of the same M13 fingerprinting profiles for some years suggests an endemy in paediatric units of the hospital. Besides, the high incidence of fimbrial adhesins genes might account for the persistence of the same clone in the same patient for long periods of time.

Keywords: MLST, endemy, persistence, fimbrial adhesins

Acta Pediatr Port 2011;42(2):49-53

Introdução

As bactérias do género *Klebsiella* colonizam o tracto gastrointestinal humano, podendo também ser encontradas na pele, orofaringe e vias respiratórias superiores de indivíduos hospitalizados. De facto, *K. pneumoniae* é um importante agente de infecções nosocomiais, sendo frequente a descrição de surtos hospitalares¹; no entanto, as infecções por *K. pneumoniae* também podem ser adquiridas na comunidade. Os tractos urinário e respiratório são os locais mais comuns de infecção, podendo também ocorrer bacteriémia. Estas afectam sobretudo indivíduos imunocomprometidos, e as taxas de mortalidade podem atingir 50% em pneumonias sem antibioterapia adequada (EARSS Annual Report 2008).

As infecções por *K. pneumoniae* têm sido alvo de um interesse crescente nos últimos anos, devido ao aumento do número de isolados multirresistentes, particularmente os produtores de β -lactamases de espectro alargado (*Extended-Spectrum β -Lactamases*, ESBLs)². A definição de ESBL não é consensual; no entanto, alguns autores propõem que uma ESBL é qualquer β -lactamase, geralmente adquirida e não inerente a uma espécie, que hidrolisa rapidamente ou confere resistência às cefalosporinas de espectro alargado (mas não a carbapenemos), e que é inibida pelo ácido clavulânico, inibidor de β -lactamases^{3,4}. As ESBLs constituem o principal mecanismo de resistência aos β -lactâmicos em *K. pneumoniae* e encontram-se divididas em famílias: SHV, TEM, CTX-M, entre outras⁵.

Os factores de virulência são também muito importantes nas infecções por *K. pneumoniae*. Entre eles contam-se as fímbrias, a cápsula, hemolisinas e sideróforos⁶. As fímbrias, por exemplo, são fundamentais na invasão do hospedeiro, enquanto a cápsula é importante na evasão ao sistema imunitário⁷.

Neste estudo, os principais objectivos foram a identificação dos determinantes genéticos responsáveis pela resistência aos antibióticos e pela virulência de isolados clínicos pediátricos de *K. pneumoniae*, bem como o estabelecimento de uma relação entre os isolados com base nos seus genótipos, de modo a identificar os clones persistentes no mesmo doente.

Métodos

Isolados

Este estudo incluiu dez pacientes de unidades pediátricas de um hospital central. Os 47 isolados de *K. pneumoniae* foram identifi-

cados, entre 2001 e 2009, a partir de urina (n = 39), sangue (n = 3), secreções brônquicas (n = 3), pus (n = 1) e cateter (n = 1). A identificação dos isolados clínicos foi efectuada pelo Sistema Automatizado do Laboratório de Bacteriologia do hospital.

Susceptibilidade a antibióticos

A susceptibilidade dos isolados foi estudada pelo método da difusão em disco, em Mueller-Hinton agar, com discos (Bio-Rad, Marnes-La-Coquette, França) de cefotaxima (30 μ g), ceftazidima (30 μ g), cefoxitina (30 μ g), ciprofloxacina (5 μ g), gentamicina (10 μ g), imipenemo (10 μ g) e amoxicilina com ácido clavulânico (20/10 μ g). Os halos de inibição foram interpretados de acordo com as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute*.

Extracção do DNA

O DNA total das células, utilizado nas reacções de caracterização genómica, foi extraído por fervura de 1 mL de uma suspensão bacteriana densa, em água bidestilada estéril, a 95°C, durante 10 min, seguida de centrifugação a 12000 r/min, durante 4 min. O sobrenadante foi conservado a -20°C.

Caracterização genotípica por M13 fingerprinting

A caracterização genotípica dos isolados foi efectuada por *M13 fingerprinting*. A reacção de PCR foi realizada em *Ready-To-Go™ RAPD Analysis Beads* (GE Healthcare) e de acordo com Grundmann *et al*⁸. A análise dos produtos de PCR foi feita por electroforese em gel de agarose a 2%.

Multilocus Sequence Typing (MLST)

O *Multilocus Sequence Typing* consiste na amplificação de sete genes *housekeeping*: *gapA* (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase), *infB* (factor de iniciação da tradução 2), *mdh* (malato desidrogenase), *pgi* (fosfoglucose isomerase), *phoE* (fosfoporina E), *rpoB* (subunidade β da RNA polimerase B) e *tonB* (transdutor energético periplasmático). As sequências destes genes permitem definir os alelos de cada *locus* e, de acordo com a combinação de alelos de cada isolado, identificar *Sequence Types* (STs) distintos¹.

A técnica MLST foi aplicada em quatro isolados, correspondentes aos perfis de *M13 fingerprinting* mais representativos. Foram usadas *puReTaq Ready-To-Go™ PCR Beads* (GE Healthcare) para amplificar os sete genes *housekeeping*, e procedeu-se de acordo com Diancourt *et al*¹, excepto para a temperatura de *annealing* do gene *tonB*, modificada para 52°C. Os produtos de PCR foram analisados por electroforese em gel de agarose a 1%, purificados e sequenciados.

Determinantes genéticos de resistência

Os genes *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-2} e *bla*_{SHV} foram identificados por PCR, de acordo com Conceição *et al*⁹, Brízio *et al*¹⁰, e Pitout *et al*¹¹, respectivamente. Os produtos de PCR foram analisados por electroforese em gel de agarose a 1%, purificados e sequenciados.

Determinantes genéticos de virulência

Os genes de virulência foram identificados através de amplificação por PCR e análise em gel de agarose a 1%, seguida de puri-

ficação e sequenciação. Os genes pesquisados foram *k2A* (gene A associado ao serótipo capsular K2¹²), *rmpA* (regulador do fenótipo mucóide¹³), *magA* (mucoviscosidade, relacionado com o serótipo capsular K1¹⁴), *fimH* (proteína das fimbrias tipo 1¹⁵), *mrkD* (adesina das fimbrias tipo 3¹⁶), *khe* (hemolisina¹⁷) e *iucC* (sideróforo¹⁸). Os primers usados estão descritos no Quadro I.

Quadro I – Primers para os genes de virulência.

Gene	Primers	Referência
<i>k2A</i>	F:5'-CAACCATGGTGGTCGATTAG-3 R:5'-TGGTAGCCATATCCCTTTGG-3'	12'
<i>rmpA</i>	F:5'-ACTGGRCTACCTCTGYTTCA-3' R:5'-CTTGCATGAGMCATCTTTA-3'	‡
<i>magA</i>	F:5'-TCTGTCATGGCTTAGACCGAT-3' R:5'-GCAATCGAAGTGAAGAGTGCT-3'	‡
<i>fimH</i>	F:5'-TGTTCCACCACCCTGCTGCTG-3' R:5'-CACCACGTCGTRTTGGCGTA-3'	‡
<i>mrkD*</i>	F:5'-CGGTGATGCTGGACATGGT-3' R:5'-CYTCSAGSGAATAGTTGGTGG-3'	‡
<i>mrkD†</i>	F:5'-CTTRATGGCGMTGGGSACCA-3' R:5'-TCATRTGCGAYTCCACCTCRC-3'	‡
<i>khe</i>	F:5'-TGATTGCATTCGCCACTGG-3' R:5'-GGTCAACCCAACGATCCTGG-3'	‡
<i>iucC</i>	F:5'-GTGCTGTCGATGAGCGATGC-3' R:5'-GTGAGCCAGGTTTCAGCGTC-3'	‡

S = C ou G; Y = C ou T; R = A ou G. *, † Variantes do gene *mrkD*. ‡ – Desenhado no presente estudo.

Resultados

Caracterização dos isolados clínicos

Os isolados de *K. pneumoniae* foram obtidos de doentes internados ou que frequentaram a consulta externa de unidades pediátricas do hospital (Medicinas: n = 26; Consulta Externa: n = 10; Cirurgia: n = 8; Unidades de Cuidados Intensivos: n = 3).

Perfis de resistência aos antibióticos

A distribuição da resistência aos antibióticos estudados foi variável (Quadro II): por um lado, registou-se uma elevada percentagem de isolados resistentes à cefotaxima, ceftazidima, ciprofloxacina e gentamicina; contudo, a percentagem de isolados que mostraram resistência à cefoxitina e à amoxicilina com ácido clavulânico foi baixa. Todos os isolados eram sensíveis ao imipenemo.

Quadro II – Número e percentagem de isolados sensíveis, intermédios e resistentes aos antibióticos testados.

	CTX		CAZ		FOX		CIP		GM		IPM		AMC	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
S	2	4,3	6	12,8	45	95,7	14	29,8	3	6,4	47	100	8	17,0
I	1	2,1	8	17,0	0	0	8	17,0	0	0	0	0	33	70,2
R	44	93,6	33	70,2	2	4,3	25	53,2	44	93,6	0	0	6	12,8
Total	47	100	47	100	47	100	47	100	47	100	47	100	47	100

S Sensível; I intermédio; R resistente; CTX cefotaxima; CAZ ceftazidima; FOX cefoxitina; CIP ciprofloxacina; GM gentamicina; IPM imipenemo; AMC amoxicilina com ácido clavulânico; n número de isolados; % percentagem de isolados.

Foram encontrados três perfis de resistência aos antibióticos (antibiotipos) predominantes (Quadro III): R1 (resistência à cefotaxima, ceftazidima, gentamicina e ciprofloxacina), R2 (resistência à cefotaxima, gentamicina e ciprofloxacina), e R3 (resistência à cefotaxima, ceftazidima e gentamicina); o antibiotipo R4 corresponde aos perfis não agrupáveis. O antibiotipo R1 foi o predominante em 27,7% (n = 13) dos isolados, enquanto os antibiotipos R2 e R3 foram encontrados, cada um, em 25,5% (n = 12) dos isolados.

Quadro III – Distribuição dos antibiotipos nos isolados.

Antibiotipo	n	%
R1	13	27,7
R2	12	25,5
R3	12	25,5
R4	10	21,3
Total	47	100

R1 Resistência à cefotaxima, ceftazidima, gentamicina e ciprofloxacina; R2 resistência à cefotaxima, gentamicina e ciprofloxacina; R3 resistência à cefotaxima, ceftazidima e gentamicina; R4 perfis não agrupáveis; n número de isolados; % percentagem de isolados.

Tipificação molecular

Foram encontrados dois perfis genómicos principais de *M13 fingerprinting*, M1 e M2 (Quadro IV). 27,7% (n = 13) dos isolados eram M1 e 34% (n = 16) eram M2.

Quadro IV – Distribuição dos perfis de *M13 fingerprinting* nos isolados.

Perfil de <i>M13 fingerprinting</i>	n	%
M1	13	27,7
M2	16	34,0
Outros	18	38,3
Total	47	100

n número de isolados; % percentagem de isolados.

O perfil M1 foi detectado em vários momentos entre 2001 e 2009, enquanto o perfil M2 foi detectado entre 2006 e 2008. Além disso, isolados com o mesmo perfil persistiram no mesmo doente durante períodos que atingiram quatro meses.

Entre os isolados com perfil genómico M1, 38,5% (n = 5) tinham o antibiotipo R1, 53,8% (n = 7) o antibiotipo R2, e 7,7% (n = 1) o antibiotipo R4. Entre os isolados com perfil M2, 12,5% (n = 2) apresentavam o antibiotipo R1, 56,25% (n = 9) o antibiotipo R3, e 31,25% (n = 5) o antibiotipo R4 (Quadro V).

Por outro lado, o MLST permitiu identificar três STs distintos: ST15, ST133 e ST276. Verificou-se, assim, que os isolados com perfil M1 correspondiam ao ST15, enquanto os isolados com perfil M2 correspondiam aos ST133 e ST276.

Determinantes genéticos de resistência

Dos 47 isolados estudados, 89,4% (n = 42) possuíam genes codificantes para ESBLs: o gene *bla*_{CTX-M-1} foi detectado em 63,8% (n = 30) dos isolados e o gene *bla*_{SHV} em 83% (n = 39) dos isolados. Após sequenciação identificou-se os genes para as enzimas CTX-M-15, SHV-1, SHV-2a e SHV-11.

Quadro V – Distribuição dos antibiótipos, genes de resistência e genes de virulência nos perfis de *M13 fingerprinting*.

Perfil de <i>M13 fingerprinting</i>	Perfil de MLST	Antibiótipo								Gene de resistência				Gene de virulência					
		R1		R2		R3		R4		<i>bla</i> _{CTX-M-1}		<i>bla</i> _{SHV}		<i>fimH</i>		<i>mrkD</i>		<i>khe</i>	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
M1	ST15	5	38,5	7	53,8	0	0	1	7,7	10	76,9	11	84,6	13	100	11	84,6	7	53,8
M2	ST133, ST276	2	12,5	0	0	9	56,25	5	31,25	11	68,8	16	100	15	93,8	15	93,8	14	87,5

R1 Resistência à cefotaxima, ceftazidima, gentamicina e ciprofloxacina; R2 resistência à cefotaxima, gentamicina e ciprofloxacina; R3 resistência à cefotaxima, ceftazidima e gentamicina; R4 perfis não agrupáveis; n número de isolados; % percentagem de isolados.

O gene *bla*_{CTX-M-1} foi encontrado em 76,9% (n = 10) dos isolados com perfil M1, e em 68,8% (n = 11) dos isolados com perfil M2, enquanto o gene *bla*_{SHV} foi encontrado em 84,6% (n = 11) dos isolados com perfil M1, e em 100% (n = 16) dos isolados com perfil M2 (Quadro V).

Determinantes genéticos de virulência

Os genes de virulência *fimH*, *mrkD* e *khe* foram detectados num grande número de isolados (Quadro VI); enquanto os genes *k*₂*A*, *rmpA*, *magA* e *iucC* não foram encontrados em qualquer isolado.

Quadro VI – Distribuição dos genes de virulência nos isolados.

Gene	n	%
<i>k</i> ₂ <i>A</i>	0	0
<i>rmpA</i>	0	0
<i>magA</i>	0	0
<i>fimH</i>	45	95,7
<i>mrkD</i>	42	89,4
<i>khe</i>	32	68,1
<i>iucC</i>	0	0

n número de isolados; % percentagem de isolados.

O gene *fimH* foi encontrado em 100% (n = 13) dos isolados com perfil M1, e em 93,8% (n = 15) dos isolados com perfil M2; o gene *mrkD* foi encontrado em 84,6% (n = 11) dos isolados com perfil M1, e em 93,8% (n = 15) dos isolados com perfil M2; o gene *khe* foi encontrado em 53,8% (n = 7) dos isolados com perfil M1, e em 87,5% (n = 14) dos isolados com perfil M2 (Quadro V).

Discussão

Registou-se uma elevada incidência de isolados produtores de ESBLs. A enzima CTX-M-15 foi uma das ESBLs produzida, com forte actividade hidrolítica da cefotaxima. Esta enzima confere ainda resistência à ceftazidima, contrariamente ao que acontece com a maioria das outras β -lactamases da família CTX-M¹⁹. A produção de SHV-2a e SHV-11 constitui outro mecanismo de resistência à cefotaxima^{20,21}. O número de isolados de *K. pneumoniae* produtores de CTX-M-15 tem aumentado em Portugal desde a sua primeira descrição, em 2005⁹, seguindo a tendência da maioria dos países europeus²². Por outro lado, o elevado número de isolados multirresistentes encontrados no âmbito deste estudo reflecte a situação na Europa, em que a resistência combinada é cada vez mais fre-

quente (EARSS Annual Report 2008), reduzindo as opções terapêuticas, sobretudo em meio hospitalar.

A técnica de MLST confirmou que os perfis M1 e M2, identificados por *M13 fingerprinting*, eram, de facto, diferentes. Estes dois perfis apresentaram resistências aos antibióticos distintas, bem como uma diferente distribuição dos factores de virulência (Quadro V). Por outro lado, a presença dos mesmos perfis de *M13 fingerprinting* durante alguns anos (oito anos no caso do perfil M1; dois anos no caso do perfil M2) sugere uma endemia nas unidades pediátricas do hospital.

Os isolados de *K. pneumoniae* estudados não pertencem aos serótipos capsulares mais virulentos³, pois não têm nem o gene *magA*, relacionado com o serótipo capsular K1, nem o gene *k*₂*A*, relacionado com o serótipo capsular K2. No entanto, a incidência dos genes das adesinas fimbriais – *fimH* e *mrkD* – foi elevada, o que reforça o facto de estes isolados serem, na maioria, uropatogénicos. Além disso, a presença destas adesinas fimbriais pode justificar a persistência do mesmo clone de *K. pneumoniae* no mesmo doente durante longos períodos de tempo.

Agradecimentos

Este estudo foi financiado pela Associação para o Desenvolvimento do Ensino e Investigação da Microbiologia (ADEIM).

Referências

- Diancourt L, Passet V, Verhoef J, Grimont PAD, Brisse S. Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. *J Clin Microbiol* 2005;43:4178-82.
- Podschun R, Ullmann U. *Klebsiella* spp. as Nosocomial Pathogens: Epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin Microbiol Rev* 1998;11:589-603.
- Cornaglia G, Garau J, Livermore DM. Living with ESBLs. *Clin Microbiol Infect* 2008;14 Suppl 1:1-2.
- Livermore DM. Defining an extended-spectrum β -lactamase. *Clin Microbiol Infect* 2008;14 Suppl 1:3-10.
- Paterson DL, Bonomo RA. Extended spectrum β -lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev* 2005;18:657-86.
- Yu VL, Hansen DS, Ko WC, Sagnimeni A, Klugman KP, von Gottberg A et al. Virulence characteristics of *Klebsiella* and clinical manifestations of *K. pneumoniae* bloodstream infections. *Emerg Infect Dis* 2007;13:986-93.
- Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Enterobacteriaceae*. In: Schmitt W, DeFrancesco K, editors. *Medical Microbiology*. 6th ed. Philadelphia: Elsevier Mosby; 2009; 301-15.

8. Grundmann HJ, Towner KJ, Dijkshoorn L, Gerner-Smidt P, Maher M, Seifert H *et al.* Multicenter study using standardized protocols and reagents for evaluation of reproducibility of PCR-based fingerprinting of *Acinetobacter* spp. *J Clin Microbiol* 1997;35:3071-7.
9. Conceição T, Brízio A, Duarte A, Lito JM, Melo Cristino J, Salgado MJ. First description of CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* in Portugal [letter]. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:477-8.
10. Brízio A, Vasco S, Gonçalves AR, Lito LM, Melo Cristino J, Salgado MJ *et al.* Survey of extended-spectrum β -lactamases in *Escherichia coli* isolates from a Portuguese hospital and characterisation of a novel class 1 integron (In60A) carrying the *bla*_{CTX-M-9} gene. *Int J Antimicrob Agents* 2006;28:320-4.
11. Pitout JDD, Thomson KS, Hanson ND, Ehrhardt AF, Moland ES, Sanders CC. β -lactamases responsible for resistance to expanded-spectrum cephalosporins in *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, and *Proteus mirabilis* isolates recovered in South Africa. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:1350-4.
12. Yu WL, Fung CP, Ko, WC, Cheng KC, Lee CC, Chuang YC. Polymerase chain reaction analysis for detecting capsule serotypes K1 and K2 of *Klebsiella pneumoniae* causing abscesses of the liver and other sites [correspondence]. *J Infect Dis* 2007;195:1235-6.
13. Arakawa Y, Ohta M, Wacharotayankun R, Mori M, Kido N, Ito H *et al.* Biosynthesis of *Klebsiella* K2 capsular polysaccharide in *Escherichia coli* HB101 requires the functions of *rmpA* and the chromosomal *cps* gene cluster of the virulent strain *Klebsiella pneumoniae* Chedid (O1:K2). *Infect Immun* 1991;59:2043-50.
14. Chuang YP, Fang CT, Lai SY, Chang SC, Wang JT. Genetic determinants of capsular serotype K1 of *Klebsiella pneumoniae* causing primary pyogenic liver abscess. *J Infect. Dis* 2006;193:645–54.
15. Stahlhut SG, Chattopadhyay S, Struve C, Weissman SJ, Aprikian P, Libby SJ *et al.* Population variability of the FimH type 1 fimbrial adhesin in *Klebsiella pneumoniae*. *J Bacteriol* 2009;191:1941-50.
16. Boddicker JD, Anderson RA, Jagnow J, Clegg S. Signature-tagged mutagenesis of *Klebsiella pneumoniae* to identify genes that influence biofilm formation on extracellular matrix material. *Infect Immun* 2006;74:4590-7.
17. Yin-Ching C, Jer-Hong S, Ching-Nan L, Ming-Chung C. Cloning of a gene encoding a unique haemolysin from *Klebsiella pneumoniae* and its potential use as a species-specific gene probe. *Microb Pathog* 2002;33:1-6.
18. Hsieh PF, Lin TL, Lee CZ, Tsai SF, Wang JT. Serum-induced iron-acquisition systems and TonB contribute to virulence in *Klebsiella pneumoniae* causing primary pyogenic liver abscess. *J Infect Dis* 2008;197:1717-27.
19. Poirel L, Gniadkowski M, Nordmann P. Biochemical analysis of the ceftazidime-hydrolysing extended-spectrum β -lactamase CTX-M-15 and of its structurally related β -lactamase CTX-M-3. *J Antimicrob Chemother* 2002;50:1031-4.
20. Podbielski A, Schönling J, Melzer B, Warnatz K, Leusch HG. Molecular characterization of a new plasmid-encoded SHV-type β -lactamase (SHV-2 variant) conferring high-level cefotaxime resistance upon *Klebsiella pneumoniae*. *J Gen Microbiol* 1991;137:569-78.
21. Ahamed J, Kundu M. Molecular characterization of the SHV-11 beta-lactamase of *Shigella dysenteriae* [note]. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:943-9.
22. Cantón R, Novais A, Valverde A, Machado E, Peixe L, Baquero F *et al.* Prevalence and spread of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clin Microbiol Infect* 2008;14 Suppl 1:144-53.