

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Carla Priscila da Silva Machado

**DIVERSIDADE FILOGENÉTICA DE *Klebsiella pneumoniae* DE ORIGEM CLÍNICA E
DA MICROBIOTA INTESTINAL NORMAL ASSOCIADA AOS PERFIS DE
RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS**

Rio de Janeiro

2016

Carla Priscila da Silva Machado

**DIVERSIDADE FILOGENÉTICA DE *Klebsiella pneumoniae* DE ORIGEM CLÍNICA E
DA MICROBIOTA INTESTINAL NORMAL ASSOCIADA AOS PERFIS DE
RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Vigilância Sanitária.

Orientadora: Maysa B. Mandetta Clementino

Rio de Janeiro

2016

Catálogo na fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Machado, Carla Priscila da Silva

Diversidade filogenética de *Klebsiella pneumoniae* de origem clínica e da microbiota intestinal normal associada aos perfis de resistência aos antimicrobianos./ Carla Priscila da Silva Machado – Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2016.

91 f.:il., tab.

Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) – Programa de Pós Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. 2016.

Orientadora: Maysa Beatriz Mandetta Clementino

1. *Klebsiella pneumoniae*. 2. Filogenia. 3. Resistência Microbiana a Medicamentos. 4. Anti-infecciosos. I. Título

Phylogenetic diversity of *Klebsiella pneumoniae* clinical origin and of normal intestinal microflora associated with antimicrobial resistance profiles

Carla Priscila da Silva Machado

**DIVERSIDADE FILOGENÉTICA DE *Klebsiella pneumoniae* DE ORIGEM CLÍNICA E
DA MICROBIOTA INTESTINAL NORMAL ASSOCIADA AOS PERFIS DE
RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do
Instituto Nacional de Controle de Qualidade
em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz
como requisito para obtenção do título de
Mestre em Vigilância Sanitária

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Antônio Eugenio Castro Cardoso de Almeida (Doutor)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – FIOCRUZ

Jessica Manyá Bittencourt Dias Vieira (Doutor)
Universidade Estadual da Zona Oeste – UEZO

Célia Maria Carvalho Pereira Araújo Romão (Doutor)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – FIOCRUZ

Maysa Beatriz Mandetta Clementino (Doutor) – Orientador
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde - FIOCRUZ

Dedico este trabalho ao meu amado pai,

Carlos Alberto Machado.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me permitir concluir este trabalho, dando-me forças para superar todas as dificuldades e barreiras que se colocaram à minha frente.

Ao meu amado Pai Carlos, por todo o esforço dedicado à minha criação e por todo o amor e incentivo que me deu forças para nunca desistir dos estudos e dos meus sonhos.

Ao meu marido Cristiano, por estar ao meu lado, me auxiliando e confortando nas horas mais difíceis.

À minha orientadora Maysa Beatriz Mandetta Clementino, que me deu a oportunidade de desenvolver este projeto e me ajudou muito com seus ensinamentos. Ao longo desses anos como sua aluna eu evolui e amadureci muito. Muito obrigada!

À querida Cátia Chaia, pelo seu companheirismo, amizade e atenção que foram de grande importância para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao professor Antônio Eugênio, que muito me apoiou no desenvolvimento deste trabalho com seus ensinamentos, sua experiência, seus conselhos, estando sempre disposto a ajudar.

Ao Drº Ivano pela colaboração, seja nas atividades laboratoriais, ou na transmissão de ensinamentos, sempre contribuiu para que os trabalhos realizados no laboratório fossem concluídos.

À minha aluna e amiga Pâmella, agradeço pela sua companhia e ajuda em nossas batalhas diárias como aspirantes da ciência. Não só tive a função de ensiná-la, também aprendi muito com você.

A todos do Laboratório de Microrganismos de Referência, que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

A todos os professores que contribuíram para minha formação acadêmica e à coordenação da Pós-Graduação em Vigilância Sanitária.

Por fim, agradeço a todos que de alguma forma participaram e incentivaram a realização deste trabalho.

Talvez não tenha conseguido fazer o melhor,
mas lutei para que o melhor fosse feito. Não
sou o que deveria ser, mas Graças a Deus,
não sou o que era antes.

Martin Luther King

RESUMO

Klebsiella pneumoniae é um patógeno oportunista relacionado frequentemente a quadros infecciosos, principalmente em pacientes imunodeprimidos. É reponsável por infecções hospitalares e comunitárias em todo mundo e pode ser encontrada colonizando o trato gastrointestinal e a orofaringe de pessoas saudáveis. O atual interesse nas infecções causadas por *Klebsiella* spp. se deve à propagação de cepas multirresistentes aos antibióticos e produtoras de beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs), em unidades hospitalares e nas comunidades. A associação entre a variabilidade genética e a virulência de *K. pneumoniae* não é bem compreendida, entretanto, há evidências do comportamento diferenciado de cepas geneticamente heterogêneas. Estudos na Europa demonstraram que isolados clínicos de *K. pneumoniae* podem ser classificados em três grupos filogenéticos, KPI, KPII e KPIII, atualmente reclassificadas em *K. pneumoniae* (KPI), *K. quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae* (KPII-A), *K. quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* (KPII-B) e *K. variicola* (KPIII), respectivamente. O objetivo deste estudo foi determinar a distribuição dos grupos filogenéticos de *K. pneumoniae* de origem clínica e da microbiota intestinal normal, através da análise filogenética com base em sequências do gene *gyrA*, relacionados com os perfis de resistência aos antimicrobianos. Foram analisados 95 isolados de *K. pneumoniae*, provenientes de infecções hospitalares (n= 34) e da microbiota intestinal normal de indivíduos saudáveis (n=61). Os isolados foram identificados por bioquímica convencional e certificados pela PCR da região intergênica do óperon ribossomal 16S-23S rRNA. A susceptibilidade aos antibióticos foi realizada frente a 19 antibióticos pelo método de disco difusão. Dos 34 isolados clínicos, 85% foram resistentes a ampicilina/sulbactam, seguido por ticarcilina/ácido clavulânico (76%), cefepima (74%) e aztreonam (71%). Setenta e quatro por cento dos isolados clínicos apresentaram resultados positivos no teste de triagem em Chromoagar ESBL. Os isolados da microbiota intestinal normal foram altamente susceptíveis, apresentando resistência às penicilinas de amplo espectro (57%), aminoglicosídeos (33%) e tetraciclinas (10%). Em relação aos grupos filogenéticos, o grupo KPI apresentou maior proporção entre os isolados clínicos e da microbiota normal, já o grupo KPIII foi

encontrado em maior proporção em isolados da microbiota intestinal normal. Os maiores percentuais de resistência foram encontrados no grupo KPI, seguido do grupo KPIII e KPII A e B. Foram classificados como multidroga resistente (MDR), 16 isolados clínicos do grupo KPI, 3 isolados do grupo KPII-A e 2 isolados do grupo KPIII e de extensivamente droga resistentes (XDR), 4 isolados do grupo KPI e 1 do grupo KPII-A. A presença de linhagens clínicas produtoras de ESBL, principalmente, *K. variicola* e de perfis de resistência MDR e XDR nas linhagens clínicas de *K. pneumoniae* e *K. quasipneumoniae*, demonstrada neste estudo, sinalizam a presença de disseminação de genes de resistência no ambiente hospitalar. Assim, podemos concluir que as relações filogenéticas entre espécies e subespécies do gênero *Klebsiella* forneceu uma análise da distribuição de propriedades fenotípicas que podem ser associadas com características clínicas e epidemiológicas distintas desse patógeno, oportunista, em ambientes hospitalares e na microbiota normal.

Palavras chave: *Klebsiella pneumoniae*. Grupos filogenéticos. Perfis de resistência. Microbiota intestinal normal

ABSTRACT

Klebsiella pneumoniae is an opportunistic pathogen often related to infections, especially in immunosuppressed patients. It is responsible too nosocomial and community infections worldwide and can be found colonizing the gastrointestinal tract and oropharynx of healthy people. The current interest in infections caused by *Klebsiella spp.* is due to the spread of multidrug-resistant strains to antibiotic and beta-lactamase producing extended spectrum (ESBL) in hospitals and communities. The association between genetic variability and virulence of *K. pneumoniae* is poorly understood, but there is evidence of different behavior between strains genetically heterogeneous. Studies in Europe have demonstrated that clinical isolates of *K. pneumoniae* can be classified into three phylogenetic groups, KPI, KPII and KPIII, now reclassified the *K. pneumoniae* (KPI), *K. quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae* (KPII-A), *K. quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* (KPII-B) and *K. variicola* (KPIII), respectively. The aim of this study was to determine the distribution of phylogenetic groups of *K. pneumoniae* from clinical and normal intestinal microbiota origins by phylogenetic analysis based on sequences of *gyrA* gene which is related to antimicrobial resistance profiles. Ninety-five *K. pneumoniae* isolates from hospital infections (n=34) and normal intestinal microbiota of healthy subjects (n=61) were analyzed. The isolates were identified by conventional biochemical analysis and certified by PCR of intergenic region of ribosomal operon 16-23S rRNA. The susceptibility to antibiotics was carried out against 19 antibiotics by disk diffusion method. Of the 34 isolates, 85% were resistant to ampicillin/sulbactam, followed by ticarcilin/clavulanic acid (76%), cefepime (74%) and aztreonam (71%). Seventy-four percent of clinical isolates showed positive results in the screening test in vitro Chromo agar ESBL. The isolates from the normal intestinal microbiota were highly susceptible, showing resistance to broad-spectrum penicillin (57%), aminoglycosides (33%) and tetracycline (10%). In relation to phylogenetic groups, the o KPI group had a higher proportion of clinical and normal microbiota isolated; however, the group KPIII group presented greater representation among isolates from normal microbiota. The highest percentages of resistance were found in the KPI group, followed by KPIII and KPII- A e

KPII-B groups. Were classified as multidrug-resistant (MDR), 16 clinical isolates of the KPI group, 3 isolates of KPII-A group and 2 isolates of KPIII group and extensively drug resistant (XDR), 4 isolates from the KPI group and 1 isolated of group KPII-A. The presence of ESBL-producing strains of clinical; mainly *K. variicola* (KPII) and MDR resistant profiles and XDR clinical strains of *K. pneumoniae* (KPI) and *K. quasipneumoniae* (KPII-A and B) demonstrated in this study indicate the presence of spread of resistance genes in the hospital environment. Thus, we can conclude that the phylogenetic relationships between species and subspecies of *Klebsiella* genus provided an analysis of the distribution of phenotypic properties that can be associated with different clinical and epidemiological characteristics of this pathogen, opportunistic, in hospitals and in the normal microbiota.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*. Phylogenetic groups. Resistance profiles. Normal intestinal Microbiota

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Representação esquemática da densidade bacteriana ao longo do trato intestinal	21
Figura 2. Impacto da administração de antibióticos na microbiota intestinal	22
Figura 3. Diagrama da inter-relação dos perfis de multirresistência.....	36
Figura 4. Filogenia de <i>Klebsiella spp.</i> baseada na análise dos genes <i>gyrA</i> e <i>parC</i>	37
Figura 5. Gel representativo da identificação dos isolados suspeitos de <i>K. pneumoniae</i> da microbiota normal pela ITS-PCR	53
Figura 6. Gel representativo da identificação dos isolados clínicos de <i>K. pneumoniae</i> pela ITS-PCR	53
Figura 7. <i>K. pneumoniae</i> produtora de ESBL.....	57
Figura 8. Susceptibilidade e perfis de multirresistência dos isolados de <i>K. pneumoniae</i> estudados.....	58
Figura 9. Gel representativo da amplificação do gene <i>gyrA</i> dos isolados de <i>K. pneumoniae</i> estudados.....	59
Figura 10. Filogenia baseada no gene <i>gyrA</i> dos isolados de <i>K. pneumoniae</i> da microbiota normal	61
Figura 11. Filogenia baseada nas sequências do gene <i>gyrA</i> dos isolados clínicos de <i>K. pneumoniae</i>	63
Figura 12. Correlação entre os perfis de resistência e os grupos filogenéticos de <i>K. pneumoniae</i>	64

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Perfil de resistência aos antibióticos de *K. pneumoniae* isolados da microbiota intestinal normal de voluntários que fizeram o uso de antibióticos (Microbiota B).....55
- Tabela 2. Perfil de resistência aos antibióticos de *K. pneumoniae* isolados da microbiota intestinal normal de voluntários que não fizeram uso de antibióticos (Microbiota A).....55
- Tabela 3. Proporção de resistência das linhagens filogenéticas de origem clínica67

LISTA DE SIGLAS

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC - American Type Culture Collection
BLAST - Basic Local Alignment Search Tool
CCIH - Comissão de Controle de Infecção Hospitalar
CDC – Center Disease Control
CLSI - Clinical and Laboratory Standard Institute
CNES - Cadastro Nacional de Estabelecimentos de Saúde
DNA - Deoxyribonucleic Acid
dNTPs - Deoxinucleotídeo trifosfato
ESBL - Extended Spectrum Beta-lactamase
HMLJ - Hospital Municipal Lourenço Jorge
INCQS - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
IRAS - Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde
KPC - *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase
LMR - Laboratório de Microrganismos de Referência
MBL - Metallo-Beta-Lactamase
MDR - Multidroga Resistente
MEGA - Molecular Evolutionary Genetics Analysis
NCBI - National Center for Biotechnology Information
NDM - New Delhi Metallo beta-lactamase
NHSN - National Healthcare Safety Network
NI - Não Informado
PCR - Reação em Cadeia da Polimerase
RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphism
RDC - Resolução da Diretoria Colegiada
RNA - Ácido ribonucleico
SENTRY - Antimicrobial Surveillance Program
SHV - Sulfhydryl reagente variable
SNGPC - Sistema Nacional de Gerenciamento de Produtos Controlados

TEM - Temoneira

UTI - Unidade de Terapia Intensiva

VIM - Verona Imipenemase

XDR - Extensivamente Droga Resistente

LISTA DE ABREVIATURAS

A - Adenina
AMC - amoxicilina/ácido clavulânico
AMS - ampicilina/sulbactam
BHI - brain heart infusion
C - citosina
°C - grau celsius
F - feminino
G - guanina
g - grama
gyrA - girase subunidade A
GEN - gentamicina
GE - general eletrics
h - hora (s)
HCL - ácido clorídrico
H₂S - ácido sulfídrico
ITS - internal transcribed spacer
K.p - *Klebsiella pneumoniae*
M - masculino
min - minuto
mL - mililitro
mM - milimolar
MgCl₂ - cloreto de magnésio
n^o - número
ng - nanograma
NaCl - cloreto de sódio
PM - peso molecular
parC - topoisomerase subunidade IV
pb - pares de base

PPT - piperacilina/tazobactam

pm - picomoles

pH - potencial de hidrogênio

SAM - ampicilina/sulbactam

SIM - Sulfito, Indol e Motilidade

T – timina

TOB - tobramicina

TIM - ticarcilina/ácido clavulânico

V - volt

µg - micrograma

µL - microlitro

β - beta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1. MICROBIOTA INTESTINAL HUMANA.....	19
1.2. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	23
1.3. <i>K. pneumoniae</i> NO AMBIENTE HOSPITALAR	26
1.4. RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS.....	29
1.4.1. Beta-lactamases de Espectro Estendido – ESBL.....	32
1.4.2. Perfis de resistência aos antibióticos	35
1.5. DIVERSIDADE GENÉTICA DE <i>K. pneumoniae</i>	36
2. RELEVÂNCIA	40
3. OBJETIVOS	43
3.1. OBJETIVO GERAL	43
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
4. METODOLOGIA	44
4.1. ORIGEM DAS AMOSTRAS CLÍNICAS: COMPLEXO HOSPITALAR - HOSPITAL MUNICIPAL LOURENÇO JORGE / MATERNIDADE LEILA DINIZ (HMLJ)	44
4.2. ISOLADOS BACTERIANOS	44
4.2.1. Microbiota Normal	44
4.2.2. Isolados Clínicos	45
4.3. ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE <i>K. pneumoniae</i>	46
4.3.1. Isolados da Microbiota.....	46
4.4. CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA.....	47
4.5. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR	47
4.6. PRESERVAÇÃO DOS ISOLADOS	48
4.7. AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIBIÓTICOS	48
4.7.1. Método de Disco-Difusão (Kirby-Bauer)	48
4.7.2. Detecção de <i>Klebsiella pneumoniae</i> produtoras de ESBL	49
4.8. DIVERSIDADE GENÉTICA DAS CEPAS DE <i>K. pneumoniae</i>	50
4.8.1. Amplificação e Sequenciamento do gene <i>gyrA</i>	50
4.8.2. Análise das Sequências	50

4.8.3. Análise Filogenética	51
5. RESULTADOS.....	52
5.1. ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE <i>Klebsiella pneumoniae</i>	52
5.1.1. Isolados da Microbiota Intestinal	52
5.1.2. Identificação Fenotípica.....	52
5.2. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR	52
5.3. DEPÓSITO DOS ISOLADOS.....	54
5.4. SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA	54
5.4.1. Isolados da Microbiota Intestinal Normal.....	54
5.4.2. Isolados Clínicos	56
5.4.3. Análise Conjunta dos Perfis de Resistência dos Isolados Clínicos e da Microbiota Normal.....	58
5.5. DIVERSIDADE GENÉTICA.....	59
5.5.1. Amplificação e Análise das sequências.....	59
5.5.2. Análise Filogenética	60
5.6. GRUPOS FILOGENÉTICOS E A RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS.....	65
5.6.1. Isolados da Microbiota Normal	65
5.6.2. Isolado Clínicos	66
6. DISCUSSÃO	69
7. CONCLUSÕES	76
REFERÊNCIAS.....	77

1. INTRODUÇÃO

1.1. MICROBIOTA INTESTINAL HUMANA

A microbiota humana estabelece-se no início da vida – o feto no útero é estéril e a exposição aos microrganismos inicia-se no parto durante a passagem pelo canal vaginal e exposição aos microrganismos presentes no ambiente (LI; ZHOU; LIU, 2013).

O termo microbiota se refere a diversa população de microrganismos, como as bactérias e os fungos que habitam o corpo humano (BEIRÃO et al, 2014). Estes microrganismos colonizam diversas partes do corpo de indivíduos saudáveis como a pele, boca, olhos, sistema respiratório, sistema geniturinário e o trato gastrointestinal. Essas microbiotas são coletivamente referidas como microbiota normal. As comunidades microbianas, que colonizam os humanos, somam cerca de 100 trilhões de células, dez vezes mais que o número de células humanas (MADIGAM; MARTINKO, 2010).

Os microrganismos que compõem a microbiota normal podem existir como: mutualistas quando protegem o hospedeiro, competindo com patógenos comuns, produzindo nutrientes importantes e contribuindo para o desenvolvimento do sistema imunológico; comensais, quando mantêm associações aparentemente neutras sem benefícios ou malefícios detectáveis ao hospedeiro; e oportunistas, quando provocam doenças em indivíduos imunocomprometidos (MADIGAM; MARTINKO, 2010).

A microbiota é benéfica para o indivíduo quando há simbiose com o hospedeiro, equilíbrio entre as necessidades e efeitos recíprocos (KIRJAVAINEN; GIBSON, 1999). A relação de simbiose entre a microbiota intestinal e o ser humano apresenta vantagens ao hospedeiro: proteção, produção de vitaminas, fornecimento de energia, desenvolvimento do sistema imune e integridade do tecido intestinal (LAWLEY; WALKER, 2013).

O trato gastrointestinal alberga o maior número e a maior diversidade de espécies bacterianas, que colonizam o corpo humano. Através de estudos de metagenômica, estima-se que o trato intestinal humano contém 1800 gêneros distintos de bactérias, sendo estes representados por aproximadamente 15.000-36.000 espécies. Muitos

desses microrganismos são espécies não-cultiváveis pertencentes aos filos Firmicutes e Bacteroidetes (STEARNS et al, 2011).

As bactérias são frequentemente mais relacionadas à sua capacidade de desencadear infecções, do que a seus efeitos benéficos (BRANDT et al, 2006). Entretanto, a microbiota intestinal, adquirida no período pós-natal, é composta por grande diversidade de bactérias que desempenham diferentes funções no hospedeiro humano, entre elas a absorção de nutrientes, proteção contra patógenos e modulação do sistema imune (MORAIS; JACOBY, 2014).

As bactérias benéficas da microbiota intestinal, competem por sítios de adesão e por nutrientes, impedindo o estabelecimento de bactérias patogênicas (BRANDT et al, 2006). Em sua função imunomoduladora, a comunidade bacteriana interage com as células do epitélio intestinal do hospedeiro e provoca uma resposta contínua do sistema imune, dessa forma, o trato gastrointestinal e sua microbiota, são considerados importantes para a tolerância imunológica (GUARNER; MALAGELADA, 2003).

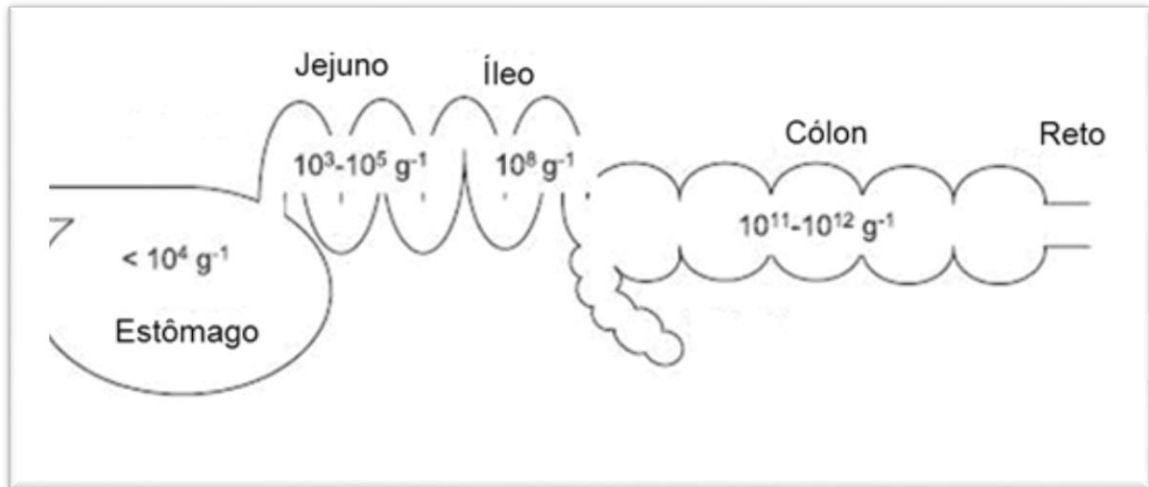
Outra função benéfica da microbiota intestinal está relacionada à contribuição para a nutrição e metabolismo do hospedeiro. A ação das bactérias intestinais sobre determinados nutrientes permite um melhor aproveitamento dos mesmos. Isto ocorre com substratos que chegam não digeridos ao lúmen do cólon, principalmente carboidratos, que são fermentados e formam ácidos absorvíveis pela mucosa. O processo é denominado salvamento energético e forma os ácidos graxos de cadeia curta, que constituem a principal fonte de energia dos colonócitos e têm efeito trófico no epitélio intestinal. Estes microrganismos também desempenham ainda um papel na síntese da vitamina K (EDWARDS; PARRET, 2002; GUARNER; MALAGELADA, 2003).

Os indivíduos apresentam composições bacterianas distintas, sendo esta composição em parte definida geneticamente e, em outra, determinada por características individuais e ambientais, como a forma de nascimento (parto normal ou cesariana), idade e hábitos alimentares, o que resulta numa grande variabilidade intra e interindividual (PENDERS et al, 2006; HUTTENHOWER; MORGAN; SEGATA, 2012).

A composição e a densidade bacteriana são variáveis ao longo do trato gastrointestinal, apresentando 10^4 bactérias/ml no estômago e 10^{12} bactérias/g de fezes

na parte distal do cólon, onde se verifica maior diversidade microbiana (LESER; MOLBAK, 2009) (FIGURA 1).

Figura 1. Representação esquemática da densidade bacteriana ao longo do trato intestinal



Os números descritos nas diferentes seções do intestino correspondem à quantidade de bactérias por grama do conteúdo intestinal encontrado em indivíduos saudáveis. Adaptado de: LESER; MOLBAK, 2009.

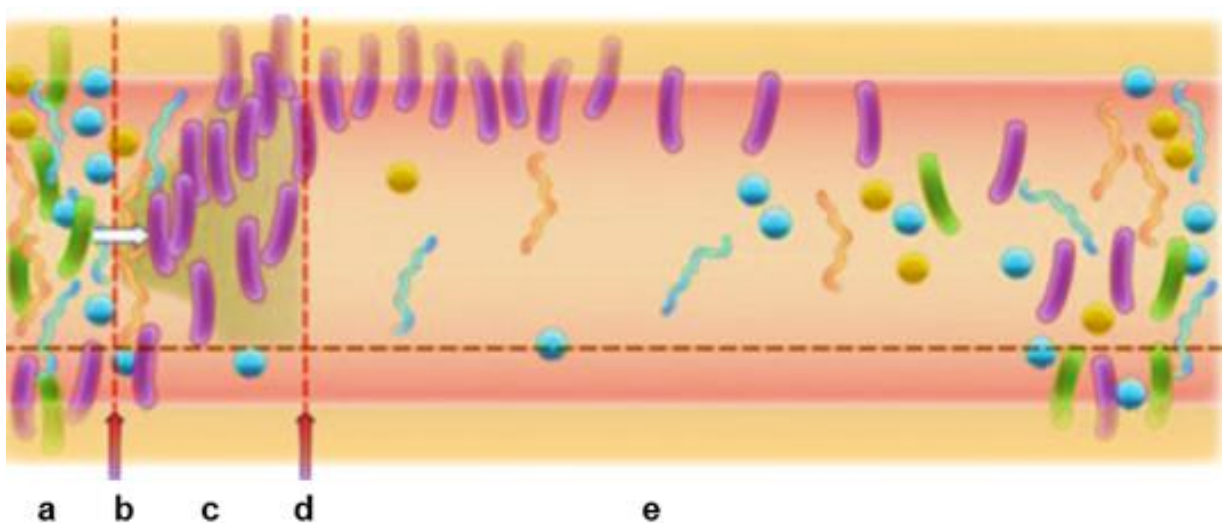
No estômago e no intestino delgado o ambiente é desfavorável para a colonização e proliferação bacteriana, devido à ação bactericida do suco gástrico, da bile e da secreção pancreática e, também, pelo intenso peristaltismo do intestino delgado. O íleo é um sítio de transição bacteriológica, entre a escassa população bacteriana do jejuno e a densa microbiota do cólon. No cólon, as bactérias encontram condições favoráveis para sua proliferação devido à ausência de secreções intestinais, peristaltismo lento e abundante suprimento nutricional. A população microbiana do cólon alcança de 10^{10} a 10^{12} microrganismos por grama de conteúdo intestinal e supera em número o total das células eucarióticas presentes no corpo humano (GUARNER; MALAGELADA, 2003).

Diversos gêneros de microrganismos compõem a população bacteriana intestinal, dentre eles destacam-se: *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Ruminococcus*, *Clostridium*, *Escherichia*, *Proteus*, *Enterococcus*, *Methanobrevibacter*, *Staphylococcus*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus* e *Klebsiella* (MADIGAN; MARTINKO, 2010).

A microbiota intestinal pode permanecer estável durante longos períodos, no entanto, fatores externos como a alimentação, desidratação, idade, origem geográfica, consumo de antibióticos e probióticos são responsáveis pela alteração da sua composição, justificando sua complexidade e diversidade (ROLAIN, 2013). Além disso, o trato intestinal é considerado um importante reservatório de bactérias e genes de resistência aos antibióticos com papel fundamental no desenvolvimento de algumas patologias, como inflamação intestinal, obesidade e desnutrição (SCHJORRING; KROGFELT, 2011; BAQUERO; NOMBELA, 2012).

Durante o tratamento com antibióticos, as bactérias da microbiota intestinal são expostas, mesmo que por períodos curtos, à pressão seletiva que induz de forma silenciosa as alterações na sua composição, diminuindo a diversidade bacteriana e a susceptibilidade aos antibióticos, aumentando assim a prevalência de bactérias resistentes (Figura 2) (JERNBERG et al, 2010). Entretanto, a alteração da composição bacteriana da microbiota intestinal pelo consumo de antibióticos depende do espectro de ação do mesmo, dosagem, duração do tratamento, via de administração e de suas propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas. Mesmo os antibióticos da mesma família e mesmo espectro de atividade, podem ter um impacto muito diferente, dependendo da velocidade de excreção intestinal (JERNBERG et al, 2010; RUPPÉ; ANDREMONT, 2013).

Figura 2. Impacto da administração de antibióticos na microbiota intestinal



(a) antes do tratamento com antibióticos, população bacteriana normal, com bactérias susceptíveis aos antibióticos (cor verde); (b) tratamento com antibiótico; (c) aumento significativo de bactérias resistentes (cor violeta); (d) fim do tratamento; (e) redução de bactérias resistentes aos antibióticos ao longo do tempo e estabilização da microbiota intestinal (adaptado de JERNBERG et al, 2010).

Bactérias resistentes aos antibióticos podem permanecer na microbiota intestinal durante meses, de forma assintomática, representando maior risco de desenvolvimento de infecção, particularmente em doentes clinicamente vulneráveis (LAWLEY; WALKER, 2013).

Em um estudo utilizando sequenciamento de nova geração (*next-generation sequencing*), foi analisada a diversidade fecal de três indivíduos saudáveis que foram submetidos à doses de ciprofloxacina por dois períodos de 5 dias cada. Do primeiro período de tratamento para o segundo, houve um intervalo de 190 dias. Ao final da exposição à ciprofloxacina, observou-se a diminuição da diversidade e alterações na composição da microbiota intestinal. Essas alterações ocorreram no intervalo de 3-4 dias após o início da administração da droga. O desequilíbrio causado pelo uso da ciprofloxacina na microbiota intestinal desses indivíduos demorou várias semanas para ser eliminado (DETHLEFSEN; RELMAN, 2011).

A colonização do trato gastrointestinal por *Klebsiella* spp resistentes aos antibióticos pode ocorrer em todas as pessoas e constituem importantes fontes de transmissão. Estudos têm demonstrado que pelo menos 80% dos pacientes com infecção por *K. pneumoniae* produtoras de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) tiveram infecções precedidas pela colonização do trato gastrointestinal (SHALES, 1997; PATERSON; BONOMO, 2005).

Assim, o trato intestinal humano é considerado um local emergente de bactérias resistentes aos antibióticos, sendo um importante reservatório e espaço de intercâmbio de genes de resistência entre bactérias comensais e patogênicas, como, por exemplo, os bacilos Gram negativos pertencentes à família Enterobacteriaceae (ROLAIN, 2013; RUPPÉ; ANDREMONT, 2013).

1.2. *Klebsiella pneumoniae*

O gênero *Klebsiella*, descrito em 1885 por Trevisan pertence à família Enterobacteriaceae, e compreende atualmente 6 espécies: *Klebsiella pneumoniae*,

subdividida em *subsp. pneumoniae*, *subsp. ozaenae* e *subsp. rhinoscleromatis*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella planticola*, *Klebsiella terrigena*, *Klebsiella ornithinolytica* e *Klebsiella variicola* (MARTÍNEZ et al, 2004; ROSENBLUETH et al, 2004). Entre as três subespécies de *Klebsiella*, a subespécie *pneumoniae* está entre as bactérias mais comumente encontradas em todo o mundo, entretanto, já foram descritos isolados clínicos de *K. planticola* relacionados a sepse (PODSCHUM; ULLMANN, 1998). É também conhecida primariamente como patógeno que causa graves pneumonias e bacteremias adquiridas na comunidade, principalmente em etilistas com desfechos fatais para os não tratados. Como patógeno oportunista compromete indivíduos imunocomprometidos e hospitalizados que apresentam sérias doenças de base. Os principais sítios primários de infecção são o trato respiratório e o urinário, mas também causa infecções intra-abdominais e no sangue (KONEMAN et al, 2001).

K. pneumoniae é um bastonete gram-negativo anaeróbio facultativo, não esporulado, imóvel, e cujo tamanho varia de 0,3 a 1µ de diâmetro e 0,6 a 6µ de comprimento. Esses bacilos expressam em sua superfície celular um polissacarídeo capsular (antígeno K) que recobre toda a célula. A presença da cápsula polissacarídica é considerada o mais importante fator de virulência de *K. pneumoniae*. Ela é responsável pela resistência das bactérias a diversos mecanismos de defesa do hospedeiro (PODSCHUM; ULLMANN, 1998; BRISSE, 2009). Além disso, pode causar qualquer tipo de infecção em ambientes hospitalares, incluindo surtos em recém-nascidos e adultos em UTI, o que é provavelmente associado à sua capacidade de se espalhar rapidamente no ambiente hospitalar (PODSHUN; ULLMANN, 1998; UMED, 2002; MARTÍNEZ et al, 2004). Dentre as síndromes clínicas mais frequentes relacionadas à *K. pneumoniae*, estão: pneumonia, infecções do trato urinário, trato gastrointestinal e de feridas, bacteremias, rinite crônica atrófica, artrites, enterites, meningites em crianças e septicemia (BRISSE; VERHOEF, 2001; BRISSE et al, 2009; HOLT et al, 2015).

K. pneumoniae pode ser encontrada colonizando a orofaringe e o trato intestinal de pessoas saudáveis, causando infecções, principalmente, em organismos imunodeprimidos, sendo assim, considerado um patógeno oportunista (MARTÍNEZ et al, 2004; SOUZA; RODRIGUES; MORAIS JÚNIOR, 2005). A frequência de isolamento de *K. pneumoniae* na orofaringe de pessoas saudáveis é de 1-6% e no trato intestinal de 5

a 32%. Já em pacientes hospitalizados a taxa de detecção dessa bactéria é de 77% em amostras de fezes e de 19% na orofaringe (KONEMAN et al, 2001). A colonização da orofaringe é fonte de infecções pulmonares em pacientes debilitados por alcoolismo, diabetes e portadores de doenças pulmonares crônicas (MADSON et al, 1994; INGHAM, 2000; UMED, 2002). *K. pneumoniae* é um importante patógeno de infecções tanto no meio ambiente comunitário quanto no hospitalar. O número de surtos hospitalares causados por este microrganismo é cada vez maior devido a alterações no padrão de sensibilidade aos antimicrobianos. Sua transmissão ocorre por contato direto ou por fonte comum podendo ocorrer em qualquer área física hospitalar e acometer pacientes clínicos, cirúrgicos e pediátricos. Está entre os principais patógenos que causam bacteremias nos Estados Unidos e Canadá. Na América Latina, é o terceiro patógeno mais prevalente, isolado do trato respiratório de pacientes hospitalizados com pneumonia (MARRA et al, 2011).

No meio ambiente, as bactérias do gênero *Klebsiella* estão presentes em água superficial, esgoto, solo e plantas (BRISSE et al, 2001; ROSENBLUETH et al, 2004) e ainda nas mucosas de mamíferos, tais como os seres humanos, cavalos e porcos. Espécies do gênero *Klebsiella*, bem como dos gêneros *Enterobacter* e *Citrobacter*, são comuns em humanos (PODSCHUN; ULLMANN, 1998).

No ambiente hospitalar, a taxa de colonização por *Klebsiella spp.* é alta. A transmissão de cepas de *K. pneumoniae* multirresistente entre os pacientes é frequente e nas unidades de tratamento intensivo é amplificada, devido à falta de higienização das mãos da equipe hospitalar (ANVISA, 2007). Em um estudo, 2 semanas após a admissão hospitalar, foi observado um aumento de duas a quatro vezes nas taxas de colonização por *Klebsiella*. Este aumento ocorreu principalmente em doentes tratados com antibióticos, especialmente naqueles que receberam múltiplos antibióticos de amplo espectro (POLLACK et al, 1972).

Dados globais mostram que a prevalência de *K. pneumoniae* produtoras de ESBL, que são enzimas que atuam na hidrólise dos antibióticos beta lactâmicos, foi de 44% na América do Sul, 33% na Europa, 22% na Ásia e 12% nos Estados Unidos (EJAZ et al., 2013). As infecções hospitalares por *K. pneumoniae* são um grave risco à saúde especialmente em unidades de neonatologia (HOLT, 2015).

O principal reservatório para a transmissão de *Klebsiella* tanto no ambiente hospitalar, quanto na comunidade é o trato gastrointestinal humano (ANVISA, 2007; VILAR, 2013).

1.3. *K. pneumoniae* NO AMBIENTE HOSPITALAR

Nos hospitais, o uso generalizado e excessivo da terapia antimicrobiana tem sido muitas vezes responsável pela ocorrência do aumento de cepas de *Klebsiella* resistentes em hospitais (ANVISA, 2007).

As infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) determinadas por bactérias multirresistentes ocorrem tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento (GISKE et al, 2008), porém o problema é mais expressivo nos hospitais de países em desenvolvimento devido à escassez de recursos financeiros, humanos, laboratórios habilitados e práticas de prevenção e controle de infecções hospitalares, além do uso elevado e abusivo de antimicrobianos (TOUFEN et al, 2003). Estas infecções constituem um grave problema de saúde, ocasionando um significativo aumento da morbidade e mortalidade (ALANIS, 2005; VOOTURI et al, 2009). O aumento no tempo de internação e nos gastos do sistema de saúde, no combate às infecções hospitalares, geram um grande impacto econômico para o hospital e para a saúde pública (MEIRELLES et al, 2002; NEIDELL et al, 2012).

A ocorrência das infecções causadas por microrganismos resistentes aos antibióticos constitui um problema mundial de Saúde Pública. Sabe-se que os hospitais, em geral, são caracterizados como ambientes onde é exercida uma grande pressão seletiva devido à enorme variedade de substâncias químicas utilizadas, como parte de programas de controle de infecções hospitalares. A associação dessas substâncias e microrganismos resulta, muitas vezes, na seleção de bactérias multirresistentes (YANG et al, 2009). Droppa e colaboradores (2009) observaram que das 127 cepas produtoras de ESBL, isoladas de um hospital universitário, 96 (75,6%) foram de isolados de *K.*

pneumoniae e 12 (9,3%) de *E. coli*, demonstrando a alta prevalência dessas espécies bacterianas nas infecções hospitalares.

Procedimentos invasivos, utilização de antibióticos e internações consecutivas, representam fatores de risco inerentes às instituições hospitalares que aumentam a probabilidade de aquisição e disseminação de bactérias resistentes aos antibióticos (CDC, 2013; LAUTENBACH, 2013). Bactérias resistentes, uma vez disseminadas, tornam-se um grande problema no controle de infecções, não somente dentro da instituição hospitalar, mas em toda a comunidade. Portanto, a caracterização acurada e rápida dos isolados hospitalares, bem como o estabelecimento de perfis de susceptibilidade aos antimicrobianos poderá contribuir para maior eficiência no tratamento, na recuperação de pacientes hospitalizados e na redução dos custos (HALLEY et al, 1990; KOLLEF et al, 1999).

A resistência a vários antimicrobianos, como as cefalosporinas de terceira e quarta gerações, é um problema bem conhecido entre as enterobactérias, pela presença de genes de resistência, que são constantemente expressos, quando comparados com bactérias susceptíveis aos antibióticos (JACOBY; PRICE, 2005).

As espécies de *K. pneumoniae* e *Escherichia coli* representam as enterobactérias mais frequentes como agentes de infecções hospitalares (GISKE et al, 2008). Um estudo na cidade do México demonstrou uma maior prevalência de *Escherichia coli* (31.8%) e *K. pneumoniae* (35.3%) produtoras de ESBL de amostras hospitalares em relação àquelas de origem comunitária (NAVARRO et al, 2011).

No Brasil, a Rede Nacional de Monitoramento da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde (Rede RM) em 2012, mostrou que 25,3% dos isolados de *K. pneumoniae* eram resistentes a cefalosporinas e carbapenêmicos, entretanto 35,3% foram resistentes apenas às cefalosporinas. Por outro lado, 26,7% dos isolados de *E. coli* foram resistentes as cefalosporinas e 6,3% foram resistentes a cefalosporinas e aos carbapenêmicos. Isolados de *Enterobacter spp.* e *Serratia spp.* apresentaram um percentual de 32,9% e 37,5% de resistência a cefalosporinas e para ambas as drogas, foram encontrados percentuais de 11,4% e 7,2% resistentes, respectivamente, em infecção de corrente sanguínea primária em pacientes adultos hospitalizados na UTI.

Gales e colaboradores (2012) avaliaram a prevalência de bactérias causadoras de infecções em hospitais de países da América Latina em diferentes sítios. Em infecções pulmonares, *K. pneumoniae* foi o quarto microrganismo mais isolado (10,2%), seguido de *Enterobacter spp.* (5,1%), *E. coli* (4,7%) e *Serratia marcescens* (3%). Enquanto em infecções na pele e tecidos moles, *E. coli* foi o segundo mais isolado (19,7%) e *K. pneumoniae*, o quarto (10,4%). Em infecções da corrente sanguínea, *E. coli* foi o segundo microrganismo mais isolado (19%), seguido de *K. pneumoniae* (12,3%).

Um estudo de vigilância realizado em hospitais americanos no período de 2009 a 2010 pela National Healthcare Safety Network (NHSN), do *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) mostrou que cinco gêneros de Enterobacteriaceae estavam entre os 10 microrganismos mais frequentemente isolados de infecções hospitalares. *E. coli* foi o terceiro mais isolado (11,5%), *Klebsiella spp.* foi o sexto (8%), *Enterobacter spp.* encontrava-se em oitavo lugar (4,7%), seguido de *Proteus spp.* (2,5%) e *Serratia spp.* (2,1%) (SIEVERT et al, 2013).

Em um Hospital Universitário do Brasil, foram estudados setecentos isolados de enterobactérias de amostras clínicas de pacientes internados, dos quais 356 (50.9%) foram identificados como *E. coli*, 167 (23.9%) *K. pneumoniae*, 134 (19.1%) *Enterobacter spp.*, 28 (4.0%) *Proteus mirabilis* e 15 (2.1%) *K. oxytoca* (VIDAL et al, 2011). Entre agosto de 2009 e outubro de 2010 foram registrados casos de infecções por *Klebsiella pneumoniae* em muitos estados brasileiros. No Distrito Federal houve a maior ocorrência, 207 casos, em São Paulo registrou-se 70 casos e em Minas Gerais 38 (ANVISA, 2010).

A frequência de isolamento de *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemases (KPC) em indivíduos hospitalizados no Brasil é maior do que nos EUA e na Europa (RIBEIRO et al, 2015). O surgimento de enterobactérias multirresistentes representa um grave problema de Saúde Pública, o que tem exigido esforço multidisciplinar para prevenção, controle e detecção laboratorial satisfatória (GISKE et al, 2011).

1.4. RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS

A descoberta de agentes infecciosos no fim do século XIX estimulou a pesquisa de tratamentos terapêuticos, entretanto, somente com o surgimento dos antibióticos na metade do século passado, o tratamento contra as infecções bacterianas foi bem-sucedido. Os antibióticos revolucionaram a medicina e sua descoberta foi um marco na história humana, porém com uso dessas drogas, rapidamente os microrganismos adaptaram-se e desenvolveram diversos mecanismos de resistência aos antibióticos (DAVIES; DAVIES, 2010).

Em uma escala evolutiva, a explosão maciça de fenótipos resistentes aos antibióticos é um evento muito recente que se seguiu à produção e utilização de antibióticos em grande escala na medicina clínica, veterinária, agricultura, aquicultura, horticultura e outras atividades humanas (RUSTAM, 2009). Já a evolução e aquisição de genes de resistência pelas bactérias em função do uso indevido dos antibióticos e à prescrição excessiva destes medicamentos, geraram uma força motriz que influencia a seleção da resistência. Uma variedade de mecanismos fisiológicos e bioquímicos pode ser responsável pela resistência bacteriana. A complexidade dos processos que contribuem para a emergência e disseminação desses mecanismos e a falta de controle e prevenção de fatores que desencadeiam o desenvolvimento de patógenos multirresistentes são a grande preocupação da maioria das agências internacionais e nacionais de saúde (DAVIES; DAVIES, 2010).

Um microrganismo pode ser constitutivamente resistente ou adquirir resistência a um determinado antibiótico. A resistência intrínseca é a característica inata da bactéria de não apresentar susceptibilidade a um determinado agente antimicrobiano, devido a características estruturais ou funcionais. Este fenótipo ocorre devido a diferentes fatores: falta de afinidade do agente antimicrobiano pelo alvo na bactéria; inacessibilidade do agente ao interior da célula; extrusão do agente por exportadores ativos; ou produção inata de enzimas que inativam a droga (HAWKEY, 1998; HAEGGMAN et al, 2004).

Os antibióticos beta-lactâmicos são os mais prescritos mundialmente e a produção de beta-lactamases como as beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) é um dos

principais mecanismos de resistência a estes antimicrobianos. Um estudo realizado no Brasil, na cidade de Caxias do Sul (RS), encontrou cepas resistentes portadoras do gene *bla_{SHV}* em isolados nosocomiais, de infecções na comunidade e em isolados de *K. pneumoniae*, obtidos da microbiota de indivíduos saudáveis (WOLLHEIM, 2011). A capacidade ou não das beta-lactamases em conferir resistência irá depender da quantidade de enzima produzida, da habilidade desta enzima em hidrolisar o antimicrobiano em questão e da velocidade com que o beta-lactâmico penetra pela membrana celular externa da bactéria (LIVERMORE, 2001). Outro mecanismo de resistência intrínseca é a expressão das bombas de efluxo, que impedem que o antibiótico tenha acesso ao seu alvo intracelular, bombeando-o para fora da célula. A bomba de efluxo AcrAB está envolvida na resistência a quinolonas e a outros antimicrobianos, como beta-lactâmicos, aminoglicosídeos, tetraciclina e cloranfenicol. A variação na atividade dessas bombas ocorre devido a alterações na transcrição de genes envolvidos na regulação e/ou expressão do sistema de efluxo (HASDEMIR et al, 2004; PADILLA et al, 2010).

A resistência adquirida ocorre quando uma bactéria previamente sensível aos antibióticos desenvolve resistência, que ocorre por meio de mutações ou por aquisição de resistência por transferência horizontal de genes (HAWKEY, 1998; HAEGGMAN et al, 2004). Esta resistência pode ser acarretada por alteração na permeabilidade da membrana celular, o que impede a ação dos antibióticos nas células bacterianas, isto ocorre devido a alterações nos genes que codificam as proteínas da membrana externa (OMPs), como as porinas. *Ompk35* e *Ompk36* são as principais porinas de membrana externa em *K. pneumoniae*. As porinas quando alteradas, levam ao aumento da concentração inibitória mínima (CIM) e, até mesmo, ao fenótipo de resistência às cefalosporinas, carbapenemas e fluoroquinolonas (MARTÍNEZ et al, 2008; FERNANDEZ et al, 2010; TSAI et al, 2011).

A emergência de multirresistência na família Enterobacteriaceae, especialmente em *K. pneumoniae*, é uma questão que necessita de atenção, pois este microrganismo é um importante agente causador de infecções hospitalares, tipicamente associado com pneumonias, infecções da corrente sanguínea, do trato urinário, bacteremias e outras

infecções intra-abdominais (KOTAPATI et al, 2005; LOPES et al, 2005; GROVER et al, 2006).

Isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* são naturalmente resistentes à ampicilina, amoxicilina, carbenicilina e ticarcilina devido à expressão de genes cromossomais *bla_{SHV}*, *bla_{OKP}* e *bla_{LEN}* que codificam beta-lactamases. Essas três famílias de genes evoluíram de um ancestral comum ao longo de milhões de anos, em paralelo com a diversificação dos três grupos filogenéticos de *K. pneumoniae*: KPI, KPII e KPIII (FEVRE et al, 2005).

Mutações em genes envolvidos no metabolismo da célula e que são alvo de antibióticos são outra fonte de resistência adquirida. Por exemplo, alelos mutados dos genes *gyr* (DNA girase) e *par* (DNA topoisomerase), que são alvos das quinolonas, geram fenótipos de não susceptibilidade às drogas desta classe. Estes eventos, seguidos de seleção de linhagens que se tornaram resistentes ao antibiótico, permitem a adaptação rápida das bactérias aos antimicrobianos e o surgimento de bactérias multirresistentes, que são resistentes a três ou mais classes de antibióticos (HAWKEY, 1998; TENOVER, 2006).

Adicionalmente, o mecanismo de resistência pode envolver a transferência lateral/horizontal de genes que atuam protegendo o alvo bacteriano do antibiótico ou que codificam uma proteína alternativa, incapaz de interagir com o antibiótico. A transferência de genes pode ocorrer por mecanismos clássicos como conjugação, transformação e transdução. Dentro deste contexto, existem também os *transposons*, elementos genéticos móveis que carregam os genes de resistência dos plasmídeos para os cromossomos, dando-lhes maior estabilidade e os *integrons* que são capazes de inserir, excisar, rearranjar e expressar genes através de um sistema de recombinação sítio-específico (MAZEL, 2006).

1.4.1. Beta-lactamases de Espectro Estendido – ESBL

As beta-lactamases são enzimas determinantes de resistência aos beta-lactâmicos. Atualmente existem dois esquemas de classificação em uso, baseado na estrutura molecular, classificação de Ambler (AMBLER, 1980) ou na função destas enzimas, pela classificação de Bush (BUSH et al, 1995). O esquema de Ambler é o mais usado e tem como base a sequência de aminoácidos das enzimas, separando as beta-lactamases em classe A, B, C ou D. As enzimas de classe A, C e D utilizam um resíduo serina para hidrolisar o anel beta-lactâmico. Já as enzimas de classe B são metaloenzimas, que requerem um íon zinco divalente para hidrólise do anel beta-lactâmico (BUSH; JACOBY, 2010).

As beta-lactamases da classe A são enzimas responsáveis por conferir resistência às penicilinas, cefalosporinas e monobactâmicos. Dentre elas estão as beta-lactamases de espectro estendido. As ESBLs são capazes de hidrolisar e causar resistência ou sensibilidade diminuída às penicilinas, oximino-cefalosporinas (cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima, cefepima) e monobactâmicos (aztreonama), mas não às cefamicinas (cefoxitina) e aos carbapenêmicos (imipenema, meropenema, ertapenema); são inibidas por compostos como o ácido clavulânico (clavulanato), o sulbactam e o tazobactam (DHILLON; CLARK, 2012). Os genes *bla*_{CTX-M}, *bla*_{PER}, *bla*_{VEB}, *bla*_{GES}, *bla*_{TEM}, e *bla*_{SHV} são responsáveis pela produção dessas enzimas. Os genes que codificam as ESBL são mais comumente encontrados em membros da família Enterobacteriaceae, porém os elementos genéticos móveis, como plasmídeos, transposons e integrons têm contribuído para o aumento da incidência de genes *bla*_{ESBL} entre outras bactérias Gram-negativas (LINCOPAN, 2012).

K. pneumoniae é a espécie entre as Enterobacteriaceae que apresenta a maior diversidade de fenótipos de resistência associados a produção de ESBL e onde estas enzimas são mais comumente encontradas (MOREIRA, 2011).

As beta-lactamases que pertencem à classe B, conhecidas como metalo-beta-lactamases (MBL) conferem resistência a um amplo espectro de antibióticos beta-lactâmicos, inclusive aos carbapenêmicos, antibióticos de última geração empregados no

tratamento de infecções graves causadas por enterobactérias produtoras de ESBL; são susceptíveis ao EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) mas não são inibidas por ácido clavulânico ou tazobactam, além de não possuírem atividade contra os monobactâmicos (BUSH; JACOBY, 2010). Nove tipos de MBL já foram descritas e as famílias IMP, VIM, SPM e NDM possuem maior importância clínica e epidemiológica, tendo sido identificadas em membros da família Enterobacteriaceae e outros microrganismos Gram-negativos (BUSH; JACOBY, 2010).

As beta-lactamases de classe C conferem resistência às cefalosporinas e não são hidrolisadas por ácido clavulânico ou tazobactam. Elas encontram-se codificadas no cromossomo de muitos membros da família Enterobacteriaceae, no entanto, *K. pneumoniae* não possui este gene no cromossomo.

Já as beta-lactamases de classe D são representadas pela família OXA, frequentemente associada a integrons de classe 1. Elas são caracterizadas por serem fracamente inibidas por ácido clavulânico e totalmente inibidas pelo tazobactam. Essas enzimas conferem resistência às penicilinas, oxacilina, ampicilina, carbenicilina e ticarcilina, assim como às cefalosporinas de espectro limitado, como a cefalotina (BUSH; JACOBY, 2010).

A maioria dos relatos de ESBL, durante os anos 90, dizia respeito a variantes de SHV e TEM, com exceção da América do Sul, onde CTX-M-2 ocorria com maior prevalência (HAWKEY; JONES 2009). Com a virada do século houve uma mudança nesse quadro, com linhagens produtoras de CTX-M tornando-se dominantes na Europa e na Ásia. Atualmente, isolados produtores desta enzima são considerados endêmicos na maior parte da América do Sul, Europa e Ásia (CANTÓN; COQUE, 2006). No Brasil, estudos demonstraram a alta prevalência do gene *bla*_{CTX-M} em diferentes clones de *K. pneumoniae*, provavelmente devido à localização destes genes em plasmídeos e integrons de classe 1, o que permite a transferência e expressão dos genes entre diferentes isolados de *K. pneumoniae* (GARCIA et al, 2007).

As enzimas carbapenemases são capazes de inativar praticamente todos os antibióticos beta-lactâmicos, incluindo os carbapenêmicos que são antimicrobianos frequentemente utilizados no tratamento das infecções nosocomiais. Estas enzimas apresentam ampla diversidade estrutural, pertencendo às classes A, B e D, pela

classificação de Ambler (NORDMANN et al, 2011). A enzima KPC é a principal carbapenemase da classe A de Ambler encontrada na América do Sul. Até o momento, já foram descritas 19 variantes desta enzima (KPC-2 a KPC-20) de acordo com o site www.lahey.org/studies (BUSH; JACOBY, 2015).

O gene *bla*_{KPC} foi identificado pela primeira vez em um isolado de *K. pneumoniae* de um hospital na Carolina do Norte, Estados Unidos e foi detectada na América do Sul 4 anos mais tarde, na Colômbia (YIGIT et al, 2001; BONELLI et al, 2014). Relatórios subsequentes demonstraram que *K. pneumoniae* produtoras da enzima KPC-2 também estavam presentes no Brasil e na Argentina desde 2005 e 2006, respectivamente (BONELLI et al, 2014).

A resistência aos carbapenêmicos em enterobactérias é um grave problema de Saúde Pública de âmbito mundial, particularmente pela elevada mortalidade e pelo reduzido número de opções terapêuticas. A produção de carbapenemases, seja por sua eficiência hidrolítica, sua codificação por genes localizados em elementos genéticos móveis como plasmídeos e transposons, ou por sua rápida disseminação em âmbito mundial, tem um impacto altamente significativo na saúde humana (ANVISA, 2013).

A emergência e a disseminação de beta-lactamases de espectro estendido entre os membros da família Enterobacteriaceae têm sido descritas mundialmente como ponto de urgência clínica devido à grande incidência desses isolados em infecções relacionadas com a assistência à saúde (IRAS) (SILVA; LINCOPAN, 2012). Nos hospitais brasileiros, a proporção de bacilos Gram-negativos, produtores de ESBL é maior do que em hospitais da Europa e dos Estados Unidos (GALES et al, 2012).

Atualmente, cepas produtoras de ESBL são encontradas também em pacientes da comunidade (DHILLON; CLARK, 2012). É importante destacar que foram identificadas Enterobacteriaceae produtoras de ESBL em diversas amostras ambientais, em fezes de indivíduos saudáveis, em alimentos, em fazendas de agropecuária e em esgotos, o que sugere que a comunidade pode funcionar como reservatório de cepas produtoras destas enzimas, fato que alerta para a possibilidade de sua expansão global (MESA et al, 2006).

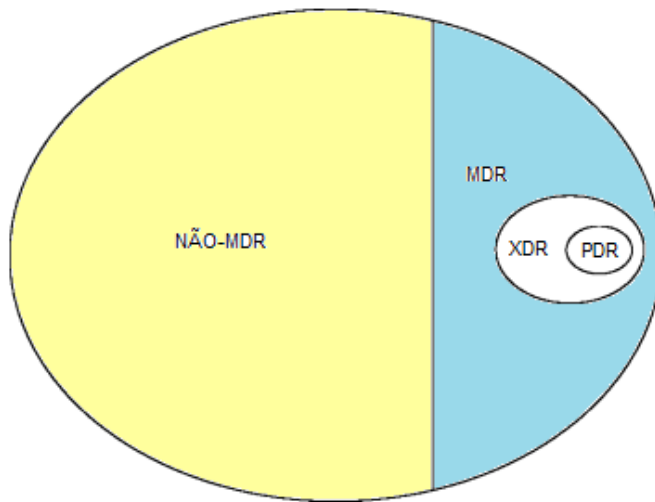
1.4.2. Perfis de resistência aos antibióticos

Com a emergente resistência aos antimicrobianos por bactérias patogênicas surgiu a necessidade de estabelecer definições harmonizadas para a descrição e classificação desses patógenos, de modo que dados de vigilância epidemiológica pudessem ser coletados de forma confiável e comparados entre os serviços de saúde em diferentes países. Peritos internacionais reuniram-se através de uma iniciativa conjunta do Centro Europeu de Prevenção e Controle das Doenças (ECDC) e os Centros de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), para estabelecer uma terminologia internacional padronizada para descrever os perfis de resistência em *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus spp.*, *Enterobacteriaceae* (exceto *Salmonella* e *Shigella*), *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter spp.*, ou seja, todas as bactérias frequentemente responsáveis por infecções associadas aos cuidados de saúde e susceptíveis à multirresistência (MAGIORAKOS et al, 2012).

Usando como referências o *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI), o *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) e o *United States Food and Drug Administration* (FDA), foi realizada uma seleção de antimicrobianos de diversas classes e sub-classes, em que os diferentes perfis de susceptibilidade frente à estas drogas indicariam os perfis de multiresistência dos microrganismos. Os perfis estabelecidos foram: MDR (multidroga resistente), XDR (extensivamente droga resistente) e PDR (pandroga resistente). O perfil MDR foi definido como a resistência a três classes distintas ou mais; XDR foi definido como resistência a todas as classes selecionadas, exceto duas e PDR, resistência a todas as classes selecionadas (Figura 3) (MAGIORAKOS et al, 2012).

Estabelecendo essas definições para MDR, XDR e PDR nos laboratórios de microbiologia clínica do mundo todo, permiti-se que haja uma comparação entre os resultados obtidos mundialmente e a compreensão dos mecanismos de resistência aos antimicrobianos.

Figura 3. Diagrama da inter-relação dos perfis de multirresistência



Fonte: MAGIORAKOS et al, 2012

1.5. DIVERSIDADE GENÉTICA DE *K. pneumoniae*

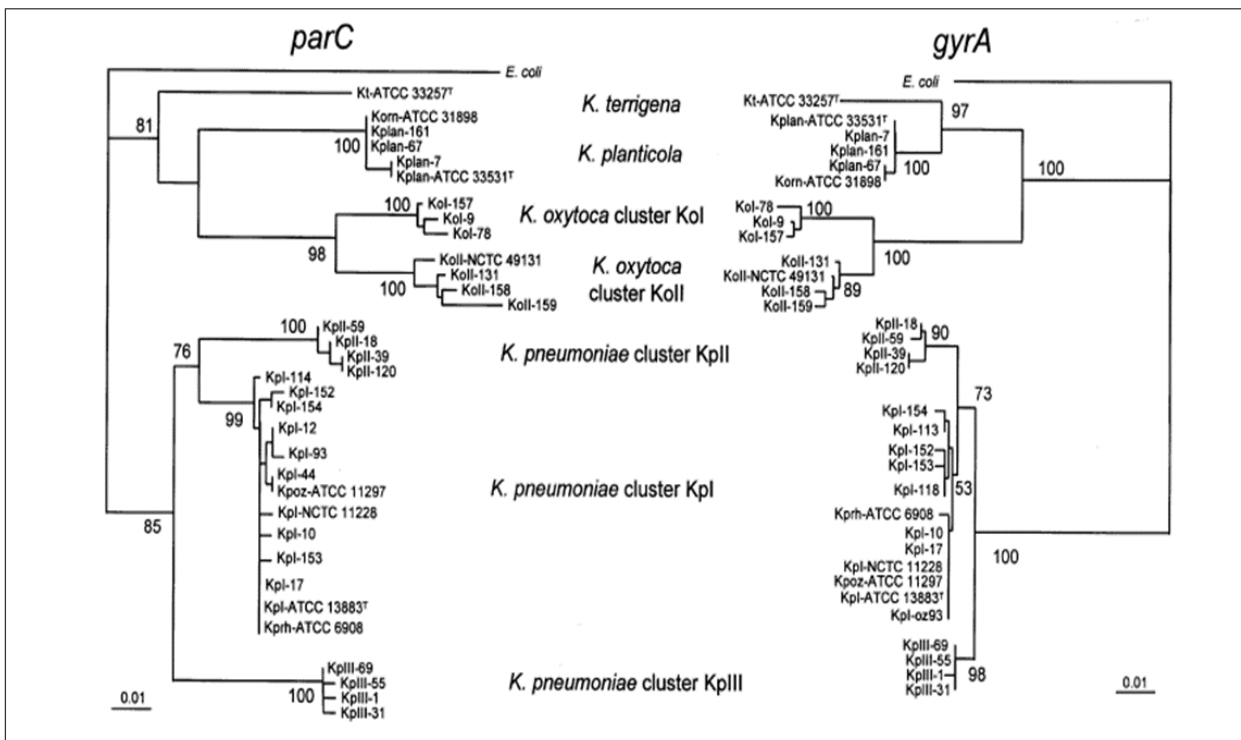
A análise genética de populações e a determinação das relações filogenéticas entre as linhagens bacterianas são abordagens comprovadamente adequadas para a compreensão do perfil epidemiológico e da evolução da patogenicidade de espécies bacterianas (BRISSE; VERHOEF, 2001). A associação entre a variabilidade genética, virulência e a transmissibilidade dos isolados de *K. pneumoniae* não são bem conhecidas, entretanto existem evidências sobre o comportamento diferenciado das linhagens que são geneticamente heterogêneas (BRISSE; VERHOEF, 2001). Um estudo utilizando camundongos, demonstrou diferentes fatores de virulência entre as linhagens de *Klebsiella*, albergando diferentes antígenos capsulares (MIZUTA et al, 1983; SIMONS et al, 1984).

K. pneumoniae expressa tipicamente dois tipos de antígenos em sua superfície celular, um lipopolissacarídeo (antígeno O) e um polissacarídeo capsular (antígeno K). A variabilidade estrutural desses antígenos é a base para a classificação dos organismos em diferentes sorotipos, que apresentam diferenças na virulência (TURTON et al, 2008). Estudos mostraram associação entre quadros clínicos graves e determinados sorotipos

de *K. pneumoniae*, principalmente os sorotipos capsulares K1 a K6. Hiper mucoviscosidade também é uma característica observada em isolados causando infecções graves (CHUANG et al, 2006; TURTON et al, 2008; BRISSE et al, 2009).

Com o objetivo de conhecer melhor as características clínicas, epidemiológicas e as infecções causadas por *K. pneumoniae*, Brisse e Verhoef (2001) analisaram 120 isolados clínicos dessa espécie, coletados em 22 hospitais. Esses isolados foram classificados em três grupos filogenéticos (KPI, KPII, KPIII) de acordo com as sequências dos genes *gyrA* (DNA-girase, subunidade A) e *parC* (Topoisomerase IV, subunidade C) (Figura 4).

Figura 4. Filogenia de *Klebsiella* spp. baseada na análise dos genes *gyrA* e *parC*



Árvore filogenética baseada na análise de 383 nucleotídeos do gene *gyrA* (à direita) e na análise de 319 nucleotídeos do gene *parC* (à esquerda). Para a construção dessa árvore foram utilizados isolados de diversas espécies do gênero *Klebsiella*. Dentro da espécie *K. pneumoniae* observa-se a formação de três clusters (KPI, KPII e KPIII). As duas árvores foram enraizadas com base nas sequências dos genes *gyrA* e *parC* de uma *E. coli* de referência. (BRISSE; VERHOEF, 2001).

Os genes *gyrA* e *parC* foram selecionados como marcadores filogenéticos por serem genes cromossômicos, constitutivos e com baixas taxas de mutação, sendo assim

chamados de genes “*housekeeping*”. Entretanto, a presença de mutações que conferem resistência aos antibióticos da classe das quinolonas já foram demonstradas nestes genes em muitas espécies bacterianas (MARCHISIO et al, 2015; CASAS et al, 2016).

Um estudo realizado por Fevre e colaboradores (2005), investigou a heterogeneidade dos genes cromossomais que codificam beta-lactamases, *bla*_{SHV}, *bla*_{OKP} e *bla*_{LEN} em *K. pneumoniae*. Ao analisar esses genes, foi demonstrada grande heterogeneidade do gene *bla*_{OKP}, sendo este, dividido em dois subgrupos: *bla*_{OKP-A} e *bla*_{OKP-B}. Durante a análise filogenética, o gene *bla*_{OKP} foi alocado no grupo filogenético KPII e para entender melhor esse agrupamento, a estrutura filogenética do grupo KPII também foi investigada por meio do sequenciamento dos genes *rpoB*, *gyrA* e *mdh*, o que resultou na concomitante subdivisão desse grupo em KPII-A e KPII-B.

Em 2008, foi publicada a sequência completa do genoma do isolado ambiental Kp342, com objetivo de compreender a complexidade genética e a versatilidade ecológica desta espécie bacteriana. O isolado revelou um cromossomo circular de 5.6 Mb e dois plasmídeos de 91 e 187.9 Kb e seu genoma foi comparado ao do MGH78578, um isolado clínico de *K. pneumoniae* (FOUTS et al, 2008). A susceptibilidade aos antimicrobianos e a patogenicidade de Kp342 foram comparadas a isolados clínicos da mesma espécie. O fenótipo de multirresistência apresentado por este isolado às principais famílias de antibióticos, como os beta-lactâmicos, os aminoglicosídeos, as quinolonas, e as tetraciclinas, estava relacionado à produção da beta-lactamases, bombas de efluxo e proteínas de membrana externa, codificados no genoma deste organismo. Em relação ao potencial patogênico de Kp342, experimentos em camundongo mostraram a capacidade desse isolado em causar infecção pulmonar e no trato urinário, mas sua virulência era reduzida. Ao final do estudo, concluiu-se que apesar de Kp342 ser encontrado no ambiente, vivendo em associação às plantas, ele tem o potencial de provocar infecções e apresenta o perfil de multirresistência aos antibióticos devido à presença de um conjunto de genes associados a esses mecanismos (FOUTS et al, 2008).

Em 2009, o isolado NTUH-K2044, obtido de um paciente com abscesso hepático e meningite, foi sequenciado e seu genoma comparado ao do isolado MGH78578, obtido de um paciente com pneumonia, com objetivo de observar a relação entre diferenças

genéticas e diferentes tipos de infecção (WU et al, 2009). O genoma de NTUH-K2044 também foi comparado com genomas de 15 *K. pneumoniae* obtidas de infecções nosocomiais e adquiridas na comunidade, de onde foram observadas assinaturas genômicas associadas a padrões de infecções (WU et al, 2009).

No Brasil, Melo e colaboradores (2011) determinaram a distribuição dos grupos filogenéticos KPI, KPII e KPIII em 94 isolados de *K. pneumoniae* provenientes de infecções nosocomiais, infecções da comunidade e da microbiota normal, através da amplificação e digestão enzimática (PCR- RFLP) do gene *gyrA*. Os isolados clínicos foram mais frequentes no grupo filogenético KPI enquanto que os isolados da comunidade e da microbiota normal foram agrupados em KPII e KPIII. No que se refere à susceptibilidade aos antibióticos, somente isolados do grupo KPI apresentaram resistência às cefalosporinas de terceira geração, ao aztreonam e ao imipenem (MELO et al, 2011).

Os estudos realizados na Europa e no Brasil, observaram que a linhagem filogenética específica de *K. pneumoniae* (KPI), tem prevalência dominante em isolados de origem hospitalar. A análise da susceptibilidade antimicrobiana deste grupo, demonstrou a presença de cepas resistentes às quinolonas, carbapenêmicos, monobactâmicos, penicilinas e às cefalosporinas de terceira geração (BRISSE; VERHOEF, 2001; MELLO et al, 2011).

As análises genômicas e filogenéticas de *K. pneumoniae* têm demonstrado a diversidade genética desse microrganismo e a variedade de mecanismos envolvidos nas diferenças de susceptibilidade aos antibióticos, permitindo assim, a melhor compreensão das características epidemiológicas no que se refere ao estabelecimento e transmissibilidade desse patógeno, principalmente no ambiente hospitalar (KUMAR et al, 2011).

2. RELEVÂNCIA

O atual interesse nas infecções causadas por *Klebsiella* se deve, principalmente, à propagação de cepas multirresistentes aos antibióticos, nas comunidades e nas unidades hospitalares, especialmente cepas produtoras de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) (PATERSON et al, 2003; GARCIA et al, 2007).

A Vigilância Sanitária é definida pela Lei Orgânica da Saúde (Lei 8080/1990) como “um conjunto de ações capaz de eliminar, diminuir, ou prevenir riscos à saúde e de intervir nos problemas sanitários decorrentes do meio ambiente, da produção e circulação de bens e da prestação de serviços de interesse da saúde” (BRASIL, 1990). Desta forma, o campo de atuação da vigilância sanitária torna-se vasto e ilimitado com poder de interferir em toda as condições econômico-sociais e de vida, isto é, em todos os fatores determinantes do processo saúde–doença (EDUARDO, 1998). Dentro deste vasto campo de ações, destacamos as que se referem à saúde da comunidade e ao controle das infecções hospitalares.

Atualmente uma das grandes preocupações da Vigilância Sanitária no Brasil está relacionada à disseminação e ao aumento do número de bactérias resistentes aos antibióticos, que implicam diretamente no tratamento e na cura das infecções (PRADO et al, 2007). O monitoramento destes microrganismos permite o conhecimento mais específico destes patógenos de grande relevância no cenário da saúde pública.

Um programa de vigilância de resistência bacteriana de abrangência mundial denominado SENTRY - *Antimicrobial Surveillance Program* - identificou maiores taxas de resistência entre os bastonetes Gram-negativos na América Latina que em outras regiões do continente. O principal mecanismo de resistência identificado foi a produção de ESBL. Das cepas de *Klebsiella spp.* isoladas, 47,3% eram produtoras de ESBL (SADER et al, 2002). Esse aumento da resistência bacteriana aos antibióticos acarreta dificuldades no tratamento das infecções e contribui para o aumento dos custos do Sistema Único de Saúde (SUS) (BERTO, 2006).

No Brasil, a resistência de *K. pneumoniae* aos antimicrobianos nos últimos anos se tornou um problema de saúde pública, além da preocupação em todos os campos da

saúde. Notícias sobre mortes provocadas pela bactéria *Klebsiella pneumoniae*, produtora da enzima carbapenemase (KPC), provocaram alarde em todo território nacional. Segundo dados do Ministério da Saúde, no Distrito Federal foram feitas 187 notificações de infecção no ano de 2010, sendo registrados 18 óbitos. Em São Paulo, o Hospital das Clínicas registrou 70 casos desde 2008 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

Historicamente, os pacientes hospitalizados eram o principal reservatório de bactérias produtoras de ESBL e a propagação destes organismos foi visto como um problema epidemiológico apenas para serviços de saúde. No entanto, durante a última década, esses microrganismos se espalharam dentro da comunidade. A colonização intestinal por enterobactérias produtoras de ESBL em pacientes internados em unidades hospitalares pode preceder o início de surtos de infecções como infecção do trato urinário e bacteremia (DONSKEY, 2006; RUPPÉ; ANDREMONT, 2013).

Em situações de alta, pacientes colonizados por estes bacilos Gram negativos multirresistentes aos antibióticos contribuem para a disseminação extra-hospitalar atingindo a comunidade (ARPIN et al, 2003). A situação inversa também pode acontecer permitindo a introdução desses bacilos resistentes no ambiente hospitalar (ARPIN et al, 2003; MARCH et al, 2010; HILTY et al, 2012).

Com o objetivo de fortalecer a política de uso racional de antimicrobianos, contribuindo para a redução da resistência bacteriana na população, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) publicou a RDC 44/2010 (BRASIL, 2010), atualizada pela RDC 20/2011 (BRASIL, 2011). Esta nova resolução determinou que os antibióticos vendidos nas farmácias e drogarias do país apenas poderiam ser entregues ao consumidor mediante receita de controle especial em duas vias, e a partir de janeiro de 2013 só poderiam ser comercializados mediante escrituração obrigatória no Sistema Nacional de Gerenciamento de Produtos Controlados (SNGPC). As novas regras definem adequações de embalagem desses produtos e determinam a obrigatoriedade de retenção de receita para liberação dos medicamentos. Também exige a escrituração da movimentação desses produtos em farmácias e drogarias, visando ainda coibir a venda ilegal de antimicrobianos sem prescrição no país, promover o uso racional de medicamentos, contribuir para o combate à resistência bacteriana, além de evitar a exposição da população aos riscos da automedicação (BRASIL, 2010).

A preocupação com a disseminação de bactérias resistentes aos antibióticos se refere, sobretudo, à infecção hospitalar. Entretanto, o aumento da resistência aos antimicrobianos tem sido observado não somente no ambiente hospitalar, mas também em amostras provenientes da comunidade. Um estudo, na Argentina, detectou a presença de enterobactérias produtoras de ESBL e resistentes aos carbapenêmicos em indivíduos não hospitalizados. O grande número de indivíduos saudáveis portadores de bactérias resistentes aumenta o risco de que outros indivíduos saudáveis também se tornem portadores desses microrganismos, através de vias de transmissão direta ou indireta. Além disso, a admissão hospitalar de pacientes portadores de bactérias resistentes aumenta o risco de surtos das infecções nosocomiais (VILAR, 2013).

A abordagem de agrupamento filogenético, adotada neste estudo, dos isolados de *K. pneumoniae* de origem clínica e da microbiota normal intestinal é relevante, pois permite a detecção de cepas geneticamente heterogêneas com características patogênicas e epidemiológicas distintas. Os dados obtidos a partir dessa análise, certamente fornecerão informações mais detalhadas capazes de auxiliar na seleção de tratamentos terapêuticos adequados e efetivos.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Determinar a distribuição dos grupos filogenéticos de *Klebsiella pneumoniae* isolados do material fecal de indivíduos sadios (microbiota intestinal normal) e de pacientes hospitalizados (isolados clínicos) associados à susceptibilidade aos antimicrobianos.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar cepas de *K. pneumoniae* do material fecal de voluntários sadios;
- Identificar os isolados da microbiota intestinal normal através de provas bioquímicas e pela PCR com iniciadores específicos para *K. pneumoniae*;
- Determinar a susceptibilidade aos antibióticos dos isolados de *K. pneumoniae* clínicos e da microbiota intestinal normal, através do método de disco-difusão;
- Detectar fenotipicamente a presença de ESBL nos isolados resistentes à cefepima e ceftazidima;
- Amplificar e sequenciar os genes *gyrA* dos isolados de *K. pneumoniae*;
- Posicionar as sequências dos genes *gyrA* no espaço filogenético através de ferramentas de bioinformática e classificar os isolados de acordo com os grupos filogenéticos já estabelecidos;
- Comparar os resultados dos perfis de resistência e da diversidade genética dos isolados da microbiota intestinal normal e dos isolados de origem hospitalar.

4. METODOLOGIA

4.1. ORIGEM DAS AMOSTRAS CLÍNICAS: COMPLEXO HOSPITALAR - HOSPITAL MUNICIPAL LOURENÇO JORGE / MATERNIDADE LEILA DINIZ (HMLJ)

O Hospital Municipal Lourenço Jorge tem perfil de grande emergência, possui 258 leitos, distribuídos entre os setores de cirurgia geral, bucomaxilofacial e ortopedia, traumatologia, clínica geral, neonatologia e de AIDS, UTI adulto, 12 unidades intermediárias neonatais, unidade de isolamento, unidade intermediária, UTI neonatal, obstetrícia clínica e cirúrgica, pediatria clínica, fisiologia e psiquiatria. A Maternidade Leila Diniz, por sua vez, possui 105 leitos distribuídos nos setores de cirurgia geral e ginecológica, clínica geral e neonatologia, UTI neonatal, unidade intermediária neonatal, obstetrícia clínica e cirúrgica. As duas unidades, localizadas na Cidade do Rio de Janeiro, totalizam 363 leitos e realizam cerca de 30 mil atendimentos mensais (BUENO, 2005).

4.2. ISOLADOS BACTERIANOS

4.2.1. Microbiota Normal

Foram obtidas 65 amostras fecais de voluntários saudáveis. Os participantes foram selecionados de acordo com os seguintes parâmetros: A - voluntários que não haviam se submetido à antibioticoterapia no prazo máximo de um mês anterior à data de coleta do material fecal; B - voluntários que haviam se submetido a antibioticoterapia no prazo máximo de um mês anterior à data de coleta do material fecal. O período de coleta das amostras foi de julho a outubro de 2014.

Os voluntários foram representados por 67% do sexo feminino e 33% do sexo masculino. A faixa etária dos voluntários variou entre 0 a 80 anos, com maior percentual de adultos de 20 a 30 anos e de 50 a 65 anos, ambos representando 19% da amostragem.

As amostras foram identificadas com as siglas M (masculino) e F (feminino); a idade do doador e o nome do antibiótico, no caso de doadores que haviam se submetido à antibioticoterapia.

4.2.2. Isolados Clínicos

Os isolados clínicos analisados foram provenientes de pacientes internados no Hospital Municipal Lourenço Jorge nas seguintes unidades do HMLJ: Clínica médica (n=1), Centro de Tratamento Intensivo (n=8), Ambulatório (n=1), Unidade Intensiva (n=1), Maternidade (n=2) e setor não informado (n=21). As fontes de isolamento foram: *swab* retal (n=8) secreção retal (n=6), sangue (n=2), secreção traqueal (n=1), urina (n=11) e fonte não informada (n=6) (Gráfico 1 e 2)

Todos os isolados fazem parte da Coleção de Pesquisa do Laboratório de Microrganismos de Referência (LMR), foram coletados no período de fevereiro a março de 2011 e identificados pelo sistema Vitek II do Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Municipal Lourenço Jorge, no Rio de Janeiro.

Gráfico 1. Distribuição dos isolados clínicos por setor coletado

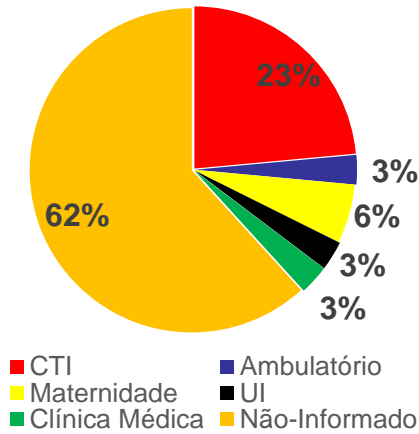
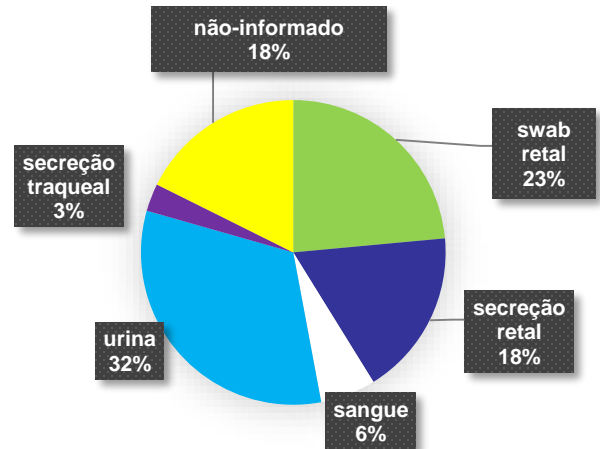


Gráfico 2. Distribuição dos isolados clínicos por sítio de isolamento



4.3. ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE *K. pneumoniae*

4.3.1. Isolados da Microbiota

A coleta da amostra fecal dos voluntários sadios da comunidade foi realizada através de *swabs* estéreis, utilizando-se o meio de transporte *Stuart*. O material foi transportado para o laboratório e inoculado em caldo “Brain Heart Infusion”- BHI (DIFCO®) à 37°C por 4 h. para enriquecimento. Após esse período, a cultura foi semeada pela técnica de esgotamento, em placas de ágar MacConkey (DIFCO®) e incubadas a 37°C por 24 h. Após a incubação, as colônias lactose positivas (róseas), mucoides e superfície lisa foram selecionadas.

4.4. CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA

Após seleção inicial, os isolados da microbiota intestinal normal suspeitos de *K. pneumoniae* foram semeados em ágar BHI e incubadas a 37°C durante 24 horas. Em seguida, foi realizada a técnica de coloração de Gram para a determinação das características morfo-tintoriais dos isolados (BIER, 1970). Para diferenciação presuntiva entre cepas de *Escherichia coli* e de *K. pneumoniae*, morfologicamente semelhantes, as colônias Gram-negativas foram submetidas aos testes bioquímicos de oxidação do citrato (Citrato de Simmons), produção de sulfeto (H₂S), indol e motilidade (SIM). Os resultados foram interpretados de acordo com o Manual Bergey (BERGEY'S..., 2011).

4.5. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

Os isolados clínicos do Hospital Municipal Lourenço Jorge e os isolados da microbiota intestinal, identificados presuntivamente através das provas bioquímicas foram certificados através da metodologia molecular. A extração do DNA genômico foi realizada utilizando-se o protocolo para Gram negativo do kit *Dneasy® Blood&Tissue* (Qiagen®), de acordo com as instruções do fabricante. A identificação molecular foi realizada através da PCR (reação em cadeia da polimerase) pela amplificação da região intergênica do operon ribossomal 16S – 23S (ITS-PCR) com iniciadores específicos para identificação molecular da espécie *K. pneumoniae*: Pf (5'-ATTTGAAGAGGTTGCAAACGAT-3') e Pr2 (5'-CGAAGATGTTTCACTTCTGATT-3') resultando em fragmento contendo 292 pares de bases, descritos por Liu e colaboradores (2008). O volume final da mistura de reação foi de 50 µL, contendo os seguintes reagentes: 5 µL de 10x PCR tampão (500 mM KCl, 100 mM Tris HCl [pH 9.0]), 50 pmol/µL de cada um dos iniciadores, 1,5 mM de MgCl₂, 200 µM de cada deoxinucleotídeo trifosfato (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 1 U *Taq* DNA polimerase e água deionizada q.s.p. 45 µL. A esta mistura foram adicionados 5 µL (75 ng) do DNA a ser analisado. As cepas

de referência *K. pneumoniae* (ATCC 13883) e *Escherichia coli* (ATCC 25922) foram utilizadas para avaliar a especificidade dos iniciadores (controles das amostras) e uma alíquota de água deionizada estéril foi empregada para avaliar a ausência de DNA contaminante na mistura da PCR (controle da reação). As condições de amplificação foram: 10 min a 94°C seguido por 30 ciclos de: 30s a 94°C, 20s a 58°C e 20s a 72°C e um ciclo adicional de 10 min a 72°C. O DNA genômico foi analisado por eletroforese em gel de agarose (SIGMA) a 1% no tampão TBE 0.5X durante 1 h a 50V e corado com solução Gel Red (Nucleic Acid Gel Stain) (1X).

As imagens foram digitalizadas e analisadas pelo sistema de vídeo documentação ImageQuant 300 (GE).

4.6. PRESERVAÇÃO DOS ISOLADOS

Logo após o isolamento, as cepas foram preservadas em caldo BHI com 20% glicerol e estocadas a -70°C. Após a identificação fenotípica e certificação molecular, dos isolados de *K. pneumoniae* (microbiota normal intestinal) foram preservados por liofilização e depositados na Coleção de Microrganismos de Pesquisa do INCQS/FIOCRUZ. A liofilização foi realizada segundo o POP 65.3230.001 (INCQS, 2015).

4.7. AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIBIÓTICOS

4.7.1. Método de Disco-Difusão (Kirby-Bauer)

A susceptibilidade aos antimicrobianos foi determinada pelo método técnica de disco-difusão (Kirby-Bauer) e os resultados foram interpretados segundo os critérios

estabelecidos pelo *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2015). As cepas de referência de *E. coli* (ATCC 35218), *P. aeruginosa* (ATCC 27853) e *E. coli* (ATCC 25922) foram utilizadas como controle da qualidade dos discos.

Os isolados de *K. pneumoniae* foram inicialmente semeados em ágar BHI por 24 h. a 37°C e o crescimento microbiano suspenso em solução salina estéril (NaCl 0,85%) para a obtenção do padrão de turbidez 0,5 na escala de McFarland. A suspensão foi semeada, com o auxílio de um *swab*, em ágar Mueller-Hinton e os discos de antibióticos (BD Sensi-Disc™) foram depositados sobre o meio.

Foram utilizados 19 antibióticos: gentamicina (10 µg), tobramicina (10 µg), ticarcilina/ácido clavulânico (75/10 µg), piperacilina/tazobactam (100/10 µg), imipenema (10 µg), meropenema (10 µg), ceftazidima (30 µg), cefepima (30 µg), cefoxitina (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), trimethoprim-sulfametazole (1,25/23,75 µg), aztreonam (30 µg), amoxicilina/ácido clavulânico (20/10 µg), ampicilina/sulbactam (10/10 µg), ertapenema (10 µg), colistina (10 µg), fosfomicina (200 µg), tetraciclina (30 µg) e cloranfenicol (30 µg).

Os isolados que apresentaram resistência à ceftazidima e cefepima foram classificados como possíveis produtores de ESBL (DHILLON; CLARK, 2012). Os perfis de multidroga resistentes (MDR) e extensivamente droga resistente (XDR) foram definidos de acordo com Magiorakos e colaboradores (2012).

4.7.2. Detecção de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de ESBL

Foi utilizado o meio Chromoagar – ESBL (CHROMagar, Paris, France) para a detecção de isolados de *K. pneumoniae* produtoras de ESBL. A presença de crescimento com coloração azul metálico indicou o resultado positivo. Este teste foi realizado em amostras resistentes à ceftazidima e cefepima pela técnica de disco-difusão.

4.8. DIVERSIDADE GENÉTICA DAS CEPAS DE *K. pneumoniae*

4.8.1. Amplificação e Sequenciamento do gene *gyrA*

A classificação dos grupos filogenéticos das linhagens de *K. pneumoniae* (KPI, KPII e KPIII) foi realizada por meio da PCR utilizando os iniciadores *gyrA*-A (5'-CGCGTACTATACGCCATGAACGTA-3') e *gyrA*-C (5'-ACCGTTGATCACTTCGGTCAGG-3'), nas condições descritas por Brisse e Verhoef (2001). Foi realizada a otimização da reação de amplificação, através de um gradiente de temperatura de anelamento (55-60 °C). A condição ideal de temperatura de anelamento estabelecida foi de 56°C.

Após amplificação, os produtos obtidos da reação foram purificados, pelo Kit QIAquick PCR Purification (Qiagen®), conforme o manual do fabricante. Os produtos foram quantificados e sua concentração ajustada para 200 ng/μL. As reações de sequenciamento foram realizadas em duplicata para cada iniciador utilizando terminadores dideoxi-fluorescentes (BigDye; Applied Biosystems), no sequenciador de DNA automatizado Applied Biosystems ABI Prism 3730. O sequenciamento foi realizado na Plataforma de sequenciamento do PDTIS/FIOCRUZ.

4.8.2. Análise das Sequências

Cada cromatograma obtido foi fornecido como arquivo de entrada ao programa *Sequencher*, que o transformou em dois arquivos de saída; um arquivo “fasta” onde cada pico do cromatograma é traduzido para sua base nitrogenada correspondente (A, T, C ou G) e um arquivo “Base quality” onde cada base recebe um valor de qualidade, que reflete o grau de confiança que se tem naquela posição (OLIVEIRA et al, 2010). As sequências de boa qualidade, ou seja, ≥ 20 (CLEMENTINO et al, 2007) apresentaram os percentuais de identidade por meio do programa BLASTn disponível no *National Center*

for *Biotechnology Information* (NCBI), onde foram comparadas com sequências depositadas no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov).

4.8.3. Análise Filogenética

As árvores filogenéticas foram construídas pelo algoritmo de neighbor-joining (SAITOU; NEI, 1987) baseadas nas distâncias calculadas pelo método Kimura-2 (KIMURA, 1980), usando o programa MEGA 6 (TAMURA et al, 2013). A significância das ramificações das árvores filogenéticas foi avaliada por meio de Bootstrapping com 1000 repetições.

5. RESULTADOS

5.1. ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE *Klebsiella pneumoniae*

5.1.1. Isolados da Microbiota Intestinal

Foram selecionadas 110 colônias através dos meios seletivo ágar MacConkey que se apresentaram como bastonetes Gram-negativos, sendo 47,2% da microbiota de doadores sob efeito de antibióticos (microbiota B) (n=58) e 52,8% da microbiota de voluntários que não estavam sob efeito (microbiota A) (n= 52).

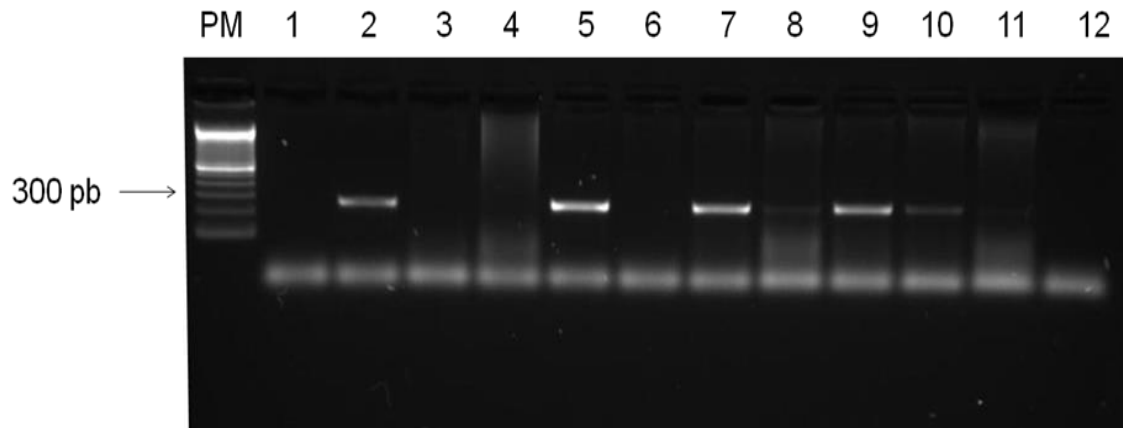
5.1.2. Identificação Fenotípica

Dos 110 isolados suspeitos de pertencerem ao gênero *Klebsiella* submetidos às provas bioquímicas, 85 apresentaram características compatíveis com *K. pneumoniae*, sendo 44 isolados da microbiota B e 41 isolados da microbiota A.

5.2. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

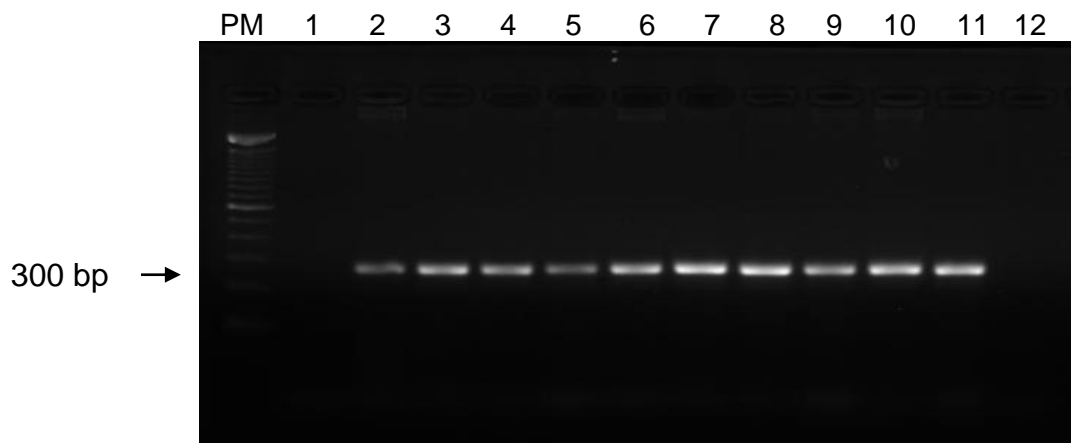
Dos 44 isolados da microbiota B e 41 isolados da microbiota A, submetidos à ITS-PCR, 28 cepas (64%) e 33 cepas (69%) da microbiota B e A, respectivamente, apresentaram fragmento de 260 pares de base compatível com a cepa de referência de *K. pneumoniae* ATCC 13883. Trinta e quatro isolados clínicos (100%) foram certificados como *K. pneumoniae* através da ITS-PCR (Figura 5 e 6)

Figura 5. Gel representativo da identificação dos isolados suspeitos de *K. pneumoniae* da microbiota normal pela ITS-PCR



PM= 100 pb (Invitrogen); 1- *E. coli* ATCC 25922; 2- *K. pneumoniae* ATCC 13883; 3- F-27(B); 4- F-23 (A); 5- M-51 (B); 6- M-25 (B); 7- F-58 (A); 8- F-43 (A); 9- F-29 (B); 10- F-46 (B); 11- M-43(A); 12- H₂O. (M) sexo masculino, (F) sexo feminino. (A) Microbiota sem influência de antibióticos e (B) Microbiota de indivíduos que fizeram uso de antibióticos. Os números ao lado das siglas correspondem à idade dos voluntários.

Figura 6. Gel representativo da identificação dos isolados clínicos de *K. pneumoniae* pela ITS-PCR



PM = 100bp (Invitrogen) 1- *E. coli* ATCC 25922; 2- *K. pneumoniae* 13883; 3 – P3957; 4- P4040; 5- P4024; 6- P3860; 7- P3910; 8- P3927; 9- P3805; 10- P3806; 11- P3804; 12- H₂O.

5.3. DEPÓSITO DOS ISOLADOS

Após a identificação fenotípica e certificação molecular os isolados depositados na Coleção de Microrganismos de Pesquisa do INCQS/FIOCRUZ com a seguinte identificação: isolados da microbiota normal intestinal (P4086, P4090 a P4092, P4100 a P4104, P4109, P4111 a P4115, P4119, P4121, P4122, P4125, P4127, P4996 a P5022, P5024, P5025 a P5037).

5.4. SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA

5.4.1. Isolados da Microbiota Intestinal Normal

Dos 61 isolados de *K. pneumoniae* da microbiota normal, 11 isolados da microbiota B e 12 isolados da microbiota A apresentaram resistência às penicilinas de amplo espectro e aos aminoglicosídeos testados. Um único isolado da microbiota B também apresentou resistência à tetraciclina. Foram obtidos diferentes perfis de resistência entre os isolados, sendo 10 perfis da Microbiota B e 7 perfis da microbiota A (Tabelas 1 e 2).

Nenhum isolado da microbiota normal apresentou perfil multidroga resistente (MDR) ou extensivamente droga resistente (XDR).

Tabela 1. Perfil de resistência aos antibióticos de *K. pneumoniae* isolados da microbiota intestinal normal de voluntários que fizeram o uso de antibióticos (Microbiota B)

Perfil	Voluntário (sexo)	Idade (anos)	Resistência	Antibiótico em uso	Isolados (%)
I	---	---	Sensível a todos	---	57,1%
II	F / F	02/46	TOB	Azitromicina(F-46), Amoxicilina(F-02)	7,1%
III	F / F	46/64	GEN	Clavulin (F-46), Azitromicina (F-64)	7,1%
IV	F	33	PPT	Clavulin	3,6%
V	F	64	GEN, TOB	Clavulin	3,6%
VI	F	44	TIM, AMS	Ciprofloxacina	3,6%
VII	M	39	TIM, PPT, AMC	Amoxicilina	3,6%
VIII	M	39	AMC, TET	Amoxicilina	7,1%
IX	F	35	TIM, AMS, TET	Amoxicilina	3,6%
X	F	46	AMS, PPT	Azitromicina	3,6 %

TOB (tobramicina), GEN (gentamicina), PPT (piperacilina/tazobactam), AMS (ampicilina/sulbactam), AMC (amoxicilina/ácido clavulânico), TIM (ticarcilina/ácido clavulânico), TET (tetraciclina), F (feminino) e M (masculino). "Clavulin" = nome comercial para amoxicilina/ ácido clavulânico

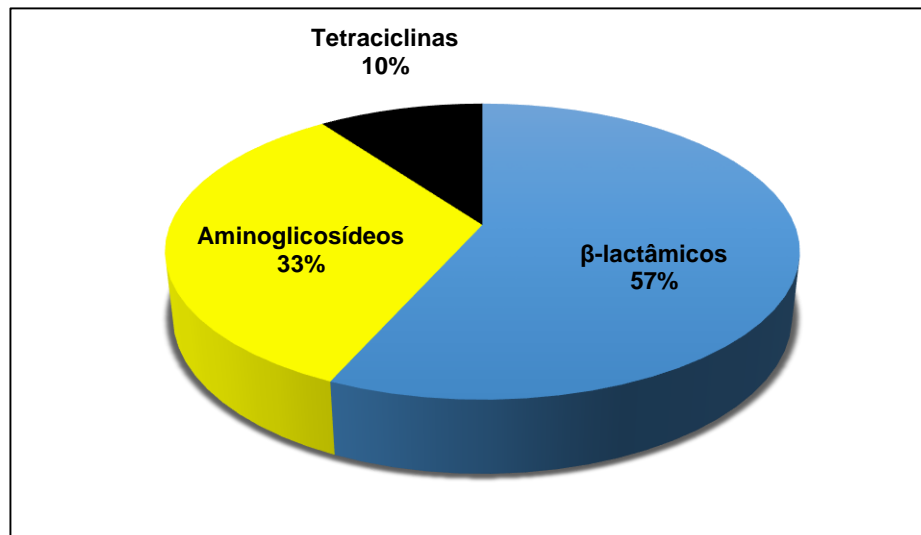
Tabela 2. Perfil de resistência aos antibióticos de *K. pneumoniae* isolados da microbiota intestinal normal de voluntários que não fizeram uso de antibióticos (Microbiota A)

Perfil	Voluntário (sexo)	Idade (anos)	Resistência	Isolados (%)
I	---	---	Sensível a todos	64%
II	F	21	PPT	3,0%
III	M / F	26 / 46	GEN	6,0%
IV	F / F / F / M	05 / 27 / 48 / 51	TIM	12,0 %
V	F / F	09 / 52	PPT, TIM	6,0%
VI	F	38	PPT, TOB	3,0%
VII	F / F	21 / 52	GEN, TIM	6,0%

PPT (piperacilina/tazobactam), GEN (gentamicina), TIM (ticarcilina/ácido clavulânico), TOB (tobramicina), F (feminino) e M (masculino).

Em relação, à susceptibilidade geral da microbiota intestinal (microbiota A e B), a classe de antibióticos beta-lactâmicos foi a que os isolados demonstraram maior percentual de resistência).

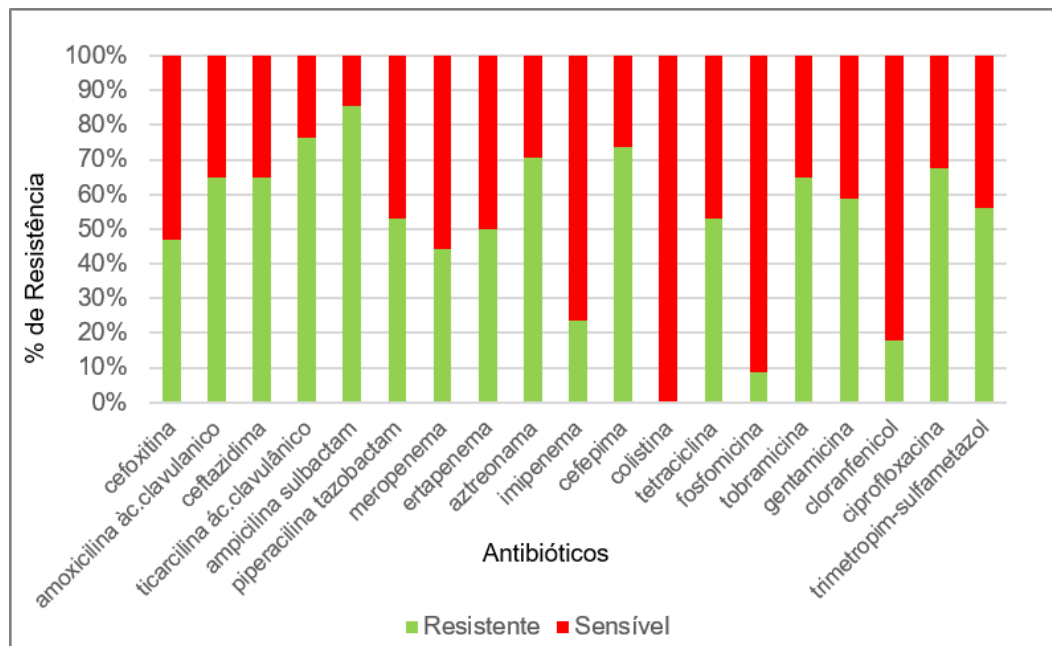
Gráfico 3. Percentual geral de resistência de *K. pneumoniae* da microbiota inestinal frente aos antibióticos testados



5.4.2. Isolados Clínicos

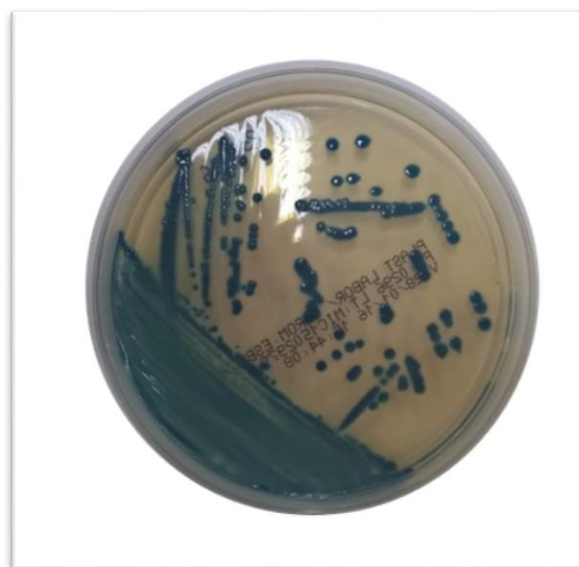
Os 34 isolados clínicos apresentaram altos percentuais de resistência aos antimicrobianos. Observou-se maior valor de resistência para ampicilina/sulbactam (85%), seguido por ticarcilina/ácido clavulânico (76%), cefepima (74%), aztreonama (71%), ciprofloxacina (68%), amoxicilina/ácido clavulânico, ceftazidima e tobramicina (65%), gentamicina (59%), trimetropim/sulfametazol (56%), piperacilina/tazobactam (53%), ertapenema (50%), cefoxitina (47%), meropenema (44%), imipenema (23%), cloranfenicol (17%) e fosfomicina (9%). Os isolados apresentaram-se 100% sensíveis à colistina (Gráfico 4).

Gráfico 4. Percentual de susceptibilidade dos isolados clínicos frente aos antibióticos testados



Dos 34 isolados, 25 (74%) apresentaram fenótipo de produtores de ESBL e apresentaram-se como ESBL positivos em meio ágar cromogênico (Figura 7).

Figura 7. *K. pneumoniae* produtora de ESBL

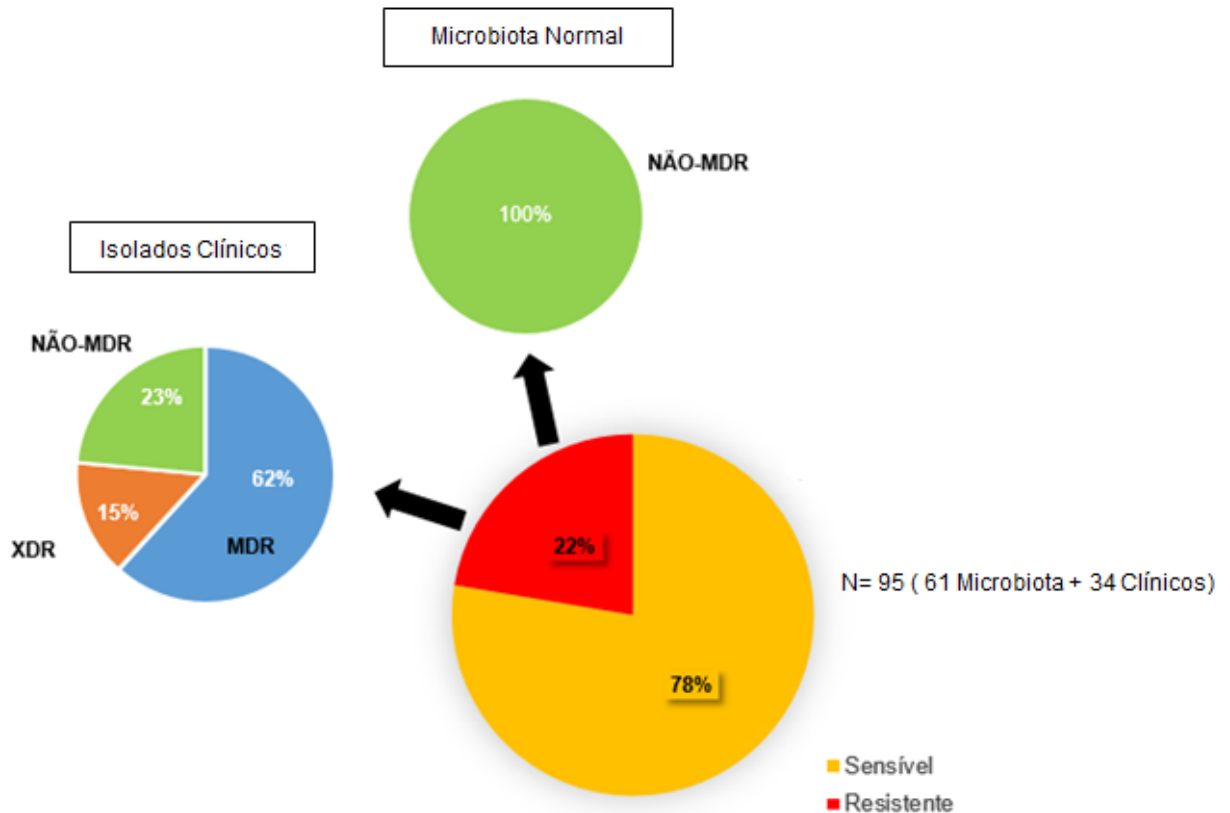


Crescimento em meio ChromoÁgar após período de incubação. As colônias azuis metálicas demonstram resultado positivo para *Klebsiella pneumoniae* produtora de ESBL. Fonte: O Autor

5.4.3. Análise Conjunta dos Perfis de Resistência dos Isolados Clínicos e da Microbiota Normal

Vinte e dois por cento dos isolados estudados (clínicos e microbiota normal) apresentaram resistência (90% clínicos e 10% microbiota normal) e 78% susceptibilidade (22% clínicos e 78% microbiota normal). Os isolados clínicos resistentes foram classificados em MDR (62%), XDR (15%) e não-MDR (23%) e os isolados resistentes da microbiota normal foram classificados em não-MDR (100%) (Figura 8).

Figura 8. Susceptibilidade e perfis de multirresistência dos isolados de *K. pneumoniae* estudados



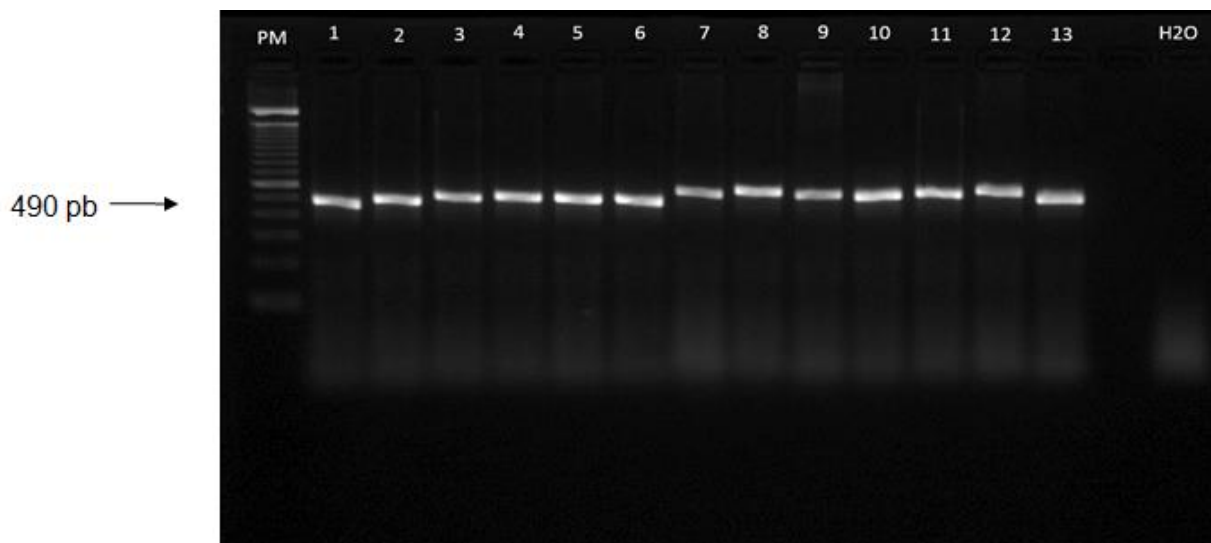
MDR (multidroga resistente); XDR (extensivamente droga resistente)

5.5. DIVERSIDADE GENÉTICA

5.5.1. Amplificação e Análise das sequências

Cem por cento dos isolados apresentaram fragmento de aproximadamente 490 bp (*gyrA*), compatíveis com cepa de referência *K. pneumoniae* ATCC 13883 (Figura 9). Todos os fragmentos foram purificados e sequenciados. Das 95 sequencias obtidas (61 = microbiota; 34 = clínicas), 91 apresentaram no mínimo 300 pb com qualidade >20 e percentual de identidade igual ou superior a 97%.

Figura 9. Gel representativo da amplificação do gene *gyrA* dos isolados de *K. pneumoniae* estudados



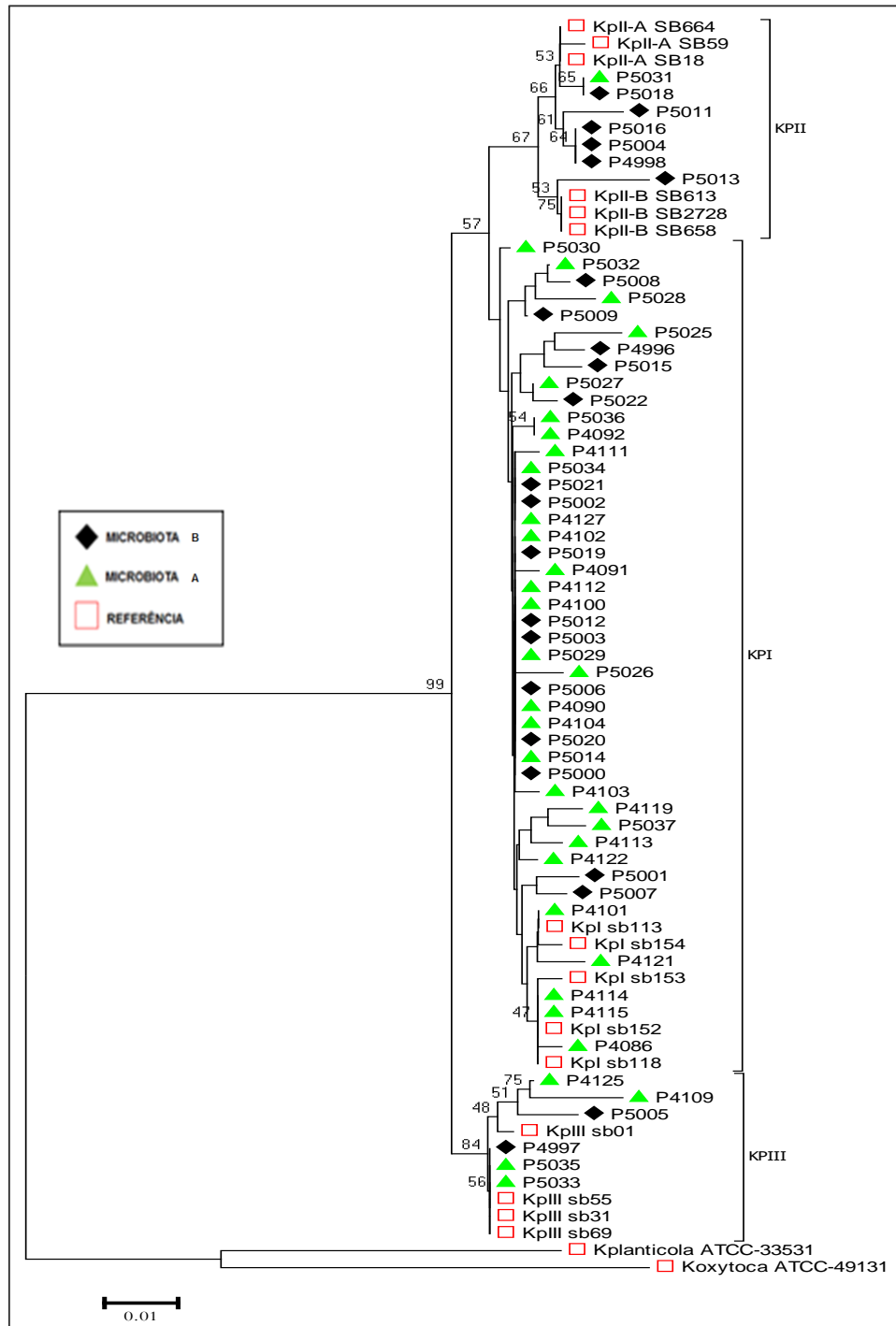
PM. 100bp (Invitrogen) **(1)**- *K. pneumoniae* ATCC 25922 ; **(2)**- P4040 1; **(3)**- P3955; **(4)**- P3927; **(5)**- P4114; **(6)**- P5024; **(7)** – P5037; **(8)**- P4100 7; **(9)**- P4086; **(10)**- P3956 ; **(11)**- P4438; **(12)**- P4439; **(13)**- P3804.

5.5.2. Análise Filogenética

5.5.2.1. *Isolados da Microbiota Normal*

Das 61 sequências do gene *gyrA* obtidas dos isolados da microbiota normal, 57 foram selecionadas para a construção da árvore filogenética. KPI representou 77% dos isolados (44) e KPII 12% (7). Destes, 6 isolados (86%) agruparam-se no subgrupo KPII-A e 1 isolado (14%) em KPII-B. O grupo KPIII compreendeu 11% (6) dos isolados (Figura 10).

Figura 10. Filogenia baseada no gene *gyrA* dos isolados de *K. pneumoniae* da microbiota normal



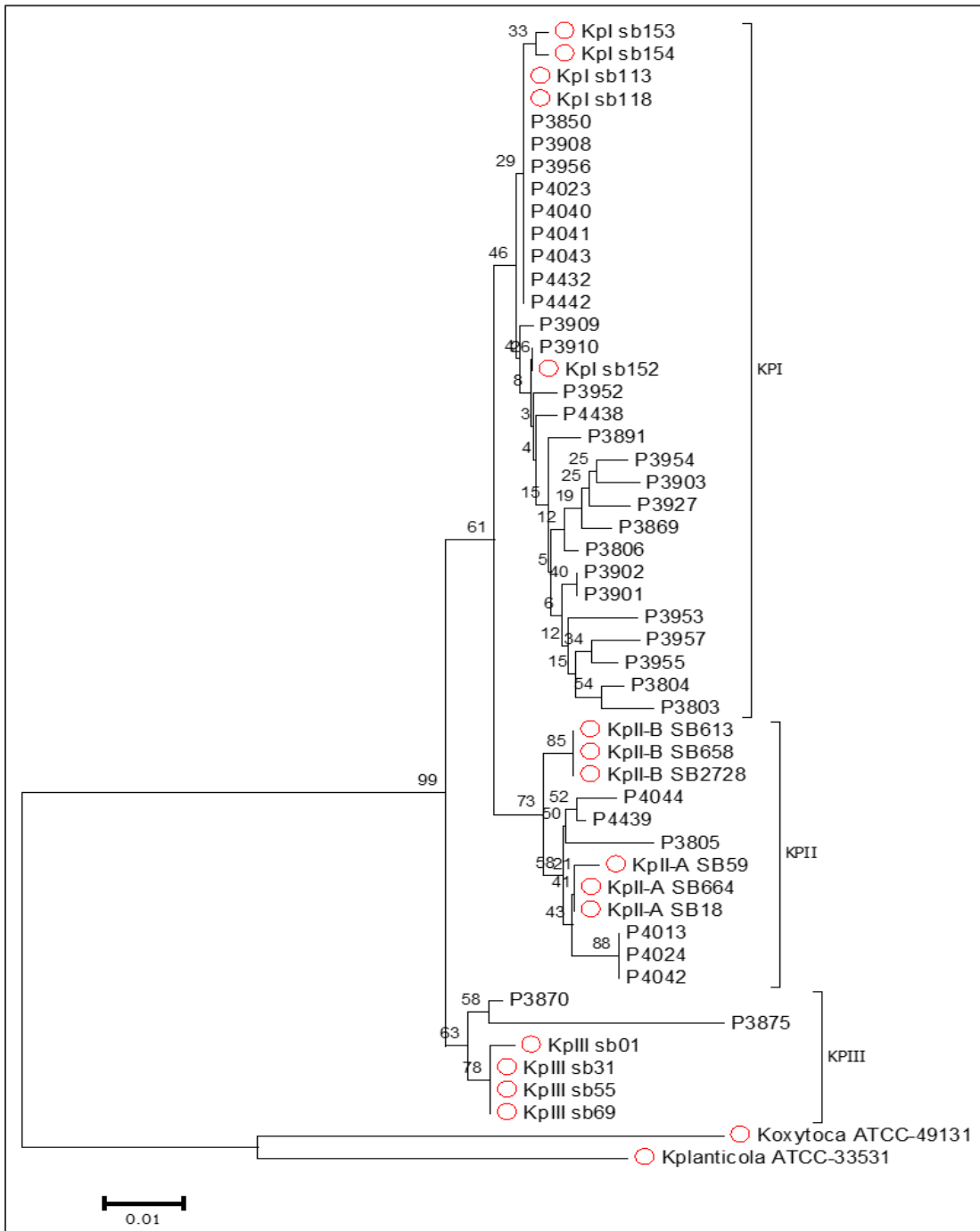
Árvore filogenética baseada na análise de 383 nucleotídeos do gene *gyrA*. Para a construção dessa árvore foram utilizadas as sequências obtidas de cinquenta e sete isolados de *K. pneumoniae* da microbiota intestinal de voluntários saudáveis e de dezessete sequências de referência. As formas geométricas representadas na árvore indicam as referências e as diferentes microbiotas analisadas, microbiota sob efeito de antibiótico (Microbiota B) e microbiota sem efeito do uso de antibióticos (Microbiota A). A árvore foi enraizada com base na sequência do gene *gyrA* de uma *K. oxytoca* e uma *K. plautica* de referência.

5.5.2.2. *Isolados Clínicos*

Setenta e seis por cento dos isolados clínicos agruparam em KPI (26), 18% em KPII (6), sendo todos do subgrupo KPII-A e 6,0% em KPIII (2) (Figura 11).

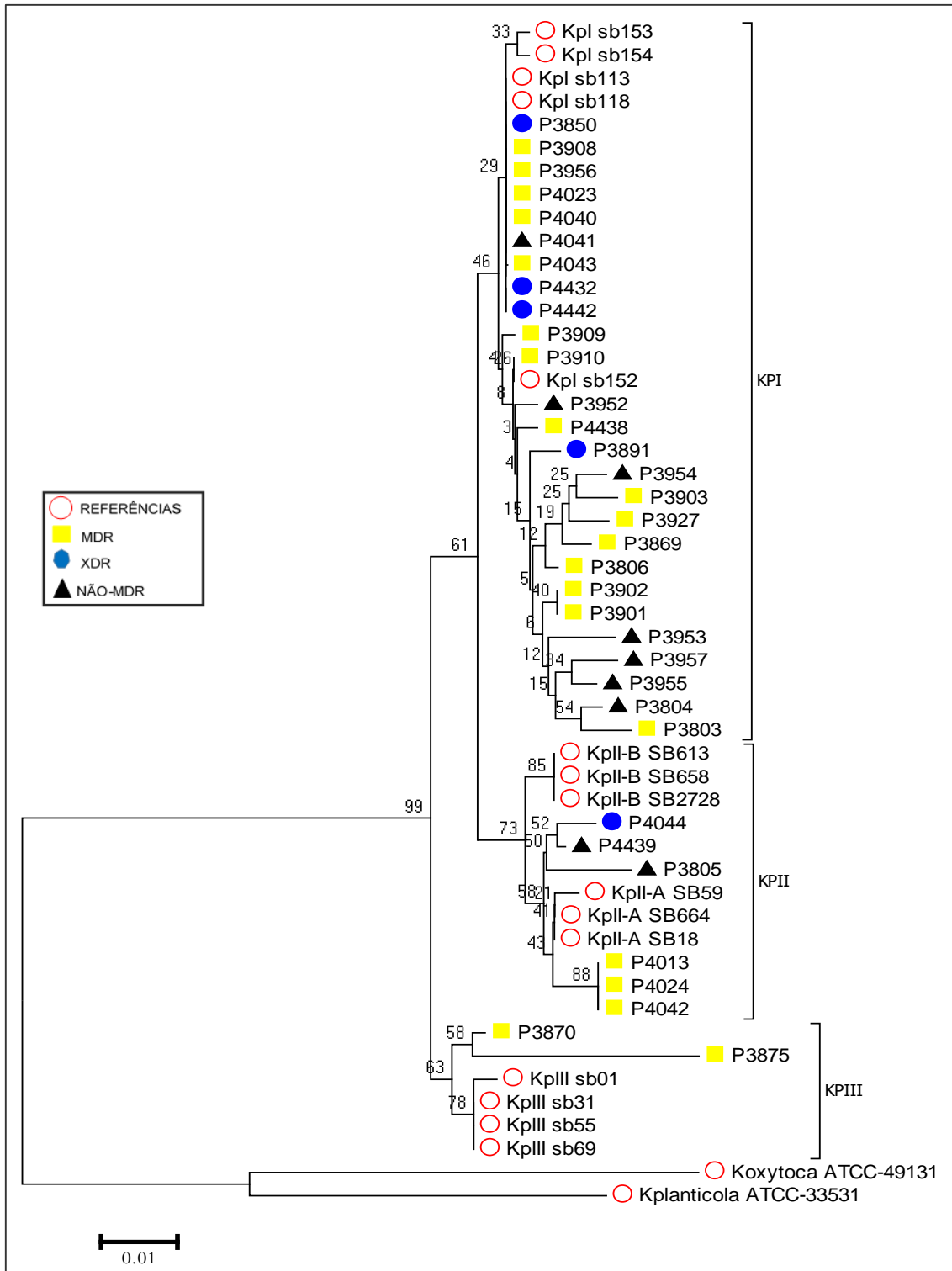
Em relação ao perfil de resistência entre os grupos filogenéticos, observou-se que: o grupo KPI apresentou 58% dos isolados com perfil MDR (15), 15% XDR (4) e 27% não-MDR (7). O grupo KPII apresentou 17% dos isolados com perfil XDR (1), 50% MDR (3) e 33% não-MDR (2). Já o grupo KPIII, apresentou somente isolados com perfil MDR (2) (Figura 12).

Figura 11. Filogenia baseada nas sequências do gene *gyrA* dos isolados clínicos de *K. pneumoniae*



Árvore filogenética baseada na análise de 383 nucleotídeos do gene *gyrA*. Para a construção dessa árvore foram utilizadas as sequências obtidas dos trinta e quatro isolados de *K. pneumoniae* oriundas do HMLJ e de dezessete sequências de referência. As sequências de referência estão sinalizadas na árvore com um círculo vermelho e foram obtidas no GenBank A árvore foi enraizada com base na sequência do gene *gyrA* de uma *K. oxytoca* e uma *K. planticola* de referência.

Figura 12. Correlação entre os perfis de resistência e os grupos filogenéticos de *K. pneumoniae*



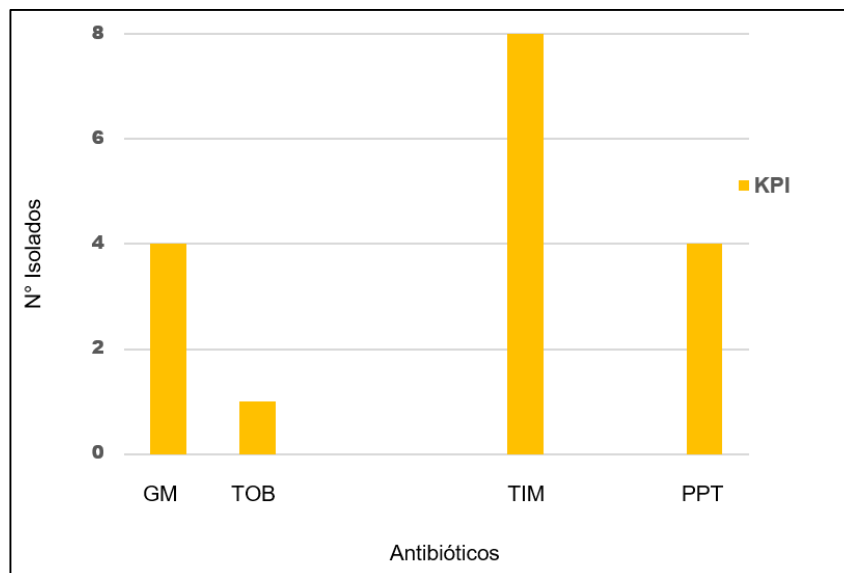
Árvore filogenética baseada na análise de 383 nucleotídeos do gene *gyrA*. As diferentes formas geométricas apresentadas indicam o perfil de multirresistência dos isolados e as sequências de referência.

5.6. GRUPOS FILOGENÉTICOS E A RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS

5.6.1. Isolados da Microbiota Normal

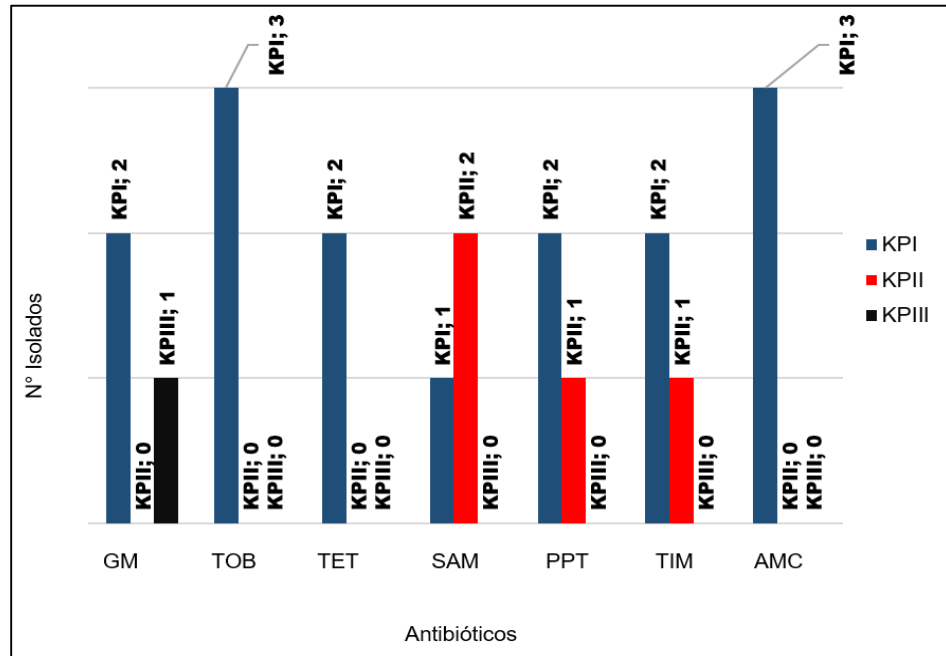
Os isolados da microbiota normal (microbiota A e B) apresentaram altas taxas de susceptibilidade aos antimicrobianos testados. Contudo, os diferentes grupos filogenéticos encontrados demonstraram diferenças em relação à susceptibilidade. Todos os isolados da microbiota A que apresentaram resistência pertencem ao grupo KPI, já os isolados resistentes da microbiota B apresentaram uma maior diversidade filogenética com isolados do grupo KPI (n=9), KPII (n=2) e KPIII (n=1) (Gráficos 5 e 6).

Gráfico 5. Índices de resistência das linhagens filogenéticas da microbiota A



GM (gentamicina), TOB (tobramicina), TIM (ticarcilina ac. Clavulânico), PPT (piperacilina tazobactam)

Gráfico 6. Índices de resistência das linhagens filogenéticas da microbiota B



TOB (tobramicina), GEN (gentamicina), PPT (piperacilina/tazobactam), SAM (ampicilina/sulbactam), AMC (amoxicilina/ácido clavulânico), TIM (ticarcilina/ácido clavulânico), TET (tetraciclina)

5.6.2. Isolado Clínicos

Os isolados clínicos, em geral, apresentaram altas taxas de resistência frente aos antibióticos testados. Entretanto, em relação aos grupos filogenéticos encontrados observou-se diferentes proporções de resistência (Tabela 3).

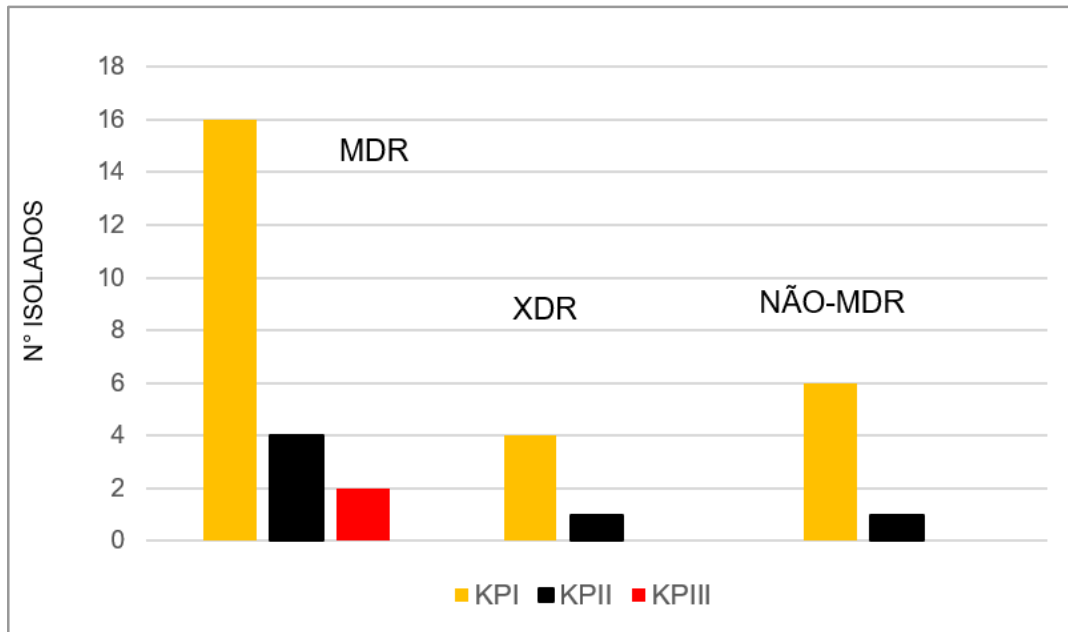
Tabela 3. Proporção de resistência das linhagens filogenéticas de origem clínica

Antibióticos	Linhagens Resistentes (N/%)		
	KPI	KPII	KPIII
Amoxicilina - ac.clavulânico	17 (65%)	3 (50%)	2 (100%)
Ampicilina - sulbactam	23 (88%)	5 (83%)	2 (100%)
Aztreonama	17 (65%)	5 (83%)	2 (100%)
Piperacilina - tazobactam	13 (50%)	3 (50%)	2 (100%)
Ticarcilina – ac.clavulânico	20 (77%)	4 (67%)	2 (100%)
Cefoxitina	11 (42%)	3 (50%)	2 (100%)
Ceftazidima	17 (65%)	3 (50%)	2 (100%)
Cefepima	17 (65%)	5 (83%)	2 (100%)
Cloranfenicol	3 (12%)	1 (17%)	1 (50%)
Ciprofloxacina	18 (69%)	4 (67%)	1 (50%)
Colistina	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Ertapenema	12 (46%)	4 (67%)	2 (100%)
Imipenema	7 (27%)	2 (33%)	1 (50%)
Meropenema	10 (39%)	3 (50%)	2 (100%)
Fosfomicina	3 (12%)	0 (0%)	0 (0%)
Gentamicina	16 (62%)	5 (83%)	0 (0%)
Tobramicina	15 (58%)	5 (83%)	1 (50%)
Trimetropim-sulfametazol	15 (58%)	3 (50%)	2 (100%)
Tetraciclina	14 (54%)	2 (33%)	2 (100%)

(N) = Número de isolados resistentes. Total de Isolados: KPI= 26; KPII= 6; KPIII= 2

Quanto aos perfis de multirresistência, o grupo KPI apresentou 16 isolados com perfil MDR, 4 isolados com perfil XDR e 6 isolados com perfil não-MDR. O grupo KPII apresentou 4 isolados com perfil MDR e os perfis XDR e não-MDR com um isolado cada. KPIII apresentou somente isolados com perfil MDR (Gráfico 7).

Gráfico 7. Relação entre os grupos filogenéticos de *K. pneumoniae* clínicos e os perfis de multirresistência



Perfis de multirresistência: MDR (multidroga resistente); XDR (extensivamente droga resistente)

O Grupo KPIII apresentou 100% (2/2) dos isolados produtores de ESBL, já o grupo KPII apresentou 83% (5/6) dos isolados produtores de ESBL. KPI apresentou 65% (17/26) dos isolados ESBL positivos.

6. DISCUSSÃO

Atualmente, *K. pneumoniae* é reconhecida como uma ameaça crescente à saúde humana devido ao surgimento de cepas multirresistentes associadas a surtos hospitalares e cepas hipervirulentas associadas com infecções graves adquiridas na comunidade (HOLT et al, 2015)

O renovado interesse em *K. pneumoniae* se dá devido à extensa disseminação de cepas resistentes aos antibióticos, especialmente aquelas produtoras de ESBL e KPC, que representam linhagens de maior importância, principalmente em infecções hospitalares (PATERSON et al, 2003; MONTEIRO et al, 2009; MOREIRA et al, 2011). Além do aspecto clínico, as enterobactérias predominam a microbiota intestinal humana, e são comumente associadas a infecções adquiridas na comunidade (KONEMAN et al, 2008).

No presente estudo, a identificação dos isolados de *K. pneumoniae* (da microbiota e clínicos) pela amplificação de sequências do espaço intergênico de 16S-23S rRNA (tRNA^{Ile} e tRNA^{Ala}) demonstrou especificidade e sensibilidade na identificação de 72% e 100% dos isolados da microbiota intestinal normal e de origem clínica, respectivamente. Embora o sequenciamento do gene *rrs* do 16S rRNA seja considerado um marcador estável e específico para a identificação bacteriana, esse gene apresenta algumas limitações na discriminação entre espécies próximas, como por exemplo, espécies do gênero *Klebsiella*. Para contornar essa limitação, o sequenciamento de regiões intergênicas 16S-23S rRNA foram utilizadas na discriminação de espécies e subespécies *Klebsiella* spp. por apresentarem variações suficientes para permitir a diferenciação (WANG et al, 2005; LIU et al, 2008).

A taxonomia bacteriana tem sofrido muitas alterações desde as primeiras tentativas de estabelecer sua classificação. Inicialmente, o gênero *Klebsiella* era composto por *K. pneumoniae*, com três subespécies (*pneumoniae*, *ozaenae* e *rhinoscleromatis*), *K. oxytoca*, *K. planticola*, *K. terrigena* e *K. mobilis* (JAIN et al, 1974; FERRAGUT et al, 1989). Recentemente, as subespécies *ozaenae* e *rhinoscleromatis* foram reclassificadas como espécies *K. ozaenae* e *K. rhinoscleromatis*, pela abordagem

pan-genômica (conjunto de genes presentes no genoma de um grupo de organismos). Trata-se de uma nova ferramenta na definição de espécies microbianas que introduz uma perspectiva quântica na taxonomia (CAPUTO et al, 2015).

Os genes codificadores de proteínas são muitas vezes mais adequados para a análises filogenéticas, devido a maiores taxas de mutações silenciosas. Por exemplo, a utilização do gene *gyrA* como ferramenta filogenética resultou do fato dele estar presente em todas as cepas bacterianas e da disponibilidade do considerável número de sequências de várias espécies bacterianas disponíveis para determinação de mutações que conferem resistência às quinolonas (HOOPER, 1995).

No presente estudo, foi verificada a distribuição de grupos filogenéticas entre isolados de *K. pneumoniae* e da microbiota intestinal normal, de origem clínica e de indivíduos da comunidade, bem como, suas relações com os perfis de resistência aos antibióticos. A análise filogenética demonstrou a presença de três grupos filogenéticos de *K. pneumoniae*, tanto nas linhagens clínicas quanto naquelas da microbiota intestinal normal. O grupo KPI reuniu o maior número de isolados da microbiota normal (44/57 - 77%) e de isolados clínicos (26/34 - 76%), como também tem sido relatado na Europa, mostrando que estes grupos são conservados em *K. pneumoniae* (BRISSE; VERHOEF, 2001). Esse grupo também reuniu a maior proporção de isolados multidroga resistentes (MDR) e extensivamente droga resistentes (XDR), já os grupos KPII A e B e KPIII apresentaram maior número entre os isolados da microbiota intestinal normal, em comparação aos de origem clínica. As taxas de resistência dos isolados clínicos do grupo KPI foi duas ou três vezes mais alta do que em isolados dos grupos KPII A e B e KPIII, para a maioria dos agentes antimicrobianos. Essa prevalência de resistência no grupo KPI também foi demonstrada no estudo de Melo e colaboradores (2011).

Estudos têm demonstrado a presença desses grupos em linhagens de origem hospitalar, da comunidade e da microbiota normal. Quatrocentos e vinte linhagens clínicas de *K. pneumoniae* foram alocadas nos grupos KPI (345/82,1%), KPII (29/6,9%) e KPIII (46/11%) (BRISSE, 2004). Além disso, o grupo filogenético KPI apresentou taxas mais elevadas de resistência, seguido pelos grupos KPII (intermediário) e KPIII (mais baixos). Um outro estudo no Brasil envolvendo linhagens clínicas, linhagens da comunidade e da microbiota normal demonstrou que o grupo filogenético KPI foi o grupo

com a maior proporção de isolados em relação aos outros grupos encontrados, e o que demonstrou maiores percentagens de resistência, sendo 69,3% multidroga resistentes (clínicos), seguido pelos grupos KPII clínicos (7,5%), comunidade (1%) e normal (4,3%) e KPIII clínicos (2%), comunidade (1%) e normal (4,2%) com menores percentagens de resistência. Também foi observada a produção de ESBL por 29,3% dos isolados do grupo KPI. Já os isolados da microbiota normal não apresentaram multirresistência ou produção de ESBL (MELO et al, 2001), como também demonstrado em nossos resultados.

Recentemente, os grupos KPI, KPII, e KPIII definidos com base no sequenciamento dos genes *gyrA* e *parC* (BRISSE; VERHOEF, 2001) vem sofrendo alterações significativas. Análises filogenéticas com sequencias concatenadas dos genes *fusA*, *gapA*, *gyrA*, e *rpoB* demonstraram que os grupos KPI e KPIII correspondem a *K. pneumoniae* e *K. variicola*, respectivamente, ao passo que KPII-A e KPII-B formaram grupos separados. De acordo com características fenotípicas e genotípicas foram descritas *K. quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae* (DSM 28211) e *K. quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* (DSM 28212) para linhagens KPII-A e KPII-B, respectivamente (ROSEN et al, 2004; FEVRE et al, 2005; BRISSE et al, 2014). Embora *K. quasipneumoniae* e *K. variicola* sejam capazes de provocar infecções em humanos, estas parecem ser menos patogênicas que *K. pneumoniae*, estando associada mais frequentemente à colonização. *K. quasipneumoniae* (KPII) foi encontrada quase exclusivamente em seres humanos, entretanto, foi mais associada à colonização (50%) do que à infecção hospitalar (25%), consistente com a baixa virulência e infecção oportunista (HOLT et al, 2015).

Um outro estudo envolvendo o sequenciamento de 328 cepas de *K. pneumoniae*, isoladas de humanos e animais de quatro continentes, revelou um total de 1.743 genes, codificados em 1,48 Mbp, conservados em todos genomas, e 175,120 SNPs. Análises filogenéticas de decomposição dividida (*Split network*) e máxima verossimilhança (ML) desses SNPs identificou quatro filogrupos, correspondendo aos grupos previamente definidos como KPI, KPII-A, KPII-B, e KPIII, com bootstrap 100% (HOLT et al, 2015).

Um dos dados mais relevantes do presente estudo foi a análise filogenética de linhagens da microbiota intestinal normal e clínicas utilizando sequências do gene *gyrA* com a mesma topologia demonstrada pela análise da sequência multilocus de cinco

genes e pelo sequenciamento de 328 genomas de *K. pneumoniae* por Brisse e colaboradores (2014) e Holt e colaboradores (2015), respectivamente. As linhagens da microbiota intestinal normal e as clínicas apresentaram os três grupos, grupos filogenéticos (KPI, KPII- A e B e KPIII), atualmente denominados *K. pneumoniae* (KPI), *K. quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae* (KPII-A), *K. quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* (KPII-B) e *K. variicola* (KPIII) (Figuras 10 e 11). Foi demonstrada também, a presença de linhagens *K. variicola* MDR produtoras de ESBL, associadas ao grupo filogenético KPIII, dado bastante raro, verificado, pela primeira vez, em 3 linhagens clínicas de *K. variicola*, isoladas no Hospital Universitário da Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais (ALVES et al, 2006). Esses resultados mostram claramente a disseminação de genes de resistência entre linhagens de *Klebsiella* spp no ambiente hospitalar.

A prevalência de altos níveis de resistência aos antibióticos beta-lactâmicos incluindo carbapenêmicos e cefalosporinas de 2^a 3^a e 4^a geração, verificados nos isolados clínicos deste estudo (Gráfico 1) sinalizam alta taxa de prescrição de antibióticos carbapenêmicos na unidade hospitalar analisada, levando à disseminação de genes de resistência, principalmente por mutações e por transferência horizontal de genes (LIVERMORE, 2010; HOLT et al, 2015). Antibióticos beta-lactâmicos são os mais comumente adotados no tratamento de infecções bacterianas e continuam a ser a causa principal do aumento da resistência a essa classe de antibióticos entre bactérias Gram negativas em todo o mundo. A exposição persistente de cepas bacterianas a antibióticos beta-lactâmicos vem induzindo a produção e mutação dinâmica e contínua de enzimas beta-lactamases (ESBL), ativas, até mesmo, sobre antibióticos beta-lactâmicos recentemente desenvolvidos (PATERSON; BONOMO, 2005; PITOUT; LAUPLAND, 2008).

Ao longo dos últimos 15 anos, enzimas beta-lactamases de espectro estendido-ESBL resistentes à maioria dos antibióticos beta-lactâmicos tem evoluído. Uma destas, a CTX-M-15, inicialmente encontrada em *E. coli* e atualmente em outros membros da família Enterobacteriaceae, é frequentemente associada com uma linhagem específica, uropatogênica, a ST131 que se espalhou pelo mundo (BUSH; FISHER, 2011; WOODFORD et al, 2011). A prevalência de *K. pneumoniae* produtora de ESBL no mundo

é observada, principalmente, na América Latina, onde dados de 33 centros da América Latina, durante o período 2004-2007, no âmbito do ensaio de avaliação e vigilância de tigeciclina demonstrou que 36,7% das *K. pneumoniae* foram produtoras de ESBL (ROSSI et al, 2008).

De fato, a descoberta de antibióticos pode ser considerada um momento decisivo na história da humanidade. Por outro lado, o uso indiscriminado dessas drogas tem sido acompanhado pelo rápido aparecimento de estirpes resistentes. Especialistas alertam para um retorno à era pré-antibiótica, um banco de dados revela a existência de mais de 20.000 potenciais genes de resistência (r) de cerca de 400 tipos diferentes, previstos a partir de sequências do genoma de bactérias disponíveis (LIU; POP, 2009). Por sorte, o número de determinantes de resistência funcionais em agentes patogênicos é muito menor (DAVIES; DAVIES, 2010).

Outro dado igualmente relevante, neste estudo, foi a alta susceptibilidade à fosfomicina, o que converge com dados da literatura, pois atualmente a prescrição de fosfomicina é inferior a outras classes de antibióticos, o que provoca uma menor pressão seletiva e conseqüentemente maior susceptibilidade. Este foi o caso de um estudo envolvendo 4264 pacientes, de onde foram isolados *E. coli* (76.7%), *Enterococcus faecalis* (4.0%), *Staphylococcus saprophyticus* (3.6%), *K. pneumoniae* (3.5%) e *Proteus mirabilis* (3.5%) de urina. As cepas de *E. coli* demonstraram as maiores taxas de susceptibilidade à fosfomicina (98.1%) (NABER et al, 2008). Ho e colaboradores (2010) também demonstraram boa atividade *in vitro* da fosfomicina sobre o *E. coli* e *K. pneumoniae* produtoras de ESBL. De fato, recentemente, há um interesse na utilização de fosfomicina no tratamento de infecções sistêmicas causadas por bactérias Gram-negativas multirresistentes, especialmente enterobactérias resistentes a outros antibióticos tradicionalmente utilizados (KARAGEORGOPOULOS et al, 2011). No entanto, é importante ressaltar que, no presente estudo, linhagens clínicas de *K. pneumoniae* (KPI) apresentaram resistência à fosfomicina (12%). Um outro antibiótico que mostrou alta atividade frente aos isolados analisados, neste estudo, foi a colistina, que devido ao seu efeito nefrotóxico é um dos últimos recursos adotados no combate das infecções (FALAGAS; KASIAKOU, 2006). Realmente, na década de 90, com o aparecimento de bactérias multirresistentes, inclusive aos antibióticos beta-lactâmicos,

aminoglicosídeos e quinolonas, ressurgiu o interesse pelas polimixinas no combate às bactérias multirresistentes (ZAVASCKI et al, 2007).

No presente estudo, altas taxas de susceptibilidade aos antimicrobianos pelos isolados da microbiota intestinal normal podem estar associadas ao resultado da atuação dessa microbiota como barreira contra a colonização de microrganismos potencialmente patogênicos (resistência à colonização). A utilização de agentes antimicrobianos que não alterem a resistência à colonização diminui a propagação de cepas resistentes entre pacientes e ou indivíduos saudáveis e, conseqüentemente, a disseminação de microrganismos resistentes (SULLIVAN; EDLUND; NORD, 2001). Efeitos da administração de antibióticos sobre as taxas de resistência da microbiota intestinal vem sendo estudados. Especificamente, um estudo avaliou as alterações da taxa de resistência em isolados fecais após uma única dose oral de 3 g de fosfomicina trometamol em oito voluntários saudáveis (REVEES et al, 1988). Bactérias coliformes resistentes à fosfomicina foram isoladas em três voluntários (37,5%), que desapareceram em 7-14 dias. Floor and colaboradores (1994) avaliaram o efeito da amoxicilina na microbiota intestinal de pacientes com bronquite. Foi verificado um aumento significativo de bastonetes Gram-negativos aeróbicos, a presença de cepas resistentes em 35% dos pacientes, além de uma flora anaeróbia inalterada.

Em outro estudo, num ensaio clínico, 62 mulheres adultas com cistite aguda receberam 3 g de fosfomicina como dose única, 250 mg de ciprofloxacina 2 vezes por dia por 3 dias ou 100 mg de nitrofurantoína duas vezes por dia durante 7 dias (GUPTA et al, 2005). Não foram verificados isolados de *E. coli* de origem fecal resistentes à fosfomicina e nitrofurantoína. Em contraste, bactérias resistentes à ciprofloxacina foram isoladas em 2/25 (8%) de pacientes no grupo submetido à ciprofloxacina.

Outro fator que pode ter influenciado a alta susceptibilidade dos isolados da microbiota intestinal normal, foi a redução do uso indiscriminado de antibióticos pelos indivíduos, devido a medida restritiva de comercialização de antibióticos implementadas pela ANVISA em 2010 RDC 44/2010 (BRASIL, 2010b), atualizada pela RDC 20/2011 (BRASIL, 2011).

No presente estudo, isolados resistentes das microbiotas A e B foram mais frequentes em indivíduos acima de 35 anos. Foi verificado que isolados, de ambas microbiotas apresentaram maior número de organismos resistentes na faixa etária 20-50 anos, quando comparados aos indivíduos mais jovens. Isso se deve, provavelmente, à maior exposição de indivíduos desta faixa etária a fatores que alteram o equilíbrio da microbiota intestinal normal. Embora a composição da microbiota intestinal seja relativamente estável em indivíduos saudáveis, esta pode ser alterada em razão de fatores como idade, estado fisiológico, uso de drogas, doenças, dieta, estresse (MITSUOKA, 1992).

A presença de linhagens clínicas de produtoras de ESBL, principalmente, *K. variicola* e de perfis de resistência MDR, XDR nas linhagens clínicas de *K. pneumoniae* e *K. quasipneumoniae*, neste estudo, sinalizam a presença de disseminação de genes de resistência no ambiente hospitalar. Os resultados obtidos neste estudo demonstram que a determinação das relações filogenéticas entre espécies e subespécies do gênero *Klebsiella* forneceu uma avaliação mais detalhada da distribuição das propriedades fenotípicas, que podem ser associadas a características clínicas e epidemiológicas distintas desse patógeno, oportunista, em ambientes hospitalares e na microbiota normal.

7. CONCLUSÕES

- As abordagens fenotípicas e moleculares utilizadas nesse estudo apresentaram resultados compatíveis com *K. pneumoniae*;
- Os voluntários sadios que não fizeram uso de antibióticos no período mínimo de 1 mês anterior à coleta e os que se submeteram à antibioticoterapia nesse mesmo período demonstraram a presença de *K. pneumoniae* no material fecal;
- As cepas de *K. pneumoniae* isoladas da microbiota normal do trato intestinal apresentaram altas taxas de susceptibilidade aos antibióticos; isolados de voluntários que fizeram uso de antibiótico (microbiota B) apresentaram um perfil de resistência mais diverso que aquelas isoladas de indivíduos que não fizeram uso (microbiota A);
- A prevalência de *K. pneumoniae* MDR e XDR em isolados clínicos sugere altas taxas de transferência horizontal de genes no ambiente hospitalar;
- As altas taxas de resistência aos antibióticos beta-lactâmicos, em isolados clínicos e em isolados da microbiota normal, sugerem que a exposição persistente de cepas bacterianas a estes antibióticos vem induzindo a produção e mutação contínua de enzimas beta-lactamases e ESBL;
- Os isolados clínicos e da microbiota apresentaram um alto percentual de linhagens do grupo filogenético KPI. Entretanto, a proporção de isolados KPIII foi maior em isolados da microbiota normal, confirmando sua ocorrência na colonização;
 - Altas taxas de resistência aos antibióticos nas linhagens do grupo filogenético KPI confirmam seu alto potencial patogênico em relação aos outros grupos;
 - Os resultados obtidos nesse estudo, demonstram que os grupos filogenéticos KPI, KPII-A e B e KPIII, possuem uma estrutura heterogênea com características epidemiológicas distintas tanto em ambientes hospitalares quanto na microbiota normal.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. RDC nº 44, de 28 de outubro de 2010. **Ministério da Saúde**, Brasília, DF. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA - Nota Técnica 01/2010. Medidas para identificação, prevenção e controle de infecções relacionadas à assistência à saúde por microrganismos multirresistentes. **Ministério da Saúde** Brasília, DF, 25 de outubro de 2010.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA - Nota técnica 01/2013. Medidas de prevenção e controle de infecções por enterobactérias multirresistentes. **Ministério da Saúde**, Brasília, DF, 17 de abril de 2013.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA - Manual de investigação e controle de bactérias multirresistentes. **Ministério da Saúde**, Brasília, 2007. 21 p.

ALANIS, J. A. Resistance to Antibiotics: Are we in the Post-Antibiotic era? **Archives of Medical Research**, v. 36, p. 697 - 705, 2005.

AMBLER, R. P. The structure of beta-lactamases. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 289, p. 321-331, 1980.

ARPIN, C. et al. Extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in community and private health care centers. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 47, p. 3506-3514, 2003.

BAQUERO, F.; NOMBELA, C. The microbiome as a human organ. **Clin Microbiol Infect**, v. 18, p. 2-4, 2012.

BEIRÃO, E. M. et al. Does the change on gastrointestinal tract microbiome affects host? **Braz J Infect Dis**, v. 18, p. 660-663, 2014.

BERGEY'S manual of systematic bacteriology. 2 ed. New York: Springer, 2011.

BERTO, J. **Tratamento de Efluentes Hospitalares pela Relação de Fenton e Foto-Fenton: Comparação da Eficiência**. Dissertação ao título de Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental, Universidade do Vale do Itajaí. Centro de Ciências Tecnológicas da Terra e do Mar. Itajaí, Paraná, 2006.

BRANDT, K. G. et al. Importância da microflora intestinal. 1a ed. São Paulo (SP): **Revisões e Ensaio**s, p.117-127, 2006.

BRASIL. Lei nº 8.080 de 19 de setembro de 1990. Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 20 set.1990. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Leis/L8080.htm. Acesso em: 12 set. 2014.

BRASIL. Boletim Informativa da Rede Nacional de Monitoramento da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde- **REDE-RM**.Ano III- Edição nº1 de 10 de julho de 2009.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA - Resolução nº 44 de 28 de outubro de 2010. Dispõe sobre o controle de medicamentos à base de substâncias classificadas como antimicrobianos, de uso sob prescrição médica, isoladas ou em associação e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 28 de outubro de 2010.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA - Resolução nº 20 de 5 de maio de 2011. Dispõe sobre o controle de medicamentos à base de substâncias classificadas como antimicrobianos, de uso sob prescrição, isoladas ou em associação. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 17 de junho de 2011.

BRISSE, S.; VERHOEF, J. Phylogenetic diversity of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* clinical isolates revealed by randomly amplified polymorphic DNA, *gyrA* and *parC* genes sequencing and automated ribotyping. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 51, p. 915-924, 2001.

BRISSE, S. et al. Development of a rapid identification method for *Klebsiella pneumoniae* phylogenetic groups and analysis of 420 clinical isolates. **Clin Microbiol Infect**, v. 10, p. 942–945, 2004.

BRISSE S. et al. Virulent clones of *Klebsiella pneumoniae*: Identification and

evolutionary scenario based on genomic and phenotypic characterization. **PLoS ONE**, v. 4p. e4982, 2009.

BRISSE, S.; PASSET, V.; GRIMONT, P. A. Description of *Klebsiella quasipneumoniae* sp. nov., isolated from human infections, with two subspecies, *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae* subsp. nov. and *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *Similipneumoniae* subsp. nov., and demonstration that *Klebsiella singaporensis* is a junior heterotypic synonym of *Klebsiella variicola*. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 64p. 3146–3152, 2014.

BONELLI, R. R.; MOREIRA, B. M.; PICÃO, R. C. Antimicrobial resistance among *Enterobacteriaceae* in South America: history, current dissemination status and associated socioeconomic factors. **Drug Resist Updat**, v. 17p. 24-36, 2014.

BUENO, E. **À sua Saúde – A Vigilância Sanitária na História do Brasil**. Ed. Anvisa. 1ª Edição, 2005. Cadastro Nacional de Estabelecimentos de Saúde-CNES/MS, 2005.

BUSH, K; JACOBY, G. A. Amino acid sequences for TEM, SHV and OXA extended-spectrum and inhibitor resistant Beta-lactamases. **Lahey Clinic** Disponível em: <http://www.lahey.org/studies>. Acesso: 21 jul. 2015.

BUSH, K.; JACOBY, G. A. Updated functional classification of beta-lactamases. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 54, p. 969-976, 2010.

BUSH, K.; JACOBY, G. A.; MEDEIROS, A. A. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 39, p. 1211-1233, 1995.

BUSH, K.; FISHER, J. F. Epidemiological expansion, structural studies, and clinical challenges of new β -lactamases from gram-negative bacteria. **Annu Rev Microbiol**, v. 65, p. 455–478, 2011.

CANTÓN, R; COQUE, T. M. The CTX-M beta-lactamase pandemic. **Current opinion in microbiology**, v. 9, p. 466-475, 2006.

CDC, Antibiotic Resistance Threats in the United States. Us **Department of Health and Human Services**, 2013.

CAPUTO, A. et al. Pan-genomic analysis to redefine species and subspecies based on quantum discontinuous variation: the *Klebsiella* paradigm. **Biology Direct**, v. 30, p. 55, 2015.

CASAS, M. R. et al. Presence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants and mutations in gyrase and topoisomerase in *Salmonella enterica* isolates with resistance and reduced susceptibility to ciprofloxacin. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 85, p. 85-89, 2016.

CHUANG, Y. et al. "Genetic determinants of capsular serotype K1 of *Klebsiella pneumoniae* causing primary pyogenic liver abscess." **The Journal of infectious diseases**, v. 193, p. 645-654, 2006.

CLEMENTINO, M. M. et al. Archaeal diversity in naturally occurring and impacted environments from atropical region. **J Appl Microbiol**, v. 103, p. 141-151, 2007.

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute - **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing** – Twenty-second Informational Supplement.M100-S22, vol. 32, nº 3, 2015.

DAVIES J.; DAVIES, D. Origins and evolution of antibiotic resistance. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 74(, p. 417-433, 2010.

DETHLEFSEN, L. et al. The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing. **PLoS Biol**, v. 6, p.e280, 2008.

DHILLON, R. H. P.; CLARK, J. ESBLs: A Clear and Present Danger? **Critical Care Research and Practice**, v. 2012, p. 1-11, 2012.

DONSKEY, C. J. Antibiotic regimens and intestinal colonization with antibiotic-resistant Gram-negative bacilli. **Clin Infect Dis**, v. 1, p. S62-69, 2006.

DROPA, M. et al. Extended-spectrum beta-lactamases among Enterobacteriaceae isolated a public hospital in Brazil. **Rev Inst Med trop**, v. 51, p. 203-209, 2009.

EDUARDO, M.; MIRANDA, I. **Vigilância Sanitária**. Saúde & Cidadania. Instituto para o Desenvolvimento da Saúde - IDS. Núcleo de Assistência Médico-Hospitalar -

NAMH/FSP e Banco Itaú. São Paulo, 1998.

EDWARDS, C.A.; PARRET A.M. Intestinal flora during the first months of life: new perspectives. **Br J Nutr**, v. 88, p. S11-S18, 2002.

EJAZ, I.U.H. et al. Detection of extended-spectrum β -lactamases in *Klebsiella pneumoniae*: Comparison of phenotypic characterization methods. **Pak J Med Sci**, v.29, n°3, 2013.

FALAGAS, M. E.; KASIAKOU, S. K. Toxicity of polymyxins: a systematic review of the evidence from old and recent studies. **Crit Care**, v. 10, R27, 2006.

FERRAGUT, C.; KERSTERS, K.; DE LEY, J. Protein electrophoretic and DNA homology analysis of *Klebsiella* strains. **Syst Appl Microbiol**, v. 11, p. 121-127, 1989

FEVRE, C. et al. Variants of the *Klebsiella pneumoniae* OKP chromosomal beta-lactamase are divided into two main groups, OKP-A and OKP-B. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 49, p. 5149–5152, 2005.

FLOOR, M. et al. Effect of loracarbef and amoxicillin on the oropharyngeal and intestinal microflora of patients with bronchitis. **Scand J Infect Dis**, v. 26, p. 191–197, 1994.

FOUTS, D. E. et al. “Complete genome sequence of the N₂-fixing broad host range endophyte *Klebsiella pneumoniae* 342 and virulence predictions verified in mice.” **PLoS genetics**, v. 4, p. e1000141, 2008.

GALES, A.C. et al. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008-2010). **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 73, p. 354-360, 2012.

GARCÍA SAN MIGUEL, L. et al. Clinical variables associated with the isolation of *Klebsiella pneumoniae* expressing different extended-spectrum beta-lactamases. **Clin Microbiol Infect**, v. 13, p. 532-538, 2007.

GARCÍA-FERNÁNDEZ, et al. “An ertapenem-resistant extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* clone carries a novel OmpK36 porin variant.” **Antimicrobial agents and chemotherapy** 54(10):4178-4184, 2010.

GISKE, C. G. et al. Clinical and economic impact of common multidrug-resistant Gram-negative bacilli. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, p. 813-821, 2008.

GISKE, C.G. et al. A sensitive and specific phenotypic assay for detection of metallo- β -lactamases and KPC in *Klebsiella pneumoniae* with the use of meropenem disks supplemented with aminophenylboronic acid, dipicolinic acid and cloxacillin. **Clin Microbiol Infect.**, v. 17, p. 552-556, 2011.

GOETZ, A. M. et al. An outbreak of infusion-related *Klebsiella pneumoniae* bacteremia in a liver transplantation unit. **Clin. Infect. Dis**, v. 21, p. 1501–1503, 1995.

GROVER, S. S. et al. Phenotypic and genotypic detection of ESBL mediated cephalosporin resistance in *Klebsiella pneumoniae*: emergence of high resistance against cefepime, the fourth generation cephalosporin. **J Infect**, v. 53, p. 279-288, 2006.

GUARNER, F.; MALAGELADA, J.R. Gut flora in health and disease. **Lancet**, v. 361, p. 512-519, 2003.

GUPTA, K.; HOOTON, T.M.; STAMM, W.E. Isolation of fluoroquinolone-resistant rectal *Escherichia coli* after treatment of acute uncomplicated cystitis. **J Antimicrob Chemother**, v. 56, p. 243–246, 2005.

HAEGGMAN, S. S. et al. “Diversity and Evolution of the Class a Chromosomal Beta-Lactamase Gene in *Klebsiella pneumoniae*.” **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 48, p. 2400-2408, 2004.

HALEY, R. W. et al. Estimating the extra charges and prolongation of hospitalization due to nosocomial infections: a comparison of methods. **J Infect Dis**, v. 141, p. 248-257, 1990.

HART, C. A. *Klebsiella* and neonates. **J Hosp Infect**, v. 23, p. 83–86, 1993.

HAWKEY, P. M.; JONES, A. M. “The changing epidemiology of resistance.” **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 64, p. 3-10, 2009.

HASDEMIR, et al. "Detection and Prevalence of Active Drug Efflux Mechanism in Various Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Strains from Turkey." **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 2701-2706, 2004.

HAWKEY, P M. "The origins and molecular basis of antibiotic resistance." **British Medical Journal**, v. 317, p. 657-660, 1998.

HILTY, M. et al. Transmission dynamics of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in the tertiary care hospital and the household setting. **Clin Infect Dis**, v. 55, p. 967-975, 2012.

HO, P.L. et al. Antimicrobial resistance among uropathogens that cause acute uncomplicated cystitis in women in Hong Kong: a prospective multicenter study in 2006 at 2008. **Diagn Microbiol Infect**, v. 66, p. 87-93, 2010.

HOOPER, D. C. Quinolone mode of action. **Drugs**, v. 49, p. 10-15, 1995.

HOLT, K.E. et al. Genomic analysis of diversity, population structure, virulence, and antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae*, an urgent threat to public health. *Proc Natl Acad Sci*, v. 7, p. E3574-3581, 2015.

HUTTENHOWER, C.; MORGAN, X.C.; SEGATA N. Biodiversity and functional genomics in the human microbiome. **Trends Genet**, v. 29, p. 51-58, 2012.

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE. **POP 65.3230.001**: Produção e preservação pelo método de liofilização de bactérias da Coleção de Culturas. Rev. 4. Rio de Janeiro, 2015. 12 p. (Manual da Qualidade. Seção 4.3).

INGHAM, E. *Enterobacteriaceae*; 2000. Disponível em <http://medic.med.uth.tmc.edu>. Acesso em setembro de 2014.

JACOBY, G.; MUNOZ-PRICE, L. S. The new beta-lactamases. **New England Journal of Medicine**, v. 352, p. 380-391, 2005.

JAIN, K.; RADSAK, K.; MANNHEIM, W. Differentiation of the Oxytocum group from *Klebsiella* by deoxyribonucleic acid-deoxyribonucleic acid hybridization. **Int J Syst Bacteriol**, v. 24, p. 402-407, 1974.

JERNBERG, C. et al. Long-term impacts of antibiotic exposure on the human intestinal microbiota. **Microbiology**, v. 156, p. 3216-3223, 2010.

JUMAA, P.; CHATTOPADHYAY, B. Pseudobacteraemia with multiplyresistant *Klebsiella pneumoniae* resulting from contamination from the blood gas machine on a neonatal unit. **J Hosp Infect**, v. 22, p. 251–255, 1992.

KARAGEORGOPOULOS, D. E. et al. Fosfomycin: evaluation of the published evidence on the emerg of antimicrobial resistance in Gram-negative pathogens. **J Antimicrob Chemother**, v. 67, p. 255-268, 2011.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **J Mol Evol**, v. 16, p. 111-120, 1980.

KIRJAVAINEN, P. V.; GIBSON, G. R. Healthy gut microflora and allergy: factors influencing development of the microbiota. **Ann Med**, v. 31, p. 288-292, 1999.

KOLLEF, M .H. et al. Inadequate antimicrobial treatment of infections: a risk factor for hospital mortality among critically ill patients. **Chest**, v. 115p. 462–474, 1999.

KONEMAN, E. W. et al. Diagnóstico Microbiológico: Texto e Atlas Colorido. 5.ed. Rio de Janeiro: **MEDSI**, p.1465, 2001.

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

KOTAPATI, S. et al. Clinical implications of extended spectrum β -lactamase (ESBL) producing *Klebsiella* species and *Escherichia coli* on cefepime effectiveness. **J Infect**, v. 51, p. 211-217, 2005.

KUMAR, A. et al. "A multiple antibiotic and serum resistant oligotrophic strain, *Klebsiella pneumoniae* MB45 having novel dfrA30, is sensitive to ZnO QDs." **Annals of clinical microbiology and antimicrobials** 10(1):19, 2011.

LAUTENBACH, E. Editorial commentary: flying under the radar: the stealth pandemic of *Escherichia coli* sequence type 131. **Clin Infect Dis**, v. 57, p. 1266-1269, 2013.

LAWLEY, T. D.; WALKER, A. W. Intestinal colonization resistance. **Immunology**, v. 138, p. 1-11, 2013.

LESER, T. D.; MOLBAK, L. Better living through microbial action: the benefits of the mammalian gastrointestinal microbiota on the host. **Environ Microbiol**, v. 11, p. 2194–2206, 2009.

LEVY, S. B.; MARSHALL, B. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. **Nat Med**, v. 10, p. S122-S129, 2004.

LI, H-T.; ZHOU, Y. B.; LIU, J. M. The impact of cesarean section on offspring overweight and obesity: a systematic review and meta-analysis. **International Journal of Obesity**, v. 37, p. 893-899, 2013.

LIU, Y. et al. PCR detection of *Klebsiella pneumoniae* in infant formula based on 16S-23S internal transcribed spacer. **Int J Food Microbiol**, v. 125, p. 230-235, 2008.

LIVERMORE, D. M. Of *Pseudomonas*, porins, pumps and carbapenems. **J Antimicrob Chemother**, v. 47, p. 247-250, 2001.

LIVERMORE, D. M. WOODFORD, N. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. **Lancet Infect Dis**, v. 10, p. 597–602, 2010.

LIU, B.; POP, M. ARDB — Antibiotic Resistance Genes Database. **Nucleic Acids Res**, v. 37, p. D443–D447, 2009.

MADIGAM, M. T. et al. **Microbiologia de Brock**. 12^a ed. São Paulo: Artmed, 2010.

MADSON, B. et al. Type 1 fimbrial shafts of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* influence sugar-binding specificities of their fimbriae H adhesions. **Infect Immun**, v. 62, p. 843-848, 1994.

MAGIORAKOS, A. P. et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clin Microbiol Infect**, v. 18, p. 268-281, 2012.

MARCH, A. et al. Colonization of residents and staff of a long-term care facility and adjacent acute-care hospital geriatric unit by multiresistant bacteria. **Clin Microbiol Infect**. v. 16, p. 934-944, 2010.

MARCHISIO, M. et al. Susceptibility to β -lactams and quinolones of Enterobacteriaceae isolated from urinary tract infections in outpatients. **Braz J Microbiol**, v. 46, p. 1155-1159, 2015.

MARRA, A. R. et al. Nosocomial bloodstream infections in Brazilian hospitals: analysis of 2,563 cases from a prospective nationwide surveillance study. **J Clinical Microbiology**, v. 49, p. 1866-1871, 2011.

MARTÍNEZ, J. et al. "How gene sequence are analyses modifying bacterial taxonomy? The case of *Klebsiella*." **International microbiology**, v. 7, p. 261-268, 2004.

MARTÍNEZ, R. J. M. et al. "Activity of ciprofloxacin and levofloxacin in experimental pneumonia caused by *Klebsiella pneumoniae* deficient in porins, expressing active efflux and producing QnrA1". **Clinical microbiology and infection**, v. 14, p. 691-697, 2008.

MAZEL, D. "Integrations: agents of bacterial evolution." **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, p. 608-620, 2006.

MEIRELLES-PEREIRA, F. et al. Ecological aspects of the antimicrobial resistance in bacteria of importance to human infections. **Braz J Microbiol**, v. 33, p. 287-293, 2002.

MELO M.E., et al. Phylogenetic groups among *Klebsiella pneumoniae* isolates from Brazil: relationship with antimicrobial resistance and origin. **Curr Microbiol**, v. 62, p. 1596-1601, 2011.

MESA, R. J. et al. Extended-spectrum-lactamase-producing Enterobacteriaceae in different environments (humans, food, animal farms and sewage). **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 58, p. 211–215, 2006.

MITSUOKA, T. Intestinal flora and aging. **Nutr Rev**, v. 50, p. 438-446, 1992.

MIZUTA, K. et al. Virulence for mice of *Klebsiella* strains belonging to the O1 group: relationship to their capsular (K) types. **Infect Immun**, v. 40, p. 56-61, 1983.

MORAIS, M. B.; JACOB, C. M. A. O papel dos probióticos e prebióticos na prática pediátrica. **Jornal de Pediatria**, v. 82, p. 189-197, 2006.

MOREIRA, V. ***Klebsiella pneumoniae* e sua resistência a antibióticos**. 2011 (Especialização em Vigilância Sanitária) - Pontifícia Universidade Católica de Goiás, 2011.

NABER, K. G. et al. Surveillance study in Europe and Brazil on clinical aspects and Antimicrobial Resistance Epidemiology in Females with Cystitis (ARESC): implications for empiric therapy. **Eur Urol**, v. 54, p. 1164–1175, 2008.

NAVARRO, N. M. et al. *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* comunitárias y hospitalarias productoras de β -lactamasas en hospitales de Hermosillo, Sonora. **Salud pública de México**, v. 53, n. 4, 2011.

NEIDELL, M. J. et al. Costs of healthcare- and community-associated infections with antimicrobial-resistant versus antimicrobial-susceptible organisms. **Clin Infect Dis**, v. 55, p. 807-815, 2012.

NORDMANN, P.; NAAS, T.; POIREL, L. Global spread of Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. **Emerg Infect Dis**, v. 17, p. 1791–1798, 2011.

PADILLA, E. et al. “*Klebsiella pneumoniae* AcrAB efflux pump contributes to antimicrobial resistance and virulence.” **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, p. 177-183, 2010.

- PATERSON, D. L. et al. Extended-spectrum beta-lactamases in *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates from seven countries: dominance and widespread prevalence of SHV- and CTX-M-type beta-lactamases. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 47, p. 3554-3560, 2003.
- PATERSON, D. L.; BONOMO, R. A. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 18, p. 657-686, 2005.
- PELEG, A.; HOOPER, D. C. Hospital-acquired infections due to Gram-negative bacteria. **The New England Journal of Medicine**, v. 362, p. 1804-1813, 2010.
- PENDERS, J. et al. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. **Pediatrics**, v. 118, p. 511-521, 2006.
- PITOUT, J. D.; LAUPLAND, K. B. Extended-spectrum b-lactamase producing Enterobacteriaceae: an emerging public health concern. **Infect Dis**, v. 8, p. 159–166, 2008.
- PODSCHUM, R.; ULLMANN, U. *Klebsiella spp.* as Nosocomial Pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods, and Pathogenicity Factors. **Clin Microbiol Rev**, v. 11, p. 589-603, 1998.
- POLLACK, M. et al. Factors influencing colonisation and antibioticresistance patterns of gram-negative bacteria in hospital patients. **Lancetii**, v. 300, p. 668–671, 1972.
- PRADO, T. et al. Detection of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in effluents and sludge of a hospital sewage treatment plant. **Lett Appl Microbiol** v. 46, p. 136-141, 2007.
- RIBEIRO, A. S. et al. *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemases (Kpc) e sua importância no ambiente hospitalar. **Revista de Ciências**, v. 6, nº 2, p. 91-107, 2015.
- ROLAIN, J. M. Food and human gut as reservoirs of transferable antibiotic resistance encoding genes. **Front Microbiol**, v. 24, p. 1-10, 2013.
- ROOLINS, D. M. ; JOSEPH, S. W. Enterobacteriaceae, 2000. Disponível em <http://:medic.med.utm.tmc.edu>. Acesso em janeiro de 2014.

ROSENBLUETH, M. et al. *Klebsiella variicola*, a novel species with clinical and plant-associated isolates. **Syst Appl Microbiol**, v. 27, p. 27-35, 2004.

ROSE, H. D.; SCHREIER, J. The effect of hospitalization and antibiotic therapy on the gram-negative fecal flora. **Am J Med Sci**, v. 255, p. 228–236, 1968.

ROSSI, F. et al. Rates of antimicrobial resistance in Latin America (2004–2007) and in vitro activity of the glycyclcline tigecycline and of other antibiotics. **Braz J Infect Dis**, v. 12, p. 405–415, 2008.

RUPPÉ E; ANDREMONT A. Causes, consequences, and perspectives in the variations of intestinal density of colonization of multidrug-resistant enterobacteria. **Front Microbiol**, v. 28, p. 129, 2013.

RUSTAM, I. A. The role of antibiotics and antibiotic resistance in nature. **Environmental Microbiology**, v. 11, p. 2970–2988, 2009.

SADER, H. S.; GALES, A. C.; JONES, R. N.; SENTRY Participants Group (Latin America). Urinary tract infection trends in Latin American hospitals: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program (1997-2000). **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 44, p. 289-299, 2002.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Mol Biol Evol**, v. 4, p. 406-425, 1987.

SCHJØRRING, S.; KROGFELT, K. A. Assessment of bacterial antibiotic resistance transfer in the gut. **Int J Microbiol**, v. 2011, p. 1-10, 2011.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE do Ministério da saúde. **Revista Clipping** de 12 de novembro de 2010.

SHALES, D. M. et al. Society for healthcare epidemiology of America and Infectious Disease Society of America Joint Committee on the Prevention of Antimicrobial resistance: guidelines for the prevention of antimicrobial resistance in hospitals. **Infect Contr Epid**, v. 18, p. 275-291, 1997.

- SIEVERT, D. M. et al. Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2009-2010. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v. 34, p. 1-14, 2013.
- SILVA, K. C.; LINCOPAN, N. Epidemiologia das beta-lactamases de espectro estendido no Brasil: impacto clínico e implicações para o agronegócio. **J Bras Patol Med Lab**, v. 48, p. 91-99, 2012.
- SIMOONS-SMIT, A. M. et al. Virulence of *Klebsiella* strains in experimentally induced skin lesions in the mouse. **J Med Microbiol**, v. 17, p. 67-77, 1984.
- SOUZA, A. C.; RODRIGUES, J. F.; MORAIS JÚNIOR, M. A. Molecular typing of *Klebsiella pneumoniae* isolates from public hospitals in Recife, Brazil. **Microbiol Res**, v. 160, p. 37-46, 2005.
- STEARNS, J. C. et al. Bacterial biogeography of the human digestive tract. **Sci Rep**, v. 1, p. 170, 2011.
- SULLIVAN, A.; EDLUND, C.; NORD, C. E. Effect of antimicrobial agents on the ecological balance of human microflora. Review. **Lancet Infectious Diseases**, v. 1, p. 101-114, 2001.
- TAMURA, K. et al. MEGA 6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Mol Biol Evol**, v. 24, p. 1596-1599, 2013.
- TENOVER, F. C. "Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria." **The American Journal of Medicine**, v. 119, p. S3-10, discussion S62-70, 2006.
- TOUFEN JUNIOR, C. et al. Prevalence rates of infection in intensive care units of a tertiary teaching hospital. **Revista do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo**, v. 58, p. 254-259, 2003.
- TSAI, Y. K. et al. "*Klebsiella pneumoniae* outer membrane porins OmpK35 and OmpK36 play roles in both antimicrobial resistance and virulence." **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 55, p. 1485-1493, 2005.

TURTON, J. F. et al. Evaluation of a multiplex PCR for detection of serotypes K1, K2 and K5 in *Klebsiella* sp. And comparison of isolates within these serotypes." **FEMS microbiol let**, v. 284, p. 247-252, 2008.

UMED O. *Klebsiella* infections. **Microbiology Gulbarga Univ**, 2002. Disponível em: <http://medicine.instant.access.to>. Acesso em 15 de agosto de 2014.

VILLAR, H. E.; BASERINI, M. N.; JUGO, M. B. Faecal carriage of ESBL-producing Enterobacteriaceae and carbapenem-resistant Gram-negative bacilli in community settings. **J Infect dev Ctries**, v. 7, p. 630-634, 2013.

VILMORE, J. Antibióticos somente vendidos com retenção de receita. **180graus**. Piauí, 29 out. 2010. Disponível em: <<http://www.180graus.com/farmacia/10>>. Acesso em: 15 set. 2013.

VOOTURI, S. K. et al. Design, Synthesis, and Structure-Activity Relationships of Benzophenone-Based Tetraamides as Novel Antibacterial Agents. **Journal of Medical Chemistry**, v. 52, p. 5020-5031, 2009.

WANG, J. T. et al. Genomic heterogeneity in *Klebsiella pneumoniae* strains is associated with primary pyogenic liver abscess and metastatic infection. **J Infect Dis**, v. 192, p. 117-112, 2005.

WOLLHEIM, C. et al. Nosocomial and community infections due to class A extended-spectrum β -lactamase (ESBLA)-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella spp.* in southern Brazil. **Braz J Infect Dis**, v. 15, p. 138-143, 2011.

WRIGHT, G. D. Antibiotic resistance: Where does it come from and what can we do about it. **BMC Biol**, v. 20, p. 123, 2010.

WU, K.M. et al. "Genome sequencing and comparative analysis of *Klebsiella pneumoniae* NTUHK2044, a strain causing liver abscess and meningitis." **Journal of bacteriology**, v. 191, p. 4492-4501, 2009.

YANG, C. M. et al. Comparison of antimicrobial resistance patterns between clinical and sewage isolates in a regional hospital in Taiwan. **Lett Appl Microbiol**, v. 48, p. 560-565, 2009.

YIGIT, H. et al. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 45, p. 1151–1161, 2012.

ZAVASCKI, A. P. et al. Polymyxin B for the treatment of multidroga-resistant pathogens: a critical review. **J Antimicrob Chemother**, v. 60, p. 1206-1215, 2007.