
1. INTRODUÇÃO

1.1. A espécie *Klebsiella pneumoniae*

Em 1885, Trevisan descreveu o gênero *Klebsiella*, designando-o em homenagem ao microbiologista alemão, Edwin Klebs. Trevisan também foi responsável pela descrição da espécie *Klebsiella pneumoniae*, em 1887 (J. Martínez et al. 2004).

O gênero *Klebsiella* faz parte da família Enterobacteriaceae. As células apresentam formato de bacilo, são Gram-negativas, imóveis, oxidase-negativas, anaeróbias facultativas e possuem cápsula polissacarídica, que recobre toda a célula e é considerada um importante fator de patogenicidade, responsável pela resistência das bactérias a diversos mecanismos de defesa do hospedeiro (Podschun and Ullmann 1998).

De acordo com a classificação de Ørskov, que se baseia em testes fenotípicos, o gênero *Klebsiella* compreende 5 espécies: *Klebsiella pneumoniae*, subdividida em subsp. *pneumoniae*, subsp. *ozaenae* e subsp. *rhinoscleromatis*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella planticola*, *Klebsiella terrigena* e *Klebsiella ornithinolytica* (Podschun and Ullmann 1998; Dworkin et al. 1992; J. Martínez et al. 2004).

As bactérias do gênero apresentam grande versatilidade, sendo ubíquas. Elas podem ser encontradas na água, no esgoto, no solo e associadas a plantas, participando de diversos ciclos bio- e geoquímicos importantes, como na fixação de nitrogênio. Elas também podem colonizar mamíferos, incluindo os humanos e, em algumas situações causar infecções (Podschun and Ullmann 1998).

Alguns fatores e características são apontados como determinantes da patogenicidade destas bactérias: os antígenos capsulares, LPS, resistência ao soro, adesinas e sideróforos, são considerados importantes na determinação de quadros clínicos graves (Podschun & Ullmann, 1998).

Esses bacilos expressam 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. Hipermucoviscosidade também é uma característica observada em isolados causando infecções graves (Turton et al. 2008; Sylvain Brisse et al. 2009; Dworkin et al. 1992; Chuang et al. 2006; C-P Fung et al. 2002; Struve et al. 2005; Kabha et al. 1995; Simoons-Smit, Verweij-van Vught, and MacLaren 1986).

1.2. O genoma de *K. pneumoniae*

Em 2008, foi publicada a sequência completa de um genoma de *K. pneumoniae*, o isolado ambiental Kp342 que possui um cromossomo circular de 5.6 Mb e dois plasmídeos de 91 e 187.9 Kb (Fouts et al. 2008). Dessa forma, a complexidade genética e a versatilidade ecológica desta bactéria puderam ser mais bem compreendidas. O genoma completo de Kp342 foi comparado ao genoma completo de MGH78578, um isolado clínico de *K. pneumoniae* (Fouts et al. 2008).

A susceptibilidade a antimicrobianos e a patogenicidade de KP342 foram testadas e comparadas a isolados clínicos da mesma espécie. O fenótipo de multirresistência às principais famílias de drogas utilizadas na clínica, incluindo β -lactâmicos, aminoglicosídeos, quinolonas, e tetraciclina, apresentado por este isolado está relacionado às β -lactamases, bombas de efluxo e proteínas de membrana externa, codificados no genoma deste organismo. Considerando o estilo de vida deste isolado, supõe-se que os mecanismos envolvidos na resistência a antibióticos são mantidos na célula por razões adicionais à resistência antimicrobiana, como remoção de substâncias tóxicas ou envolvimento na resposta natural da bactéria à planta. Em relação ao potencial patogênico de KP342, experimentos em camundongo mostraram que o isolado possui capacidade de causar infecção pulmonar e no trato urinário, mas sua virulência é reduzida. Em resumo, o estudo concluiu que, apesar de KP342 ser encontrada no ambiente, vivendo em associação a plantas, este isolado tem o potencial de provocar infecção, além da multirresistência a antibióticos, devido à presença de um conjunto de genes associados a este fenótipo (Fouts et al. 2008).

Em 2009, o isolado NTUH-K2044, obtido de paciente com abscesso hepático e meningite, foi seqüenciado e seu genoma comparado ao do isolado MGH78578, obtido de um paciente com pneumonia, objetivando observar se diferenças no conteúdo gênico poderiam estar relacionadas a diferentes tipos de infecção (Wu et al.,2009). O estudo também realizou análise comparativa entre genomas de 15 *K. pneumoniae* obtidas de infecções nosocomiais e adquiridas na comunidade, utilizando o genoma de NTUH-K2044 como sonda.

As análises realizadas mostraram a presença de assinaturas genômicas associadas a padrões de infecção. Além de inserção-deleção, a identificação da sequência de pró-fago associada a uma linhagem sugere que a transferência lateral de genes pode ser um dos mecanismos evolutivos em *K. pneumoniae* (Wu et al. 2009).

Em 2011, genomas completos de *K. pneumoniae*, apresentando diferentes perfis de resistência a antibióticos foram estudados (V. Kumar, Sun, et al. 2011). Utilizando listas curadas com mais de 400 genes de resistência foi possível identificar que o isolado multirresistente apresentava bombas de efluxo adicionais, genes de β -lactamases de espectro estendido e vários determinantes de resistência a fluoroquinolonas adquiridos por transferência lateral que, como se sabe, é um mecanismo-chave na evolução da resistência. Os isolados clínicos apresentavam todos os três mecanismos de resistência a drogas presentes em bactérias Gram-negativas: aquisição de novos genes catalíticos, alterações nos alvos das drogas e em proteínas de membrana, e a expressão diferencial de genes específicos de bombas de efluxo. As análises filogenéticas e do conteúdo gênico mostram que a transferência lateral é um mecanismo-chave para a aquisição de determinantes de resistência. Em resumo, as análises de genoma completo permitiram uma melhor compreensão dos mecanismos genéticos envolvidos nas diferenças de susceptibilidade a drogas em *K. pneumoniae*, e uma visão geral da dinâmica da diversidade genética e evolutiva desta espécie (V. Kumar, Sun, et al. 2011).

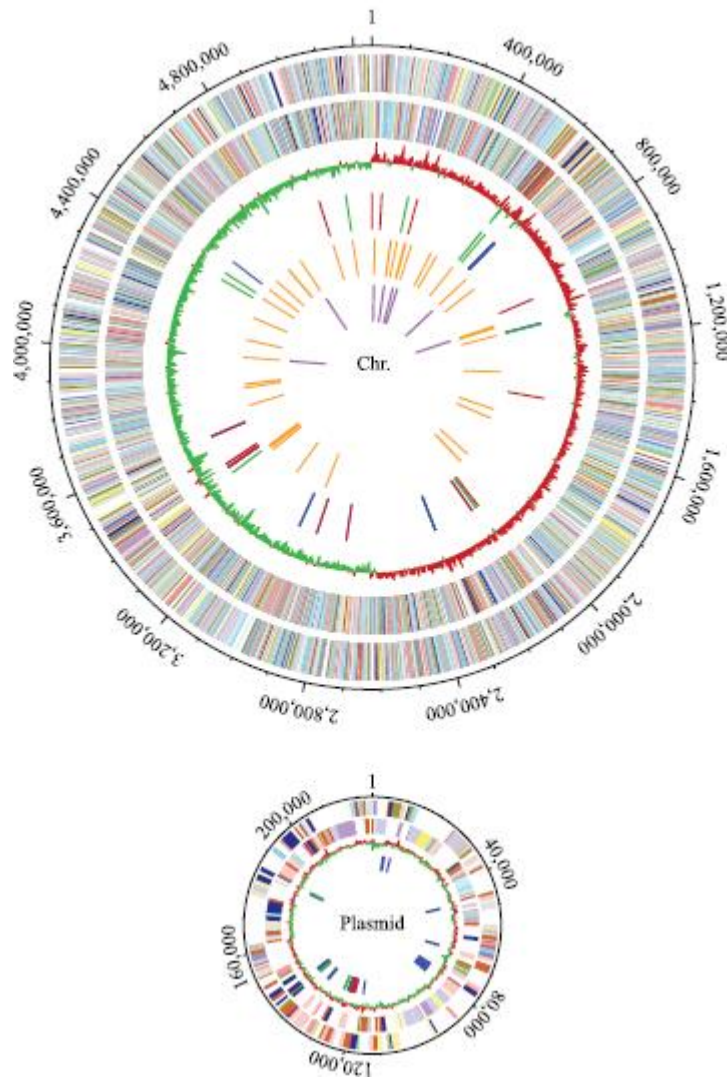


Figura 1.1 Mapa genômico do cromossoma de *K. pneumoniae* NTUH-K2044 e plasmídeo. De fora para dentro, o primeiro e segundo círculos mostram as regiões preditas codificantes de proteínas das fitas + e -. As cores utilizadas correspondem às categorias funcionais COG (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/grace/fiew.cgi>). O terceiro círculo mostra o conteúdo GC. O quarto círculo mostra transposases/transposons (azul), integrases/recombinases (verde) e sequências de inserção (vermelho). Os círculos cinco e seis correspondem às regiões de tRNA e rRNA, respectivamente. Fonte: (Wu et al, 2009)

1.3. Fatores determinantes de resistência aos antimicrobianos

Um microorganismo pode ser constitutivamente resistente a um determinado antibiótico ou adquirir a resistência. A resistência intrínseca é a característica inata da bactéria a ser não-susceptível a um determinado agente antimicrobiano, devido a características estruturais ou funcionais. Este fenótipo pode se dever a: 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. Resistência adquirida ocorre quando uma bactéria previamente sensível a antibióticos desenvolve resistência, podendo ser causada por mutações ou por aquisição de material genético novo. (P M Hawkey 1998; Hæggman et al. 2004).

K. pneumoniae possui características intrínsecas que a tornam naturalmente resistente a algumas classes de antibióticos. A presença constitutiva de genes de β -lactamases como: *bla*_{SHV}, *bla*_{OKP} e *bla*_{LEN} no cromossomo é responsável por este fenótipo. Estas β -lactamases de classe 2 conferem resistência a penicilina e cefalosporina de espectro restrito (por exemplo cefalotina ou cefalexina) e possuem a característica de serem inibidas por ácido clavulânico (Hæggman et al. 2004).

Outro mecanismo de resistência intrínseco são as 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 β -lactâmicos, aminoglicosídeos, tetraciclina e cloranfenicol. Expressão reduzida ou ausente desta bomba, devido a alterações na transcrição de genes envolvidos na regulação e/ou expressão deste sistema de efluxo, acarreta concentrações inibitórias mínimas (MICs) menores (Hasdemir et al. 2004; Padilla et al. 2010). Recentemente, demonstrou-se que este sistema também está envolvido na resistência a peptídeos antimicrobianos produzidos pelo hospedeiro. Estes peptídeos são considerados uma das primeiras barreiras do sistema imune inato contra infecções. Dessa forma, AcrAB pode

desempenhar um papel importante nos estágios iniciais de infecção (Padilla et al., 2010).

Resistência adquirida aos antibióticos pode ser acarretada por alteração na permeabilidade da membrana celular, o que impede a ação dos antibióticos nas células bacterianas. A resistência se deve 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* que, quando alteradas, levam ao aumento das MICs e até mesmo ao fenótipo de resistência às cefalosporinas, carbapenemas e fluoroquinolonas (Rodríguez-Martínez et al. 2008; García-Fernández et al. 2010; Y.-K. Tsai et al. 2011).

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 a estas drogas. Estes eventos, seguidos de seleção das linhagens que se tornaram resistentes ao antibiótico, permitem a adaptação rápida das bactérias aos antimicrobianos e o surgimento de bactérias multirresistentes, que não são susceptíveis a três ou mais classes de antibióticos (P M Hawkey 1998; Tenover 2006).

A resistência adquirida também pode envolver a transferência lateral/horizontal de genes codificadores de enzimas que metabolizam os antibióticos, que atuam protegendo o alvo bacteriano do antibiótico ou genes que codificam uma proteína alternativa, incapaz de interagir com o antibiótico. A transferência dos genes pode ocorrer por mecanismos clássicos como conjugação, transformação e transdução. A conjugação envolve a transferência de plasmídeos entre duas células através do seu contato direto. Plasmídeos auto-transmissíveis codificam todas as funções necessárias para a sua transferência e, em alguns casos, eles auxiliam na transferência de DNA cromossômial e plasmídeos mobilizáveis, os quais não possuem todas as funções necessárias para realizar a sua transferência entre células. Bactérias carregando plasmídeos auto-transmissíveis são doadoras potenciais. Em bactérias Gram-negativas, essas células produzem uma estrutura protéica denominada *pilus*, que estabelece a aproximação de duas células e o contato de seus citoplasmas possibilitando que plasmídeos possam ser transferidos. Os plasmídeos são moléculas de DNA fita-dupla auto-replicativas.

Durante a conjugação, essas fitas se separam e uma delas é transferida para a célula receptora. As fitas simples de DNA servem como molde para a replicação de moléculas de DNA dupla-fita completas na célula doadora e na receptora. Os plasmídeos podem conter genes de resistência, e assim mobilizá-los quando da sua transferência para outras bactérias ou para o cromossomo bacteriano (P M Hawkey 1998; Snyder, L & Champness, W, 2003; Tenover 2006;). Dentro deste contexto, os transposons, que são elementos genéticos móveis e capazes de promoverem sua própria excisão e inserção em moléculas de DNA, possuem um papel importante já que podem mover genes dos plasmídeos para os cromossomos, dando a eles uma maior estabilidade/fixação.

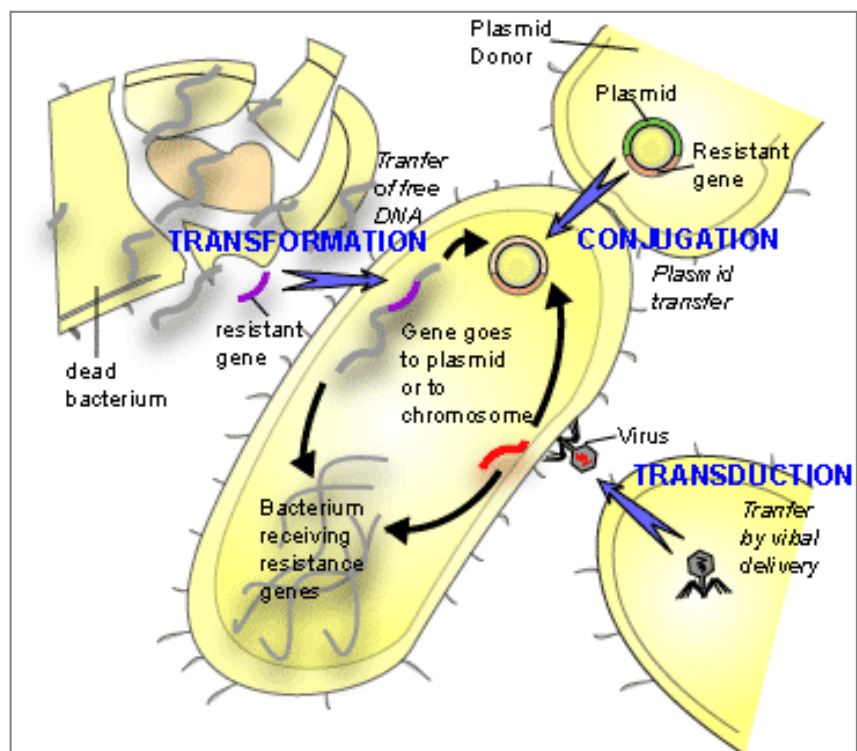


Figura 1.2: Mecanismos de transferência horizontal de genes. (retirado de <http://textbookofbacteriology.net/themicrobialworld/bactresanti.html>).

Outro elemento genético envolvido na resistência das bactérias aos antibióticos são os integrons. Essas estruturas são capazes de inserir, excisar, rearranjar e expressar genes através de um sistema de recombinação sítio-específico. Neste contexto os genes de resistência são chamados de cassetes gênicos e se caracterizam por serem integrados e expressos nestes elementos. O integron é caracterizado por três elementos principais: um gene que codifica uma integrase (*int*), um sítio de recombinação primário (*attI*) e um promotor (P_c), que promove a transcrição dos cassetes gênicos. A integrase catalisa a inserção e a excisão dos cassetes gênicos no integron. O cassete contém um único gene e uma repetição invertida no terminal 3', denominado sítio *attC* (ou *59 base-element*), que funciona como sequência de reconhecimento para a integrase. A integração desses cassetes ocorre à jusante do promotor P_c , no sítio *attI*, permitindo a expressão dos genes contidos nos cassetes (Mazel 2006).

Cinco classes de integron são conhecidas por seu papel na disseminação de genes de resistência. Estas classes foram definidas com base na sequência das integrases codificadas. Os integrons de classe 1, 2 são os principais envolvidos com fenótipos de multirresistência a antibióticos. Integrons de classe 1 são encontrados extensivamente em isolados clínicos, e a maioria dos cassetes gênicos conhecidos pertence a essa classe. Os cassetes identificados podem conferir resistência aos antibióticos das mais diversas classes incluindo β -lactâmicos, aminoglicosídeos, cloranfenicol, fluoroquinolonas e trimetoprim. Em contraste, apenas 6 cassetes diferentes já foram identificados em integrons de classe 2. Supõe-se que isso seja devido à perda de funcionalidade do gene que codifica a integrase de classe 2. Ela possui uma mutação no códon 179, que acarreta a produção de uma proteína truncada, não-funcional (Mazel 2006).

Os integrons de classe 1, 2 e 3, conhecidos como de resistência, podem estar associados a elementos genéticos móveis, como sequências de inserção (ISs), transposons e plasmídeos conjugativos, que servem como veículos para a transmissão de material genético, permitindo a dispersão dos genes de resistência contidos nestas estruturas (Mazel 2006).

Bactériófagos, vírus capazes de infectar bactérias, também podem promover a transferência de material genético em um processo denominado transdução.

Bactérias também são capazes de adquirir e incorporar segmentos de DNA do ambiente. Esse processo, denominado transformação, ocorre pela captação de fragmentos de material genético de outras bactérias que sofreram lise e liberaram seu conteúdo genético no ambiente. Esse fenômeno também é considerado importante, principalmente no meio-ambiente, e provavelmente é o principal mecanismo de dispersão de *Streptococcus pneumoniae* resistente a penicilina, por permitir a criação de genes em mosaico de proteínas ligadoras de penicilina (PBP). Essas proteínas alteradas são resistentes a penicilinas, tornando a bactéria que as produz resistente a essa classe de antibióticos (P M Hawkey 1998; Tenover 2006).

1.4. Genes que conferem resistência aos β -lactâmicos

As β -lactamases são as enzimas determinantes de resistência aos β -lactâmicos. Atualmente existem dois esquemas de classificação em uso, baseado na estrutura molecular, classificação de Ambler (Ambler et al. 1991) ou na função destas enzimas, classificação de Bush-Jacob-Medeiros (Bush, G. A. Jacoby, and A. A. Medeiros 1995). O esquema de Ambler é o mais usado e tem como base a seqüência de aminoácidos das enzimas, separando as β -lactamases em classe A, B, C ou D. As enzimas de classe A, C e D utilizam um resíduo serina para hidrolisar o anel β -lactâmico. Já as enzimas de classe B são metalo-enzimas, que requerem um íon zinco divalente para hidrólise do anel β -lactâmico (Bush and G. A. Jacoby 2010). β -lactamases das quatro classes de Ambler já foram relatadas em membros da família Enterobacteriaceae, inclusive em *K. pneumoniae* (L. F. Chen, Chopra, and Kaye 2009).

1.4.1. β -lactamases da classe A

As enzimas dessa classe podem conferir resistência as penicilinas, cefalosporinas e monobactam. Dentre elas, as β -lactamases de espectro estendido (ESBL) são de grande relevância por conferir um amplo espectro de resistência às cefalosporinas de terceira e quarta geração, como ceftazidime e

cefepime, ou aztreonam. Elas são caracterizadas por serem inibidas por ácido clavulânico e tazobactam. Os genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{PSE}, *bla*_{CTX} apresentam alta prevalência em *Klebsiellae* (Ambler et al. 1991; D M Livermore and D. F. Brown 2001; Marra et al. 2006), sendo encontrados frequentemente associados aos plasmídeos (L. F. Chen et al. 2009). A maioria dos relatos de ESBLs, 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 (Peter M Hawkey and A. M. 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 and Coque 2006; David M Livermore et al. 2007). 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* (Tollentino et al. 2011; de Oliveira Garcia et al. 2008).

A família KPC é um novo grupo de carbapenemases, recentemente identificada, pertencente ao subgrupo 2f da classificação de Bush-Jacob-Medeiros. Estas enzimas conferem resistência às carbapenemas, mas também são capazes de hidrolisar penicilinas, cefalosporinas e aztreonam (Sacha et al. 2009). O gene *bla*_{KPC} foi identificado pela primeira vez em um isolado de *K. pneumoniae*, de um hospital na Carolina do Norte/EUA, resistente à carbapenema (Yigit et al. 2001). Até o presente, 11 alelos de *bla*_{KPC} já foram identificados em outros membros da família *Enterobacteriaceae*, em *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter spp* (Sacha et al. 2009). A associação destes genes aos plasmídeos e transposons possibilita sua mobilização e transferência para outras bactérias.

1.4.2. β-lactamases da classe B

As metalo-β-lactamases pertencem à classe B e conferem resistência a um amplo espectro de β-lactâmicos, inclusive carbapenemas, antibióticos de última geração empregados no tratamento de infecções causadas por enterobactérias produtoras de ESBLs. Essas enzimas, pertencentes ao grupo 3 da classificação de

Bush-Jacob-Medeiros, são susceptíveis ao EDTA mas não são inibidas por ácido clavulânico ou tazobactam, além de não possuírem atividade contra monobactâmicos. A atividade contra β -lactâmicos varia entre as diferentes enzimas, e a especificidade de substrato pode variar, existindo enzimas de espectro restrito a ampliado. Nove tipos de MBLs 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 microorganismos gram-negativos (Bush and G. A. Jacoby 2010; Sekowska et al. 2010).

As enzimas IMP e VIM possuem amplo espectro de atividade, conferindo resistência a cefalosporinas e carbapenemas. As variantes destas famílias já foram identificadas em membros da família Enterobacteriaceae, e possuem uma distribuição geográfica definida, apesar da identificação de algumas variantes em diferentes regiões geográficas, o que evidencia seu potencial para disseminação intercontinental. As variantes da família VIM possuem alta afinidade por carbapenemas e um espectro de ação maior do que enzimas IMP, agindo sobre 6- α -methoxy-penicilinas. A enzima SPM-1 foi descrita pela primeira vez em um isolado de *P. aeruginosa* do Brasil (Toleman et al. 2002) e aparenta estar confinada a este país e a esta espécie. Seu espectro de ação é amplo, agindo sobre carbapenemas, cefalosporinas e penicilinas. A enzima NDM-1 foi identificada pela primeira vez em um isolado de *K. pneumoniae*. Esta família, que se encontra amplamente distribuída em enterobactérias na Índia, tem sido identificada em diferentes regiões geográficas, sendo considerada uma MBL de importância clínica e epidemiológica (Cornaglia, Giamarellou, and Rossolini 2011).

A associação entre MBLs e elementos genéticos móveis e mobilizáveis, como plasmídeos e integrons contribui para a disseminação destas enzimas, e explica a identificação de um mesmo gene em plasmídeos ou cromossoma de diferentes isolados. A maioria dos genes encontra-se associado à integrons de classe 1, no entanto, SPM-1 e NDM-1 encontram-se associados à sequências de inserção, capazes de mobilizar segmentos flanqueadores de DNA (Cornaglia et al. 2011).

1.4.3. β -lactamases da classe C

As β -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. Essas enzimas já foram encontradas associadas à plasmídeos, mas são menos comuns do que ESBLs (G. a Jacoby 2009). O gene DHA, deste grupo, já foi encontrado em plasmídeos de isolados de *K. pneumoniae* (Empel et al. 2010)

1.4.4. β -lactamases da classe D

As β -lactamases de classe D são representadas pela família OXA, frequentemente associada à integrons de classe 1. Elas são caracterizadas por serem fracamente inibidas por ácido clavulânico, embora sejam eficientemente inibidas pro tazobactam. Essas enzimas conferem resistência às penicilinas, oxacilina, ampicilina, carbenicilina e ticarcilina, assim como às cefalosporinas de espectro limitado, como a cefalotina (Bush and G. A. Jacoby 2010). Apesar de serem consideradas β -lactamases de espectro limitado, alguns alelos da família OXA podem apresentar um espectro maior de atividade, podendo conferir resistência a cefalosporinas de espectro estendido e também a carbapenemas. Os alelos OXA-48 e OXA-23 apresentam esse espectro maior de resistência e já foram observados em membros da família *Enterobacteriaceae*, inclusive em *K.pneumoniae*(Bush and G. A. Jacoby 2010; Cuzon et al. 2011).

1.5. **Genes que conferem resistência aos aminoglicosídeos**

Aminoglicosídeos são antibióticos com ação bactericida. Eles agem impedindo a síntese protéica bacteriana, através da sua ligação à subunidade 30S ribossomal, e rompendo a integridade da membrana celular bacteriana. Essa ligação impede que o ribossomo possa exercer sua função na célula, prevenindo o alongamento da cadeia polipeptídica e causando a terminação precoce da síntese de proteínas (Shakil et al. 2008).

Os mecanismos que contribuem para a resistência a aminoglicosídeos incluem redução do acúmulo intracelular do antibiótico, devido a mudanças na permeabilidade de membrana ou presença de bombas de efluxo, alteração do alvo

ribossomal devido a mutações, metilação do sítio de ligação ao aminoglicosídeo ou modificação do antibiótico por enzimas (Gad, Mohamed, and Ashour 2011).

A modificação enzimática da molécula de aminoglicosídeo é o principal mecanismo de resistência em bactérias Gram-negativas e positivas, e pode ocorrer por acetilação, adenilação ou fosforilação de sítios específicos do antibiótico. As enzimas responsáveis por essas modificações são acetiltransferases (AAC), adenililtransferases (AAD) e fosfotransferases (APH) (Gad et al. 2011).

Dentre os vários genes que codificam enzimas modificadoras de aminoglicosídeos, destaca-se o *aac(6')*-Ib, o qual confere resistência a amicacina, gentamicina e tobramicina. Esse gene é o mais frequentemente identificado em estudos e se apresenta amplamente distribuído em integrons de classe 1, presentes em diversas espécies bacterianas, inclusive *K. pneumoniae* (Shaw et al. 1993; Centrón and Roy 1998).

As adenililtransferases *aadA* e *aadB* também já foram identificadas em associação a integrons de classe 1 em membros da família *Enterobacteriaceae*, conferindo resistência a spectinomicina e estreptomicina (*aadA*); e gentamicina, kanamicina e tobramicina (*aadB*) (White, Iver, and Rawlinson 2001).

1.6. Mecanismos de resistência ao trimetoprim

Trimetoprim é um antibiótico utilizado no tratamento de infecções urinárias, entéricas, respiratórias e de pele, causadas por bactérias Gram-negativas, como *E. coli*. Ele é um inibidor competitivo da dihidrofolato-redutase, uma enzima essencial para todas as células vivas. Resistência ao antibiótico pode ser acarretada por mutações na bactéria. Dependendo do local onde a mutação ocorre, pode haver um aumento na produção da enzima, caso ocorra na região de regulação desta, ou a produção de uma enzima com maior afinidade por seu substrato. A perda mutacional da habilidade de metilar ácido desoxiuridílico em ácido timidílico torna a bactéria dependente de um suprimento externo de timina. Dessa forma, a enzima DHFR é aliviada do seu principal papel de regeneração

de tetrahidrofolato, o qual é consumido no processo de metilação descrito anteriormente (Huovinen et al. 1995).

O mecanismo de resistência mais freqüente a trimetoprim é a produção de enzimas codificadas por genes denominados *dfr*, que promovem modificações na enzima-alvo dihidrofolato-redutase. Genes *dfr* podem ser encontrados no cromossomo ou em plasmídeos de diferentes espécies bacterianas. Esses genes são subdivididos em dois grupos principais, denominados *dfrA* e *dfrB*. Alelos do gene *dfrA* já foram descritos conferindo resistência a trimetoprim, estando frequentemente associados à integrons de classe 1 presentes em enterobactérias (Huovinen et al. 1995; White et al. 2001; Brolund et al. 2010). Recentemente, um trabalho descreveu um novo cassete gênico, designado *dfrA30*, presente em um integron de classe 1 de um isolado de *K. pneumoniae* ambiental (A. Kumar, Chakraborti, et al. 2011).

1.7. Mecanismos de resistência às quinolonas

Quinolonas foram desenvolvidas como potentes agentes antibactericidas no início dos anos 60, sendo utilizadas para tratar infecções do trato urinário (ITU). Desde então, novos compostos desta família foram sintetizados e introduzidos no mercado. Em especial as fluoroquinolonas, que apresentam um átomo fluorina na posição 6 de sua molécula, possuem alta atividade contra bactérias Gram - negativas. Quinolonas agem sobre a DNA girase e a topoisomerase IV, enzimas que controlam mudanças conformacionais no DNA bacteriano. (Ruiz 2003).

Até recentemente, acreditava-se que a resistência às quinolonas, em Enterobacteriaceae, era determinada apenas pelas mutações nos genes das subunidades da DNA girase (*gyrA* e *gyrB*), e na topoisomerase IV (*parC*), levando a substituições de aminoácidos, que podem acarretar mudanças no alvo das quinolonas, impedindo a sua ação. Contudo, a resistência a estes compostos também pode ocorrer por impermeabilidade de membrana, devido à deficiência na expressão de porinas, e/ou super-expressão de bombas de efluxo, que impedem o acúmulo do composto no interior da bactéria, impossibilitando sua ação (Peter M Hawkey and A. M. Jones 2009). A descoberta do gene *qnr* carregado por elementos

móveis, como plasmídeos e associados aos integrons, mudou a epidemiologia da resistência as fluoroquinolonas. O produto deste gene protegeria as moléculas de DNA girase e topoisomerase IV, impedindo a ação do antimicrobiano. Atualmente, cinco tipos de *qnr* já foram descritos: *qnrA*, *qnrB*, *qnrC* e *qnrD*. A associação destes genes aos plasmídeos permite sua transferência para outras bactérias. Além destes genes, outros tipos de resistência à quinolona associada ao plasmídeo (PMQR) foram descritas. Uma variante de acetiltransferase, denominada *aac(6')-Ib-cr*, possui espectro de ação não apenas sobre aminoglicosídeos, mas também sobre ciprofloxacina e norfloxacina (fluoroquinolonas). Os genes codificadores de bombas de efluxo *qepA* e *oqxAB*, conferindo resistência às fluoroquinolonas também já foram descritos em plasmídeos (Strahilevitz et al. 2009). Resistência às quinolonas devido a mutações em *gyrA* e *parC*, e a presença de genes de resistência *qnr* já foram observados em isolados de *K. pneumoniae* no Brasil (Minarini et al. 2008).

1.8. Mecanismos de resistência a tetraciclinas

Tetraciclinas são antibióticos de amplo espectro, possuindo atividade bacteriostática contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. Elas atuam nos ribossomos bacterianos, ligando-se a eles e impedindo a ligação de aminoacil-tRNA, bloqueando a síntese protéica (Thaker, Spanogiannopoulos, and Wright 2010).

Bactérias dispõem de diferentes mecanismos para evadir a ação desses antibióticos, incluindo: extrusão da droga através de bombas de efluxo, produção de proteínas protetoras de ribossomos (RPPs), redução da permeabilidade à droga, mudança do alvo e inativação enzimática. Os dois primeiros mecanismos são predominantes em ambiente clínico. A associação destes genes a elementos genéticos móveis, como plasmídeos e transposons, permite que esses mecanismos de resistência possam ser transferidos para outras espécies de bactérias, tornando-as resistentes (Thaker et al. 2010; Speer, Shoemaker, and Salyers 1992).

A alteração de porinas, limitando o acesso do antibiótico ao citoplasma bacteriano, já foi observada em bactérias Gram-negativas. Este mecanismo inespecífico pode levar a resistência cruzada a outras classes de antibióticos, como β -lactâmicos (C. C. Sanders et al. 1984; Speer et al. 1992; Thaker et al. 2010).

Desde a descoberta dos primeiros genes de resistência à tetracilina, a nomenclatura destes genes sofreu modificações. O sistema baseava-se em uma classificação por letra que se tornou pequeno frente ao número de novos genes que foram descobertos. Dessa forma, introduziu-se um sistema alfa-numérico para classificar os novos genes. Baseando-se em homologia de sequência nucleotídica estes genes foram classificados em 41 grupos, dos quais 26 são bombas de efluxo, 11 são RPPs e 2 são enzimas inativadoras. Além desses, outros mecanismos existem como mutações pontuais e genes em mosaico, que não foram incluídos nesses grupos (Thaker et al. 2010).

Resistência devido à bomba de efluxo é o mecanismo mais bem-estudado e comum de resistência à tetraciclinas. A maioria destas proteínas pertence à família MFS de transportadores integrais de membrana, e já foram identificadas em diversos gêneros bacterianos. As classes A até E destes genes são encontradas em membros da família *Enterobacteriaceae*. (Thaker et al. 2010; Speer et al. 1992). A expressão das proteínas da família MFS frequentemente é regulada por um repressor da família TetR. O gene *tet(R)* é um repressor, que bloqueia a transcrição de genes de resistência *tet* na ausência de tetraciclina. Quando o antibiótico está presente no citoplasma da bactéria, ele interage com a proteína codificada pelo repressor, acarretando uma mudança conformacional e desreprimindo a transcrição dos genes de resistência. Diversos membros da família *tetR* já foram descritos como reguladores da expressão de genes de resistência a tetraciclinas, cloranfenicol, eritromicina, ampicilina e estreptomicina (Z. Yu et al. 2010).

Proteínas protetoras de ribossomos (RPPs) representam uma classe amplamente distribuída de determinantes de resistência, que protegem os ribossomos da ação de tetraciclinas, impedindo sua ligação a eles. As classes dos genes *tet(M)* e *tet(O)* são as mais prevalentes e bem estudadas deste grupo. (Thaker et al. 2010; Speer et al. 1992).

Inativação enzimática é um mecanismo menos comum de resistência, possuindo apenas três membros descritos: *tet(X)*, *tet(34)* e *tet(37)*. *tet(X)* já foi observado em associação a transposons em *Bacterioides* sp (Thaker et al., 2010).

1.9. Mecanismos de resistência ao cloranfenicol

Cloranfenicol é um potente agente bacteriostático, que age impedindo o alongamento da cadeia peptídica através de sua ligação à subunidade 50S ribossomal. Este antimicrobiano possui amplo espectro de ação, sendo eficiente contra infecções causadas por organismos Gram- positivos, Gram- negativos, aeróbios e anaeróbios. Resistência ao cloranfenicol pode acontecer basicamente por um de três mecanismos: produção de enzimas inativadoras, mudança do alvo ribossomal ou inacessibilidade do alvo, devido à mudança de permeabilidade de membrana ou produção de sistemas de efluxo. O mecanismo mais comum é a produção de acetiltransferases (CATs), codificadas pelo gene *cat*. Resistência devido a mudanças no alvo ribossomal são raras, provavelmente porque podem gerar alterações na função do ribossomo, prejudicando seu funcionamento (Schwarz et al. 2004).

CATs são subdivididas em dois grupos principais (A e B) caracterizados por diferenças na estrutura protéica. Diversos genes *cat* já foram descritos e observados em uma variedade de bactérias, sendo localizados em cromossomos, transposons, integrons e plasmídeos. CATs do subgrupo A-3 são frequentemente encontradas em plasmídeos de membros da família *Enterobacteriaceae* (Schwarz et al. 2004).

A exportação de cloranfenicol para fora da célula bacteriana pode ser mediada por transportadores específicos, que possuem espectro de ação limitado a uma variedade de moléculas estruturalmente relacionadas, ou transportadores multidroga, que possuem importante papel fisiológico para a célula, atuando na excreção de compostos tóxicos que, às vezes, podem incluir antimicrobianos. Transportadores específicos não possuem uma função conhecida na fisiologia da célula, e produzem níveis mais elevados de resistência do que os transportadores multidroga. Genes associados a esse mecanismos de resistência já foram

observados em bactérias clinicamente relevantes e em isolados ambientais, podendo estar sendo carregados por elementos móveis, como plasmídeos e transposons (Schwarz et al. 2004).

Tabela 1.1: Alvos dos antibióticos e mecanismos de resistência antimicrobiana

Antibiótico	alvo do antibiótico	Mecanismos de Resistência			
penicilinas	formação de parede celular	produção de beta-lactamase	bomba de efluxo		
carbapenemas	formação de parede celular	produção de beta-lactamase	bomba de efluxo	menor expressão de porina	
cefalosporinas	formação de parede celular	produção de beta-lactamase	bomba de efluxo	menor expressão de porina	
aztreonam	formação de parede celular	produção de beta-lactamase	bomba de efluxo		
aminoglicosídeos	síntese protéica	<i>Aac, aad, aph</i>	bomba de efluxo	menor expressão de porina	mod. de alvo ribossomal
inibidores da via do folato	síntese de ác. Fólico	<i>dfi, sul</i>		menor expressão de porina	mod. de alvo DHFR
quinolonas	DNA girase/ replicação	<i>qnr</i>	bomba de efluxo	menor expressão de porina	mod do alvo DNA girase
tetraciclina	30s rRNA/ síntese proteica	RPP, <i>tet</i>	bomba de efluxo	menor expressão de porina	mod. de alvo ribossomal
cloranfenicol	50s rRNA/ síntese proteica	<i>cat</i>	bomba de efluxo	menor expressão de porina	

1.10. Epidemiologia de *K. pneumoniae* multirresistente

Por ser uma bactéria ubíqua, *K. pneumoniae* pode ser isolada de diferentes substratos, podendo colonizar plantas e animais. Estudos, avaliando as taxas de colonização humana por bactérias mostram que, no caso do gênero *Klebsiella*, as taxas de colonização, de modo geral, apresentam-se mais altas em ambiente hospitalar: indivíduos hospitalizados e funcionários (Podschun and Ullmann 1998; M. E. McBride et al. 1976; Blaschke et al. 2010).

Devido ao caráter oportunista das infecções humanas causadas por *Klebsiella* spp., que atinge, em especial, indivíduos imunocomprometidos, esta bactéria possui potencial de causar altas taxas de morbidade e mortalidade. *K. pneumoniae* e *K. oxytoca* são espécies prevalentes em infecções humanas, sendo *K. pneumoniae* a espécie de maior importância médica do gênero. As infecções podem ser adquiridas na comunidade; no entanto, relatos de infecções nosocomiais são mais frequentes (Podschun and Ullmann 1998; Struve and K. A. Krogfelt 2004).

A identificação de surtos, causados por linhagens do gênero *Klebsiella*, multirresistentes a antibióticos tem crescido nos últimos anos, atingindo UTIs e alas pediátricas de hospitais localizados ao redor do mundo. Os critérios para definição de multirresistência não são padronizados, podendo variar entre diferentes estudos, mas em geral a multirresistência é caracterizada pela resistência a três ou mais classes de antibióticos (Lichtenfels, Frankini, Paludo, & Azevedo, 2008; Martins, Kuchenbecker, Pilger, Pagano, & Afonso L Barth, 2011; Schwarz et al., 2010). A maioria dos surtos está relacionada a linhagens multirresistentes, frequentemente produtoras de β -lactamases de espectro estendido (ESBL), cujos genes são encontrados geralmente em plasmídeos. Com isso, a possibilidade de disseminação dessa resistência para outros organismos é grande, principalmente entre membros da família *Enterobacteriaceae*, levando a emergência e disseminação das novas linhagens multirresistentes de *K. pneumoniae* (Podschun and Ullmann 1998; de Oliveira Garcia et al. 2008; Ø. Samuelsen et al. 2009).

Surtos e epidemias são definidos pelo espalhamento de clones, assim a tipagem dos isolados é fundamental para a definição destas situações. As abordagens contemporâneas para a caracterização de isolados de *K. pneumoniae*, são: a determinação de perfis genômicos por macro-restrição e a análise da sequência de vários genes do genoma estável da bactéria. A primeira abordagem, conhecida como eletroforese em gel de campo pulsátil (PFGE), que gera pulsotipos se aplica, principalmente aos estudos de surtos limitados no tempo e no espaço (Richard V Goering 2010) enquanto a segunda, conhecida como tipagem por sequenciamento de vários loci (MLST), aplica-se a caracterização de linhagens e complexos clonais. O esquema de MLST para *K. pneumoniae* envolve a análise de 7 genes essenciais à espécie. A combinação das sequências destes genes formam um perfil, denominado sequência-tipo (ST). Quando STs diferem em apenas um alelo, diz-se que estes pertencem a um complexo clonal. Essa técnica permite a caracterização das relações entre isolados e produz dados não ambíguos que, através da utilização de uma base de dados internacional, permite a comparação de resultados obtidos por diferentes laboratórios (Diancourt et al. 2005). Dessa forma, a comparação dos STs permite estudos epidemiológicos para observar a distribuição de linhagens em diferentes partes do mundo. Com a utilização dessa base de dados, pode-se observar a existência de um clone de *K. pneumoniae* pandêmico, do ST-258. Este ST foi descrito pela primeira vez em 2009, em isolados da Suécia e da Noruega (Ø. Samuelsen et al. 2009). Desde então, isolados pertencentes ao mesmo ST e aos STs pertencentes ao seu complexo clonal, já foram descritos nas Américas, na Europa e na Ásia (Leavitt et al. 2010; Tóth et al. 2010; Baraniak et al. 2009; Ø. Samuelsen et al. 2009; Mataseje et al. 2011; Andrade et al. 2011).

1.11. Justificativa:

Infecções hospitalares causadas por *K. pneumoniae* multirresistentes são um grave problema de saúde pública que vem se tornando mais frequentes, causando surtos e epidemias em diversos países, inclusive no Brasil. A maioria dos trabalhos relacionados à *K. pneumoniae* foca o estudo e a caracterização de

isolados clínicos multirresistentes, no entanto, esta bactéria é ubíqua no ambiente. Bactérias ambientais podem atuar como reservatórios de genes de resistência, os quais, carregados por elementos móveis como os plasmídeos, podem ser transmitidos a outros microorganismos patogênicos presentes no ambiente.

Sendo assim, este projeto visa analisar geneticamente isolados ambientais e clínicos de *K. pneumoniae*, a fim de caracterizar as populações presentes nestes dois compartimentos e, também, buscar a associação de fenótipos de resistência aos antimicrobianos aos genótipos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

- Caracterização genética de isolados clínicos e ambientais de *K. pneumoniae*

2.2. Objetivos Específicos

- Determinar a clonalidade de isolados clínicos e ambientais de *K. pneumoniae*
- Determinar o fenótipo de resistência dos isolados clínicos e ambientais a diferentes classes de antimicrobianos.
- Caracterizar geneticamente a resistência dos isolados aos antimicrobianos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Meios de cultura e soluções

A esterilização de todos os meios de cultura foi realizada em autoclave a 120°C, 1 atm, por 15 minutos.

3.1.1. Meios de cultura

- **BHI (Brain Heart Infusion) (OXOID)**- infusão de sólidos de cérebro de bezerro (12,5g); infusão de sólidos de coração de boi (5,0g); proteose peptona (10g); glicose (2g); cloreto de sódio (5g); fosfato de sódio dibásico (2,5g), pH 7,2 – 7,6. Os compostos foram dissolvidos em 1L de água destilada. Para o preparo do meio sólido, adicionou-se 1,2% de ágar bacteriológico (OXOID).
- **Ágar Mueller-Hinton (Difco)**- infusão de carne (300g); casaminoácidos (17,5g); amido (1,5g); Agar (17g). Os compostos foram dissolvidos em 1L de água destilada e a suspensão foi aquecida até a dissolução completa do ágar.

3.1.2. Soluções

- **TAE 50X (Tris-Acetato-EDTA)(Eppendorf)**- Tris-Acetato 2M; EDTA 0,05M, pH 8,3
- **TBE 10X ultrapure (Tris-borato-EDTA) (USB)**- Tris 0,89M; ácido bórico 0,89M; EDTA 0,02M. Reconstituir para 200mL em água Mili-Q.
- **EDTA 0,5M, pH 8,0**- EDTA (186,1g). Ajustar para pH 8,0 com hidróxido de sódio (~20g). Completar o volume com água Mili-Q para 1L de solução. Autoclavar a 120°C por 20 minutos.
- **Solução de lise (PFGE)**- cloreto de sódio 1M; Tris-HCl 6mM pH 7,6; EDTA 100mM pH8,0; BRIJ-58 0,5%; desoxicolato 0,2%; sarcosina 0,5%; lisozima 1 mg/mL.
- **Solução ESP**- EDTA 0,5M pH8,0; sarcosina 1%

- **Tampão PIV**- cloreto de sódio 1M; Tris-HCl 10mM pH7,6
- **Tampão TE**- Tris-HCl 10mM pH8,0; EDTA 0,1mM pH8,0
- **Salina 0,85% (p/v)**- 0,85g de cloreto de sódio em 100mL de água destilada. Autoclavar a 120°C por 20 minutos.

3.2 Seleção de isolados bacterianos

Neste estudo foram incluídas 76 amostras *K. pneumoniae* de origem clínica (KC=57) e ambiental (KE=19) recuperadas entre 2000 e 2010 (Tabela 3.1). Os isolados clínicos foram coletados de diferentes pacientes internados em hospitais de São Luís-MA, Rio de Janeiro-RJ e Manaus-AM. Os isolados ambientais foram coletados em Manaus-AM (ambiente hospitalar) e Belém-PA (água de rio).

Estas amostras constituem todas as bactérias pertencentes a espécie *K. pneumoniae* presentes na coleção de cultura do Laboratório de Genética Molecular de Microorganismos do IOC/FIOCRUZ, e encontram-se estocadas em freezer a -70°C.

Tabela 3.1: Isolados de *Klebsiella pneumoniae* estudados

Isolado	Origem	Fonte	Local	Ano
KC-01	Ma	clínico	UFMA	2000
KC-02	Ma	clínico	H.Aliança	2000
KC-03	Ma	clínico	HUPD	2000
KC-04	Ma	clínico	UDI	2000
KC-05	Ma	clínico	HSD	2000
KC-06	Ma	clínico	***	***
KC-07	Ma	clínico	***	***
KC-08	Ma	clínico	H.Aliança	***
KC-09	Ma	clínico	HSD	2000
KC-10	ATCC10031	***	***	***
KC-11	RJ	clínico	***	2005
KC-12	RJ	clínico	***	2005
KC-13	RJ	clínico	***	2005
KC-14	RJ	clínico	***	2005
KC-15	RJ	clínico	***	2005
KC-16	RJ	clínico	***	2005
KC-17	RJ	clínico	***	2005
KC-18	RJ	clínico	***	2005
KC-19	RJ	clínico	***	2005
KC-20	RJ	clínico	***	2005
KC-21	RJ	clínico	***	2005
KC-22	RJ	clínico	***	2005
KC-23	RJ	clínico	***	2005
KC-24	RJ	clínico	***	2005
KC-25	RJ	clínico	***	2005
KC-26	RJ	clínico	***	2005
KC-27	RJ	clínico	***	2005
KC-28	RJ	clínico	***	2005
KC-29	RJ	clínico	***	2005
KC-30	RJ	clínico	***	2005
KC-31	RJ	clínico	***	2005
KC-32	RJ	clínico	***	2005
KC-33	RJ	clínico	***	2005
KC-34	RJ	clínico	***	2005
KC-35	RJ	clínico	***	2005
KC-36	RJ	clínico	***	2005
KC-37	RJ	clínico	***	2006
KC-38	RJ	clínico	***	2006

Isolado	Origem	Fonte	Local	Ano
KC-39	RJ	clínico	***	2006
KC-40	RJ	clínico	***	2006
KC-41	RJ	clínico	***	2006
KC-42	RJ	clínico	***	2006
KC-43	RJ	clínico	***	2006
KC-44	Ma	clínico	***	2006
KC-45	Ma	clínico	***	2006
KC-46	Ma	clínico	***	2006
KC-47	Ma	clínico	***	2006
KC-48	Ma	clínico	***	2006
KC-49	Ma	clínico	***	2006
KC-50	AM	clínico	***	***
KC-51	AM	clínico	***	***
KC-52	AM	clínico	***	***
KC-53	AM	clínico	***	***
KC-54	RJ	clínico	***	2010
KC-55	RJ	clínico	Hosp. Fed. Lagoa.	2010
KC-56	RJ	clínico	CEMERU/Santa Cruz	2010
KC-57	RJ	clínico	CEMERU/Santa Cruz	2010
KE-01	AM	ambiental	***	***
KE-02	AM	ambiental	***	***
KE-03	AM	ambiental	***	***
KE-04	PA	ambiental	Rio Santana-Amazonas	2003
KE-05	PA	ambiental	Rio Santana-Amazonas	2003
KE-06	PA	ambiental	Rio Santana- Amazonas	2003
KE-07	PA	ambiental	Rio Santana- Amazonas	2003
KE-08	PA	ambiental	Rio Santana-Amazonas	2003
KE-09	PA	ambiental	Rio guaná- Amazonas	2003
KE-10	AM	ambiental	***	2006
KE-11	AM	ambiental	***	2006
KE-12	AM	ambiental	***	2006
KE-13	AM	ambiental	***	2006
KE-14	AM	ambiental	***	2006
KE-15	AM	ambiental	***	2006
KE-16	AM	ambiental	***	***
KE-17	AM	ambiental	***	***
KE-18	AM	ambiental	***	***
KE-19	AM	ambiental	***	***

***: dados não disponíveis

PA- Pará

AM- Amazonas

RJ- Rio de Janeiro

UFMA- Hospital Universitário do Maranhão

HÁ- Hospital Aliança

HSD- Hospital São Domingos

HUPD- Hospital Universitário Presidente Dutra

UDI- Hospital UDI

3.3 Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos

O teste de disco-difusão em ágar foi utilizado para determinar a susceptibilidade *in vitro* dos isolados aos antimicrobianos, baseando-se nas recomendações do CLSI/2010 (Clinical Laboratory Standards Institute). Uma colônia fresca obtida em placa de meio BHI foi ressuspensa em solução salina 0,85% estéril e sua turbidez ajustada de acordo com o padrão 0,5 da escala de McFarland. As bactérias foram inoculadas em placas de Mueller-Hinton, com o auxílio de um swab estéril, para formar um tapete uniforme. Após alguns minutos foram aplicados os discos impregnados com antibiótico (OXOID, Basinstoke, UK). As culturas foram incubadas a 36°C por 18h. Os halos de inibição do crescimento bacteriano foram medidos com auxílio de régua milimetrada, e os isolados classificados como resistentes, suscetíveis ou intermediários de acordo com os pontos de corte definidos pelo CLSI. Os isolados de *K. pneumoniae* foram definidos como multirresistentes quando se observa resistência a pelo menos três classes diferentes de antibióticos.

O perfil de susceptibilidade foi determinado para os seguintes antimicrobianos: ácido nalidíxico, amicacina, amoxicilina+ácido clavulânico, ampicilina, aztreonam, carbenicilina, cefalotina, cefepime, cefoxitina, ceftazidime, ceftriaxona, ciprofloxacina, cloranfenicol, ertapenem, gentamicina, imipenem, kanamicina, meropenem, norfloxacina, piperacilina, piperacilina+tazobactam, streptomina, sulfametoxazol+trimetoprim, sulfonamida, tetraciclina, ticarcilina+ácido clavulânico, tobramicina, trimetoprim.

A classificação e a sigla dos antibióticos utilizados neste estudo encontram-se listados na Tabela 3.2.

Tabela 3.2: Classificação e sigla dos antibióticos utilizados neste estudo

Classe	subclasse	Nome	Sigla
B-lactâmico	Penicilina	Piperacilina	PRL
		Ampicilina	AMP
		Carbenicilina	CAR
		Piperacilina-Tazobactan	TZP
		Amoxilina-Ácido clavulânico	AMC
		Ticarcilina- Ácido clavulânico	TIM
B-lactâmico	Carbapenema	Meropenem	MEM
		Ertapenem	ETP
		Imipenem	IPM
B-lactâmico	Cefalosporina	Cefalotina	CEP
		Cefoxitina	FOX
		Ceftazidime	CAZ
		Ceftriaxona	CRO
		Cefepime	FEP
B-lactâmico	Monobactam	Aztreonam	ATM
Aminoglicosídeo	-	Gentamicina	GEN
	-	Kanamicina	KAN
	-	Amicacina	AMK
	-	Estreptomina	STR
	-	Tobramicina	TOB
Quinolona	-	Ciprofloxacina	CIP
	-	Norfloxacina	NOR
	-	Ácido Nalidíxico	NAL
Inibidores da via metabólica do folato	-	Sulfametoxazol-Trimetoprim	SXT
	-	Sulfonamida	SUL
	-	Trimetoprim	TMP
Tetraciclina	-	Tetraciclina	TCY
Fenicol	-	Cloranfenicol	CHL

3.3.1. Teste de Hodge modificado

O teste de Hodge (modificado em Carvalhaes *et al.* 2010) foi realizado para verificar a produção de enzimas carbapenemases pelos isolados de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenemas. Em resumo, uma colônia fresca da cepa *E.coli* ATCC 25922 sensível a carbapenemas foi diluída em salina 0,85% estéril até atingir a turbidez equivalente à escala 0.5 McFarland. Os isolados a serem testados foram preparados da mesma forma até atingir a escala 3 de McFarland. A cepa de *E. coli* foi semeada em uma placa de ágar Mueller-Hinton, de modo a formar um tapete uniforme. Um disco de ertapenem foi colocado no centro da placa e os isolados a serem testados foram semeados em linha reta, partindo da borda do disco de antibiótico até a borda da placa. Até quatro organismos foram testados em cada placa. As placas foram incubadas a 36°C por 18h. O teste foi considerado positivo quando se observou a formação de uma endentação semelhante ao de um trevo de quatro folhas, na intersecção do organismo teste e da cepa controle de *E. coli*, dentro da zona de inibição do antibiótico. Este fenômeno ocorre devido à produção pelo organismo teste da enzima que degrada o antibiótico, permitindo o crescimento da cepa controle sensível na zona de inibição. O teste de Hodge é definido como negativo quando a cepa controle de *E. coli* não cresce na região do halo de inibição.

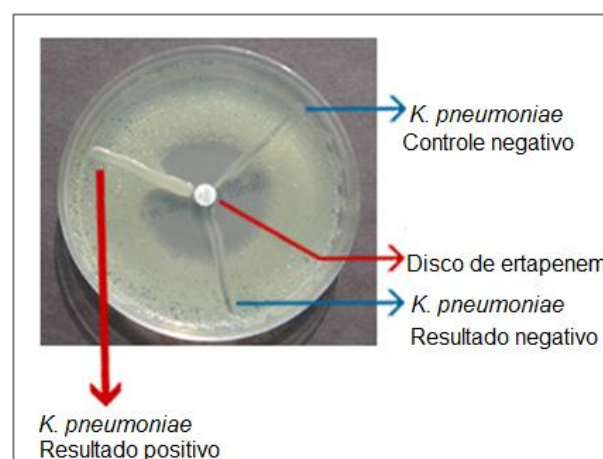


Figura 3.1: Resultado do Teste de Hodge modificado. A observação de uma distorção do halo de inibição na região entre o organismo-teste e a cepa controle, formando uma indentação, é considerado resultado positivo.

3.4 Extração de DNA pelo método de choque térmico

Os isolados bacterianos foram inoculados em 3 mL de caldo BHI e incubados a 37°C por 12-18h em agitação. Um mL de cultura de cada amostra foi transferido para tubos do tipo “Eppendorf” e centrifugados a 3000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspensão em 500 µL de salina 0,85%, para ser centrifugado a 3000 rpm por 5 minutos. Essa etapa foi repetida mais uma vez. O precipitado foi então ressuspensão em água mili-Q estéril e a suspensão submetida a banho-maria fervente (aproximadamente 100°C) por 10 minutos, com subsequente congelamento a -20°C. Esse material foi posteriormente descongelado à temperatura ambiente e centrifugado rapidamente (1400 rpm por 15 segundos) para ser utilizado nas reações de PCR.

3.5 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Os iniciadores utilizados neste estudo estão listados na Tabela 3.3. Todos os iniciadores foram testados quanto a sua especificidade.

Para a amplificação de regiões específicas do genoma, a reação de PCR foi realizada em um volume final de 50 µL. As reações individuais foram compostas de água mili-Q estéril, tampão de reação 1X (Promega), 3 mM de MgCl₂ (Promega), 0,2 mM de dNTP (*ultrapure dNTP set* [dATP, dCTP, dGTP, dTTP]- Amersham), 200 ng de cada iniciador, 1,5 unidades da enzima Taq DNA Polimerase (Promega) e 5 µL do DNA total, obtido por choque térmico.

A reação foi realizada nas seguintes condições: pré-desnaturação a 94° por 5 minutos, seguida por 40 ciclos a 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C com duração variando de acordo com o tamanho do alvo, considerando a relação 1 minuto/1 kb. A amplificação pela reação de PCR foi visualizada através de corrida de 10 µL do amplicon em gel de agarose a 1,5% em TAE 1X.

3.6 Identificação e caracterização genética dos integrons

A técnica de PCR foi aplicada para obtenção de amplicons correspondentes ao gene da integrase e aos cassetes gênicos do integron. Os distintos amplicons correspondentes a estas regiões foram seqüenciados. Os amplicons selecionados foram purificados e seqüenciados utilizando “Big Dye Terminator” (Applied Biosystems, Inc. Foster City, Calif) no seqüenciador automático de DNA Applied Biosystems 377. Esta técnica já está padronizada e vem sendo utilizada rotineiramente pelo laboratório de Genética Molecular de Microorganismos, do IOC. As análises das seqüências foram realizadas com auxílio dos pacotes de programas de análise de seqüências MEGA, BioEdit e Lasergene.

3.7 Rastreamento de genes associados à resistência aos antimicrobianos

Pela reação de PCR rastreamos a presença de resistência em todos os isolados, tendo como alvo os seguintes genes: *bla*_{KPC}, *bla*_{VIM}, *bla*_{OXA}, *bla*_{IMP}, *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{AmpC}, *bla*_{PER-1}, *bla*_{PSE}, *bla*_{DHA}, *bla*_{FOX}, *bla*_{GES}. Os iniciadores utilizados estão listados na tabela 3.3.

3.8 Eletroforese em gel de agarose

Os géis foram preparados dissolvendo a agarose em tampão TAE 1X de modo a obter uma concentração final de 1,5 a 1,8%. As amostras e 1 µL (1 µg/µL) de marcador de tamanho molecular (1 Kb ou 100 pb- Invitrogen) foram aplicados individualmente em poços formados com o auxílio de pente. A corrida eletroforética foi realizada em tampão TAE 1X com corrente de aproximadamente 80 Volts por 45 a 90 minutos. Após a corrida, o gel foi corado em solução de brometo de etídeo (0,5 µg/µL), observado sob luz ultravioleta e registrado em foto com equipamento VDS (Pharmacia-Biotech).

Tabela 3.3: Iniciadores utilizados nas reações de PCR e seqüenciamento

Iniciadores	Sequência nucleotídica (5'-3')	Região alvo	Referência
INT1 f	AAAACCGCCACTGCGCCGTTA	gene da integrase classe 1	LGMM
INT1 r	GAAGACGGCTGCACTGAACG		
INT2 f	GCGTTTTATGTCTAACAGTCC	gene da integrase classe 2	LGMM
INT2 r	AAGTAGCATCAGTCCATCC		
INF	GGCATCCAAGCAGCAAG	cassetes gênicos	LGMM
INB	AAGCAGACTTGACCT		
INF2	TGGGTGAGATAATGTGCATC	cassetes gênicos	LGMM
INB2	TCGAGAGAGGATATGGAAGG		
SHV F	TCGGGCCGCGTAGGCATG	alelos bla _{shv}	LGMM
SHV R	AGCAGGGCGACAATCCCG		
TEMg f	AGAGTATGAGTATTCAACATT	alelos bla _{tem}	LGMM
TEMg r	ATCTCAGCGATCTGTCTAT		
GES f	GCGTTTTGCAATGTGCTC	alelos bla _{ges}	Endimiani et
GES r	CCAGTTTTCTCTCCAACAACC		
OXA f	TTGGTGGCATCGATTATCGG	alelos bla _{oxa}	Endimiani et
OXA r	GAGCACTTCTTTTGTGATGGC		
VIM f	TTTGGTCGCATATCGCAACG	alelos bla _{vim}	Endimiani et
VIM r	CCATTCAGCCAGATCGGGCAT		
IMP f	GTTTATGTTCATAWTCG	alelos bla _{imp}	Endimiani et
IMP r	GGTTTAAAYAAAACAACCAC		
AMPC f	ATCAAAACTGGCAGCCG	alelos bla _{ampc}	Endimiani et
AMPC r	GAGCCCGTTTTATGGACCCA		
PSE f	AATGGCAATCAGCGCTTCCC	alelos bla _{pse}	Endimiani et
PSE r	GGGGCTTGATGCTCACTCCA		
DHA f	AACTTTACAGGTGTGCTGGGT	alelos bla _{dha}	Endimiani et
DHA r	CCGTACGCATACTGGCTTTGC		
FOX f	ATGCCAATTTTCATTCACCAC	alelos bla _{fox}	Endimiani et
FOX r	ATKTGGAMGCCTTGAACCTCG		
CTXm f	TTTGCGATGTGCAGTACCAGTAA	alelos bla _{ctxm}	Endimiani et
CTXm r	CGATATCGTTGGTGGTGCCATA		
PER f	ATGAATGTCATTATAAAAAG	alelos bla _{per}	Endimiani et
PER r	TTGGGCTTAGGGCAG		
KPC f	ATGTCACTGTATCGCCGTC	alelos bla _{KC}	Endimiani et
KPC r	TACTGCCCGTTAACGCC		
KPC f seq	ATGCGCTCTATCGGGGATAACC	alelos bla _{KC}	Endimiani et
KPC r seq	ATCGCCGATAGAGCGCATGAAG		

3.9 Análise de DNA cromossômico através de eletroforese de campo pulsado (PFGE)

A tipagem molecular de *K. pneumoniae* foi realizada através da técnica de PFGE descrita por Tenover et al. (1995) modificada. O DNA cromossômico foi preparado pela técnica de lise *in situ*, em blocos de agarose. Em resumo, uma alíquota de 500µL do crescimento bacteriano em fase exponencial foi centrifugada e as células obtidas homogeneizadas em tampão PIV (NaCl 1M; TRIS-HCl 10mM pH 7,6). Foi adicionada à suspensão de células, 500 µL de agarose (2% em tampão PIV) a 60° C e a mistura distribuída em moldes. Os blocos foram, então, transferidos para tubos contendo 4mL de solução de lise (NaCl 1M; TRIS-HCl 6mM pH 7,6; EDTA 100mM pH 8,0; BRIJ-58 0,5%; desoxicolato 0,2%; sarcosina 0,5%) e incubados a 37° C por 18 horas. Em seguida, o tampão de lise foi substituído pelo tampão ESP (EDTA 0,5M pH 8,0; sarcosina 1%) contendo 0,1 mg/mL de proteinase K e os blocos incubados a 50° C por 20 horas. Os blocos foram lavados 4 vezes por dia durante 6 dias com tampão TE (TRIS-HCl 10mM pH 8,0; EDTA 0.1mM pH 8,0) a 37° C e em seguida, incubados com enzima de restrição (normalmente Spe I/ 20U) durante 24 h na temperatura recomendada. Os fragmentos de restrição foram separados em gel de agarose a 1,4% preparado em tampão TBE (TRIS 44,5mM; Ác. bórico 44,5mM; EDTA 1mM pH final 8,3) através da eletroforese de campo pulsado, usando o sistema GENE NAVIGATOR (PHARMACIA - BIOTECH). Após a corrida os géis foram corados com brometo de etídio, observados sob luz ultravioleta e fotografados para análises posteriores.

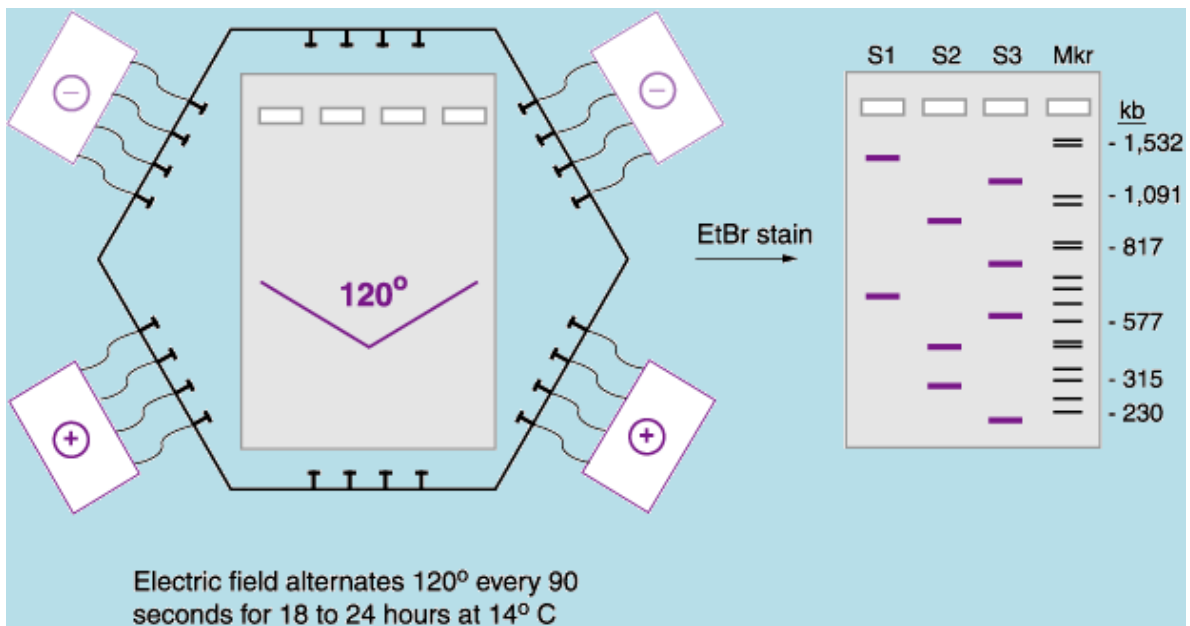


Figura 3.2: **Esquema de eletroforese em gel de campo pulsátil (PFGE).** À esquerda, figura esquemática da cuba onde a eletroforese é realizada, destacando as três direções de migração dos fragmentos gênicos. À direita, uma representação do gel corado após a corrida, mostrando os perfis de macro-restrição de três isolados e o marcador de peso molecular. (Obtida de <http://picasaweb.google.com/lh/photo/aPpkBl6d8tBnB88WCZ2q6g>).

3.10 MLST

Fragmentos internos de sete genes conservados, espaçados ao longo do genoma bacteriano, foram sequenciados e analisados, de acordo com o esquema descrito por Diancourt et al (2005). Cada alelo identificado possui uma sequência nucleotídica única. Dessa forma, cada alelo difere dos outros devido a, no mínimo, uma alteração da sequência nucleotídica. A definição das sequências – tipo (ST) foi realizada no site:

<http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/Kpneumoniae.html>

Os iniciadores utilizados foram os mesmos utilizados por Diancourt et al (2005).

Locus	Putative function of gene	Primer sequence ^{a,c}	Size (bp)	Location ^d
<i>rpoB</i>	Beta-subunit of RNA polymerase B	VIC3: GGC GAA ATG GCW GAG AAC CA	501	4,771,502–4,772,002
<i>gapA</i>	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	VIC2: GAG TCT TCG AAG TTG TAA CC gapA173: TGA AAT ATG ACT CCA CTC ACG G	450	1,347,540–1,347,091
<i>mdh</i>	Malate dehydrogenase	gapA181: CTT CAG AAG CGG CTT TGA TGG CTT mdh130: CCC AAC TCG CTT CAG GTT CAG	477	4,004,045–4,003,569
<i>pgi</i>	Phosphoglucose isomerase	mdh867: CCG TTT TTC CCC AGC AGC AG pgi1F: GAG AAA AAC CTG CCT GTA CTG CTG GC	432	4,831,091–4,831,522
<i>phoE</i>	Phosphoporine E	pgi1R: CGC GCC ACG CTT TAT AGC GGT TAA T pgi2F(seq): CTG CTG GCG CTG ATC GGC AT pgi2R(seq): TTA TAG CGG TTA ATC AGG CCG T phoE604.1: ACC TAC CGC AAC ACC GAC TTC TTC GG phoE604.2: TGA TCA GAA CTG GTA GGT GAT	420	320,309–320,728
<i>infB</i>	Translation initiation factor 2	infB1F: CTC GCT GCT GGA CTA TAT TCG	318	3,937,568–3,937,885
<i>tonB</i>	Periplasmic energy transducer	infB1R: CGC TTT CAG CTC AAG AAC TTC infB2F(seq): ACT AAG GTT GCC TCC GGC GAA GC tonB1F: CTT TAT ACC TCG GTA CAT CAG GTT tonB2R: ATT CGC CGG CTG RGC RGA GAG	414	2,394,251–2,394,664

Figura 3.3: Fragmentos gênicos utilizados no esquema de MLST para *K. pneumoniae*, funções dos genes, sequência dos iniciadores, tamanho do fragmento amplificado e localização no genoma da espécie. (tabela retirada de Diancourt, et al., 2005).

www.pasteur.fr/cgi-bin/genopole/PF8/mlstdbnet.pl?page=allseq&file=krebs_profiles.xml

Gmail: Email do Goo... Bem-vindo ao Face... YouTube - Broadcas... www.brazukas.org/r... Bradesco TV Calendar - Nove... 9GAG - Just for Fun! Make your own LOL...

Single Locus Query	Multiple Locus Query	Single Locus Batch Query
Allelic Profile Query	Batch Profile Query	Sequence Type Query
Download Alleles	Search Database	Database Home

Klebsiella pneumoniae MLST multiple locus query

Results

gapA	Allele 3
infB	Allele 3
mdh	Allele 1
pgi	Allele 1
phoE	Allele 1
rpoB	Allele 1
tonB	Allele 4
Sequence Type	11

Enter sequences (DNA) below using copy and paste:

gapA	AACCTGAAGTGGACGAAGTTGGTGGACGTTGTTGAAAGCAACCGTATCTTCCTGACCGACGAACCGCTCGTAAACACATCACCGCTGCGCGAATAAAGTCTGCTGACTGCCCCCAAAAGACACACTCCGATGTTGTTGCGCGCGCTAAGTTGACGCT	infB	GGCATGATCACCTTCTGGATACCCGGGCGACGCGGTTTACCTCCATGCGTGTCTGCGCGCGACGCGGATATCGTGGTCTGTTGGTGGCGCAGACGCGGTGATGCCGCGACTATCGAAGCTATCCAGCACGCTAAAAGCGCGCAGGTACCGGTGTA
mdh	GGCGCGATGATGCTGATCTCCGCGGGCGTGGCGCTAAGCCCGCAITGGATCGTTCGGACCTGTTAAITGAAATGCGGGTATCGTGAAGAACCTCGTGCAGCAGATTGCCAAAACCTGCCCGCAGGCTGCAATCGGCATTATCACAACCGGTGAATACCGCGTG	pgi	GAGTCCAACGTAAGTATGTTGACCGTAACGGCCACGCGGTAGACTACCAGACTGCGCAATCATCTGGGGTGGCGCGCACCAACGGTCCAGCACGCTTCTACCAGCTGATCCACAGGGCACCAAAATGGTACCGTGGATTTTCATCGCTCCGCTATCACCAGAAC
phoE	GTCGGCACCTCGTTAAGCTATGATTTCCGGCGGACGCGACTTCCCGTCAAGCAGCCATACACCAGCTCCGACCGTACCAACGATCAGAACCTGCTGGCGCGCGCAGGTTCCGAAAAGCGAAGCTGGCGACCGCGCTGAAATATGACGCCAACAAATATCTACTGGCG	rpoB	ACCCACTACGGTCCGCTATGTCGGATCGAAACCGCTGAAGTCCGAACATCGGTTGATTAACCTCCCTGTCGGTGTACGGCGAGCCAAACGAATATGGCTTCCCTGAGACGCGTATCGTAAAGTGACCAACGGTGGTTACTGACGAATTCATACCTGTCTCTATC
tonB	ATGGTGGCGCGCGCATCTTGAGCGCCTCCGGCGCGCAGCGCTGCTGTGGAGCCC GTTGTGAACCGAACCTGAGCGGAGCCAGGTTAGCGCTGAAACCGCGAAGAGGCGCGGTGGTATCCATAAACCGAACCTAAGCCGAAGCCAAACCTAAACCCAG		

Reset Submit

Home PubMLST.org mlstdbNet software User guide

Figura 3.4: Imagem da página do site de MLST para *K. pneumoniae*. Após a comparação das sequências dos sete fragmentos gênicos contra a base de dados, o site mostra o alelo identificado para cada locus gênico

4. RESULTADOS

4. Resultados:

Os resultados das análises realizadas com os isolados clínicos e ambientais são apresentados separadamente e na discussão abordamos alguns aspectos dos dois conjuntos.

4.1. Isolados clínicos

4.1.1 Resistência a antibióticos

A susceptibilidade dos 57 isolados clínicos foi avaliada pelo método de disco-difusão, sendo utilizadas 9 classes de antimicrobianos. Foram observados 26 diferentes perfis de resistência (PR), resultantes da combinação das resistências às classes de antimicrobianos testadas. De acordo com o critério de definição de multirresistência, adotado neste estudo, os perfis de resistência PR-05 a PR-26 correspondem aos multirresistentes (MDR).

A relação dos perfis de resistência observados encontra-se na figura 4.1, e a relação de isolados pertencentes a cada perfil na tabela 4.1.

Dos 57 isolados clínicos, 67% são MDR. Resistência à carbenicilina e à combinação amoxicilina-ácido clavulânico, ambos antibióticos da classe das penicilinas, foi observada em todos os isolados. De modo geral, os isolados mostraram-se mais susceptíveis às carbapenemas, onde nenhum isolado apresentou perfil de resistência ao imipenem.

Dezenove por cento (19%) dos isolados apresentaram resistência ao ertapenem e/ou meropenem. A detecção fenotípica da produção de carbapenemase, através do teste de Hodge modificado, foi realizada para estes isolados. Três isolados, KC-55, KC-56 e KC-57, foram positivos neste teste ou seja, produziram carbapenemases.

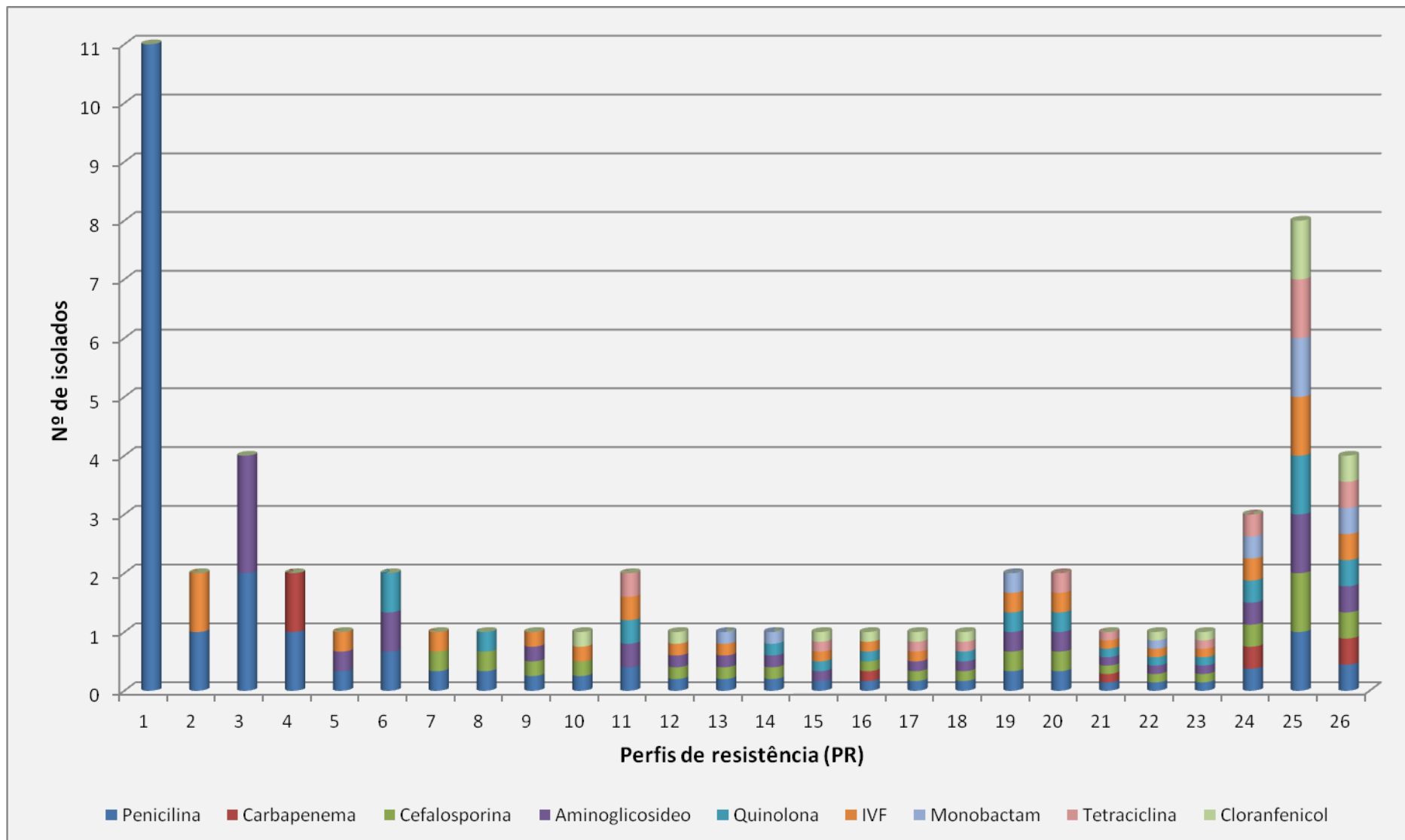


Figura 4.1: Perfis de resistência dos isolados clínicos, segundo a classe de antimicrobianos utilizada. Em ordem numérica, os perfis PR-05 a PR-26 correspondem a MDRs.

Tabela 4.1: Relação de isolados clínicos e seus perfis de resistência

Perfil de Resistência (PR)	Isolados	Resistência a(s) classe(s) de antimicrobiano(s):
PR-01	KC-01, KC-02, KC-03, KC-17, KC-21, KC-33, KC-35, KC-49, KC-50, KC-51, KC-52	Penicilina
PR-02	KC-09, KC-16	Penicilina, IVF
PR-03	KC-04, KC-14, KC-30, KC-53	Penicilina, Aminoglicosídeo
PR-04	KC-11, KC-27	Penicilina, Carbapenema
PR-05	KC-26	Penicilina, Aminoglicosídeo, IVF
PR-06	KC-10, KC-23	Penicilina, Aminoglicosídeo, Quinolona
PR-07	KC-12	Penicilina, Cefalosporina, IVF
PR-08	KC-54	Penicilina, Cefalosporina, Quinolona
PR-09	KC-06	Penicilina, Cefalosporina, Aminoglicosídeo, IVF
PR-10	KC-34	Penicilina, Cefalosporina, IVF, Cloranfenicol
PR-11	KC-45, KC-19	Penicilina, Aminoglicosídeo, Quinolona, IVF, Tetraciclina
PR-12	KC-07	Penicilina, Cefalosporina, Aminoglicosídeo, IVF, Cloranfenicol
PR-13	KC-08	Penicilina, Cefalosporina, Aminoglicosídeo, IVF, Monobactam
PR-14	KC-41	Penicilina, Cefalosporina, Aminoglicosídeo, Quinolona, Monobactam
PR-15	KC-38	Penicilina, Aminoglicosídeo, Quinolona, IVF, Tetraciclina, Cloranfenicol
PR-16	KC-29	Penicilina, Carbapenema, Cefalosporina, Quinolona, IVF, Cloranfenicol
PR-17	KC-05	Penicilina, Cefalosporina, Aminoglicosídeo, IVF, Tetraciclina, Cloranfenicol
PR-18	KC-42	Penicilina, Cefalosporina, Aminoglicosídeo, Quinolona, Tetraciclina, Cloranfenicol
PR-19	KC-36, KC-43	Penicilina, Cefalosporina, Aminoglicosídeo, Quinolona, IVF, Monobactam
PR-20	KC-44, KC-46	Penicilina, Cefalosporina, Aminoglicosídeo, Quinolona, IVF, Tetraciclina
PR-21	KC-13	Penicilina, Carbapenema, Cefalosporina, Aminoglicosídeo, Quinolona, IVF, Tetraciclina,
PR-22	KC-40	Penicilina, Cefalosporina, Aminoglicosídeo, Quinolona, IVF, Monobactam, Cloranfenicol
PR-23	KC-37	Penicilina, Cefalosporina, Aminoglicosídeo, Quinolona, IVF, Tetraciclina, Cloranfenicol
PR-24	KC-22, KC-56, KC-57	Penicilina, Carbapenema, Cefalosporina, Aminoglicosídeo, Quinolona, IVF, Monobactam, Tetraciclina
PR-25	KC-18, KC-24, KC-25, KC-28, KC-31, KC-32, KC-39, KC-47	Penicilina, Cefalosporina, Aminoglicosídeo, Quinolona, IVF, Monobactam, Tetraciclina, Cloranfenicol
PR-26	KC-15, KC-20, KC-55, KC-48	Penicilina, Carbapenema, Cefalosporina, Aminoglicosídeo, Quinolona, IVF, Monobactam, Tetraciclina, Cloranfenicol

A análise dos perfis de resistência obtidos, em relação a origem dos isolados, mostrou a existência de perfis compartilhados entre os estados (Figura 4.2).

Dentre os isolados do estado do Amazonas foram identificados apenas dois perfis, PR-01 e PR-03, nenhum deles multirresistentes. Estes perfis também foram identificados entre os isolados do RJ e do MA.

Para os isolados do estado do Maranhão foram identificados 11 perfis de resistência, sendo dois compartilhados entre os três estados (PR-01 e PR-03), 4 compartilhados apenas com o RJ (PR-02, PR-11, PR-25, PR-26) e 5 perfis únicos do MA (PR-09, PR-12, PR-13, PR-17 e PR-20). Apenas os perfis PR-01, PR-03 e PR-02, identificados em 6 isolados do MA, não correspondem a perfis de multirresistência. Dessa forma, observou-se que a maioria destes isolados são MDR (60%).

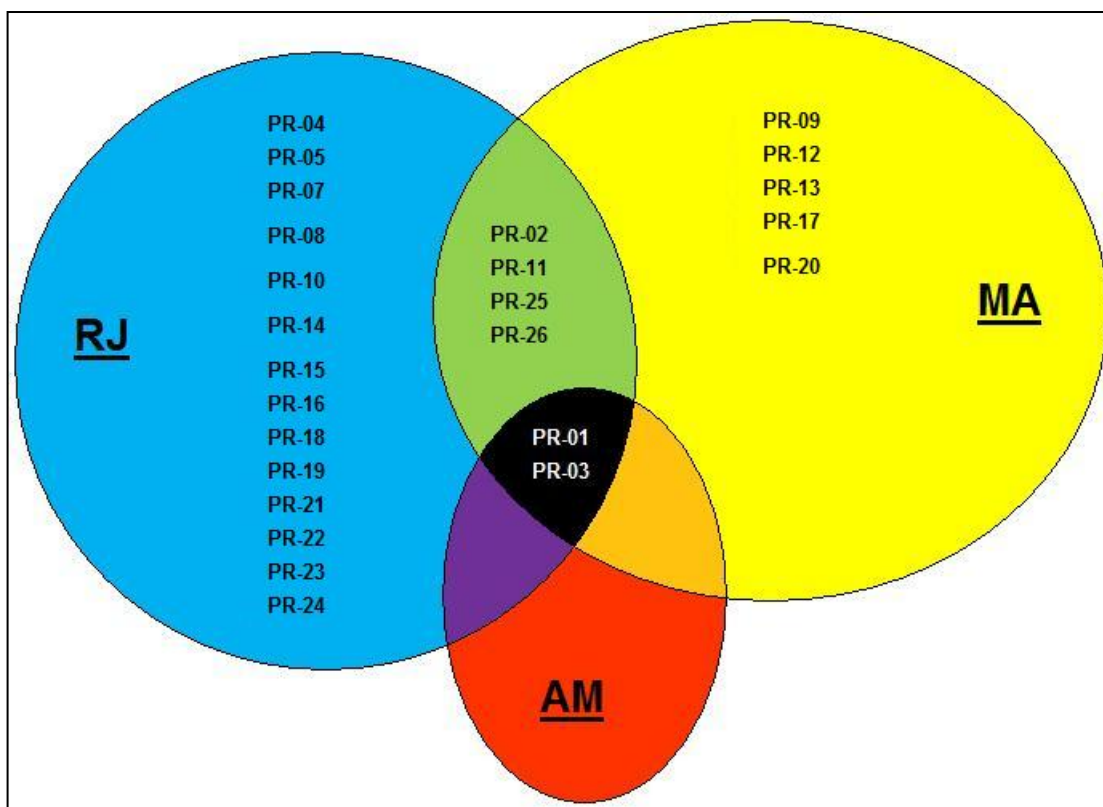


Figura 4.2: Diagrama relacionando os Perfis de Resistência (PRs) identificados em cada estado. Os PRs presentes na intersecção entre círculos são perfis compartilhados entre os estados.

Dentre os isolados do Maranhão, seis foram obtidos no ano 2000 e seis no ano de 2006. A análise temporal dos perfis obtidos para estes isolados mostrou que, de um modo geral, os isolados de 2000 não são multirresistentes, enquanto os isolados de 2006 são MDR. Resistência às classes de carbapenemas, quinolonas e ao aztreonam só foi identificada em isolados de 2006. PR-01 foi o único perfil identificado em ambos os anos, demonstrando a permanência de isolados não-MDR, resistentes apenas à classe das penicilinas, em ambiente hospitalar. O gráfico da figura 4.3 mostra a prevalência das resistências a cada classe de antimicrobianos, nos anos de 2000 e 2006.

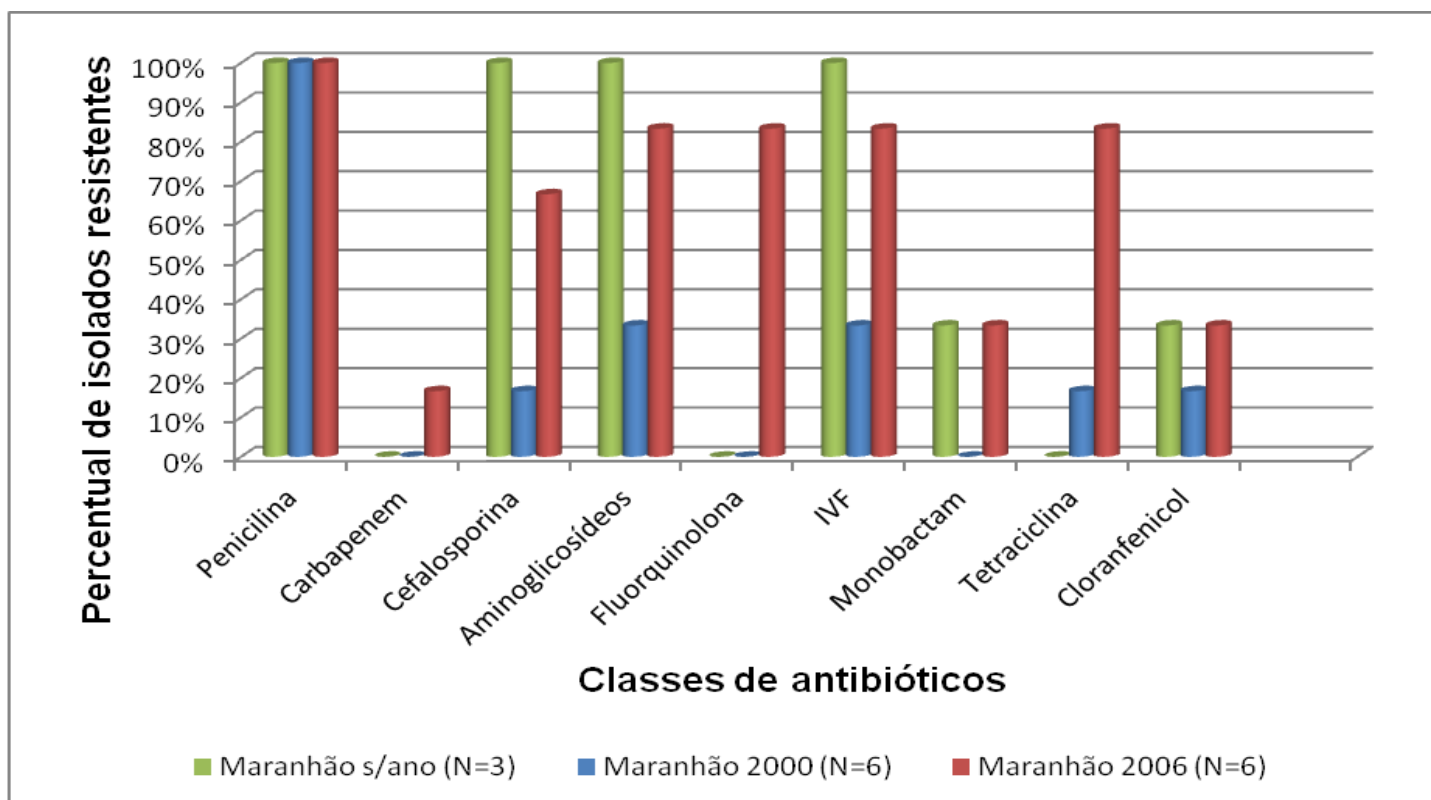


Figura 4.3: Prevalência das resistências a cada classe de antibióticos, por ano de isolamento, de isolados do MA

Os isolados do RJ apresentaram o maior número de perfis de resistência. Dos 26 PRs identificados nos isolados clínicos, 21 PRs foram observados nos isolados do RJ, sendo 14 únicos deste estado. Dentre estes perfis, apenas PR-01, PR-02, PR-03 e PR-04, identificados em nove isolados, não são MDR. Os outros 17 PRs correspondem a MDRs. Estes isolados foram obtidos em, 2005 (26 isolados), 2006 (7 isolados) e 2010 (4 isolados). O gráfico abaixo (figura 4.4) mostra a prevalência dos PRs, nos anos de 2005, 2006 e 2010.

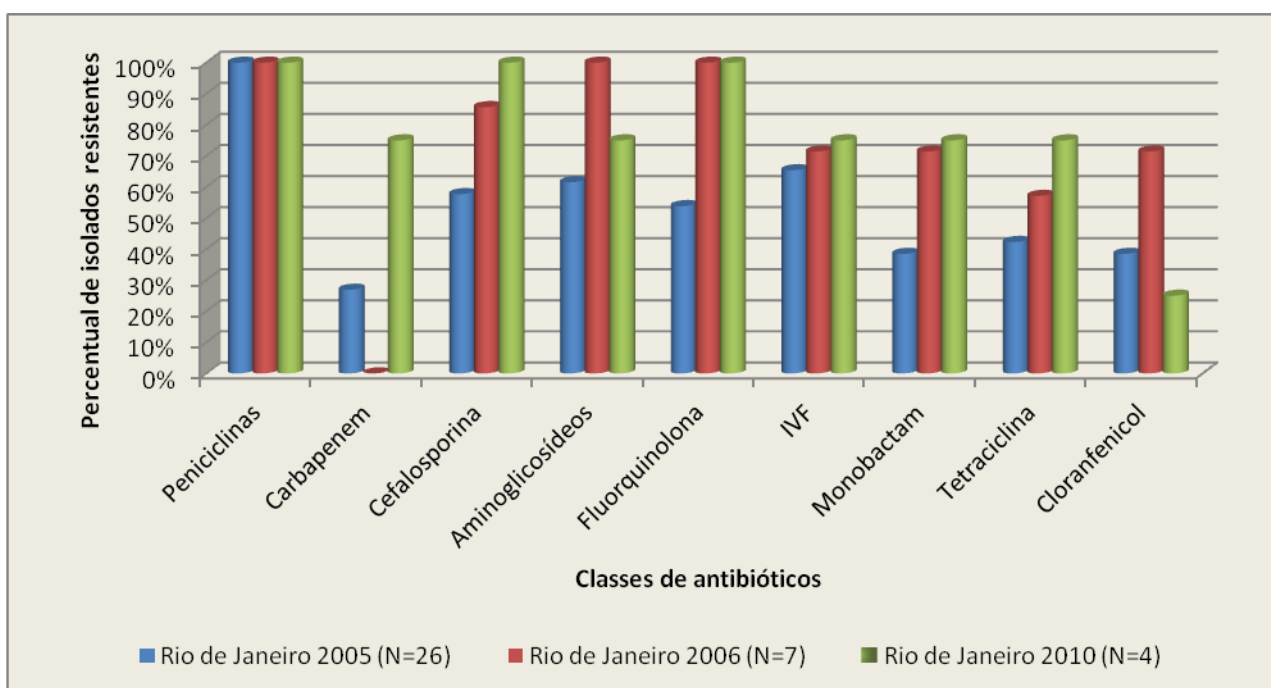


Figura 4.4: Prevalência das resistências a cada classe de antibióticos, por ano de isolamento, dos isolados do RJ.

Quatro gerações de cefalosporinas foram testadas no teste de disco-difusão. Analisando os resultados referentes a cada geração, observou-se que, de modo geral, os isolados do RJ mostraram-se menos susceptíveis a essa classe, em comparação aos isolados do MA. Nenhum isolado do AM de origem clínica apresentou resistência a qualquer uma das cefalosporinas testadas. . A figura 4.5 mostra os percentuais de resistência as diferentes gerações de cefalosporinas, observados para os isolados do RJ e do MA

Os isolados do ano 2000 do MA mostraram-se resistentes apenas a cefalotina, enquanto os isolados do ano 2006 do mesmo estado apresentaram resistência as quatro gerações testadas. Cefalotina e ceftaxima foram os antibióticos com maior percentual de resistência para os isolados de 2006 (67% e 50% respectivamente). Os três isolados do MA sem informação de ano apresentaram resistência apenas a cefalotina (100%) e a ceftazidime (33%).

Resistência as quatro gerações de cefalosporina testadas foi observada para os isolados do RJ obtidos de 2005, 2006 e 2010. Cefalotina apresentou o maior percentual de resistência para isolados de 2005 (54%) e 2006 (86%) deste estado. Os isolados do ano de 2010 apresentaram maior percentual de resistência a cefepime (100%), o que sugere um maior percentual de isolados ESBL presentes em anos mais recentes .

Analisando os percentuais de resistência a cada geração, é possível observar valores semelhantes de resistência para cefepime e ceftriaxona, em isolados obtidos no mesmo ano e estado.

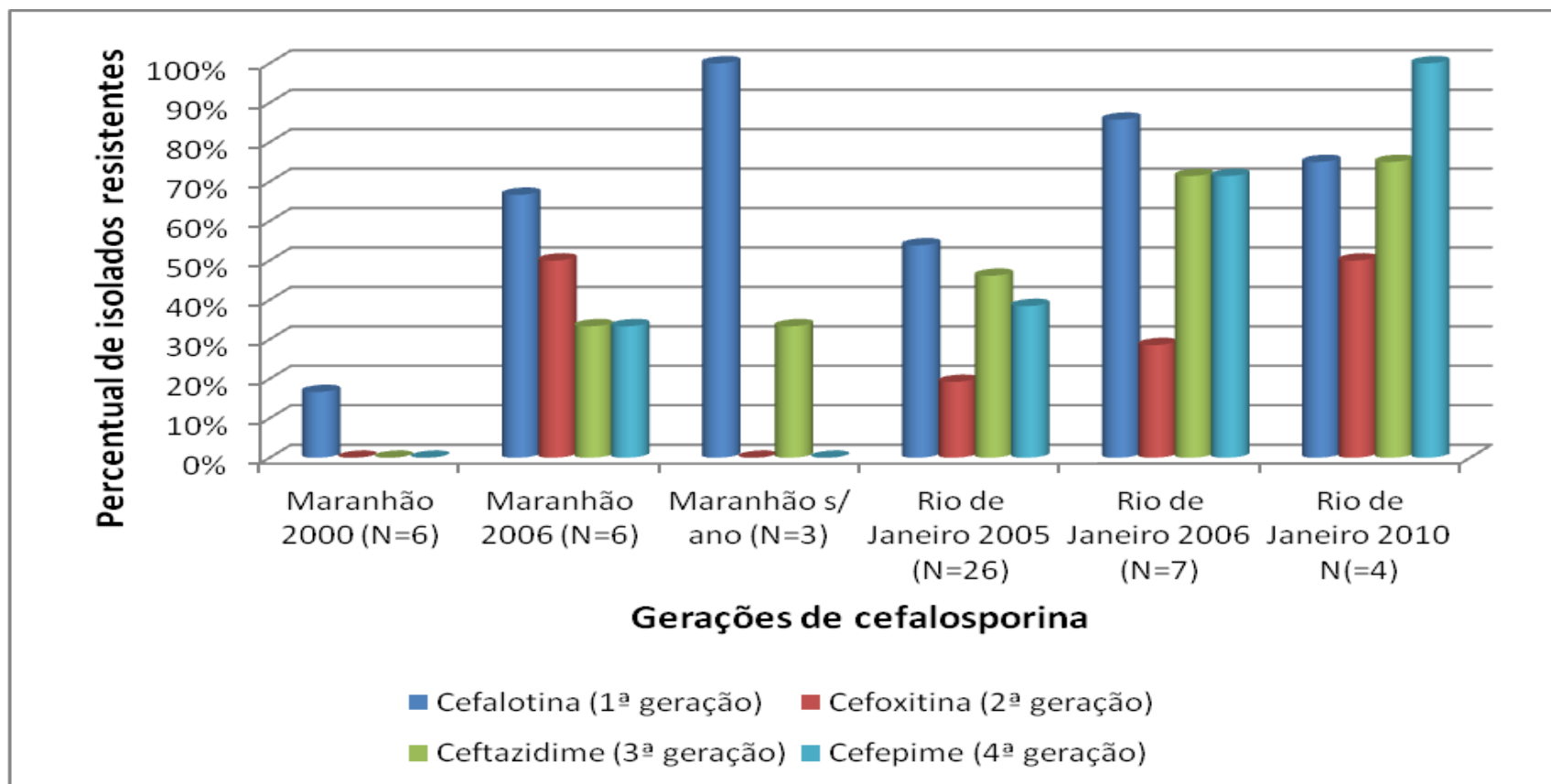


Figura 4.5: Prevalência de resistência a cada geração de cefalosporina dos isolados do RJ e do MA.

4.1.2 Diversidade Genética

A diversidade genética dos isolados foi determinada pelo perfil alélico de 07 genes do genoma básico da *K. pneumoniae* aplicando a técnica de MLST. Dentre os 57 isolados clínicos foram caracterizadas 32 sequências-tipo (ST), sendo 19 STs conhecidas e 13 STs novas, ou seja, que apresentavam um alelo novo ou uma nova combinação de alelos. As STs novas foram identificadas por letra.

Até o momento, 688 STs diferentes já foram caracterizados e estão no banco de dados de MLST para *K. pneumoniae* (<http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/Kpneumoniae.html>).

A identificação de 13 STs novas, em nossa amostra, mostra a heterogeneidade e/ou a pouca representatividade do banco de dados, em relação a esta espécie. O perfil alélico de nossos isolados está na tabela 4.2.

A correlação entre os resultados de MLST e a localização geográfica (estado da federação) de onde os isolados foram obtidos mostrou que não temos uma ST epidêmica no país ou seja, as STs estão circulando regionalmente. No entanto mesmas STs foram identificadas circulando em ambientes hospitalares, em diferentes anos, no estado do RJ, o que indica a persistência de STs nestes ambientes. Isolados das ST-11, ST-16 e ST-327 foram identificados nos anos de 2005 e 2006. Isolados com a nova ST-A foram identificados em 2005, 2006 e 2010, o que sugere a persistência deste ST, pelo menos há cinco anos, em ambiente hospitalar do RJ. Isolados que possuem a mesma ST no MA só foram identificados no ano de 2006 (Tabela 4.3).

Tabela 4.2: Perfis de alelos que definem as sequências-tipo (ST) identificadas nos isolados clínicos.

ST	gapA	infB	mdh	pgi	phoE	rpoB	tonB	Nº de isolados
15	1	1	1	1	1	1	1	01
M	1	1	1	1	1	1	*	01
Q	1	1	1	1	1	17	1	01
16	2	1	2	1	4	4	4	04
23	2	1	1	1	9	4	12	01
37	2	9	2	1	13	1	16	02
423	2	9	2	65	13	1	16	03
129	2	20	23	1	1	1	19	02
200	2	1	2	1	12	1	68	01
244	2	5	1	1	1	1	24	01
299	2	10	1	1	56	24	31	01
327	2	1	1	1	10	1	19	02
502	2	53	3	1	10	4	18	01
E	2	1	1	1	1	7	4	01
G	2	1	11	1	10	10	35	01
R	2	1	1	8	10	4	61	01
11	3	3	1	1	1	1	4	08
437	3	3	1	1	1	1	31	03
B	3	3	1	1	1	1	26	03
W	3	1	1	1	3	*	1	01
A	4	1	1	1	7	1	22	04
D	4	5	*	1	9	1	25	02
86	9	4	2	1	1	1	27	01
442	10	20	2	1	9	11	14	01
H	10	7	2	2	3	*	4	01
347	16	24	21	27	47	22	67	01
360	16	24	21	53	47	17	67	02
J	16	24	*	27	47	22	*	01
F	18	22	26	61	*f	20	*	01
I	18	22	26	*	*	*	99	01
528	32	5	1	1	9	4	18	01
664	52	1	20	2	1	1	47	01
Nº alelos	13	11	11	09	13	13	24	

* alelo novo

Dentre as STs identificadas, foi observada a presença de STs pertencentes a um mesmo complexo clonal, ou seja, que apresentavam pelo menos 6 dos sete alelos idênticos. Os recursos do site para análises de dados de MLST (<http://pubmlst.org>) permitiu que os perfis alélicos fossem agrupados na figura 4.5. Três complexos clonais foram identificados. O complexo clonal 11 (cc11), contém as STs 11 e 437 e a ST pandêmica 258. Todos os isolados pertencentes a essas STs são oriundos de hospitais do estado do Rio de Janeiro. A nova ST, denominada ST-B, identificada em três isolados do Ma, do ano de 2006, também faz parte deste complexo, pois é variante de locus único da ST-11. Outro complexo clonal reúne as STs 37 e 423, com amostras do RJ, isoladas em 2005, e amostras do Ma, isoladas em 2006, respectivamente. Três isolados de 2005 do RJ (ST-15, ST-M e ST-Q) também constituem um mesmo complexo clonal. A identificação de STs do mesmo complexo em estados de diferentes regiões sugere um padrão epidêmico no país.

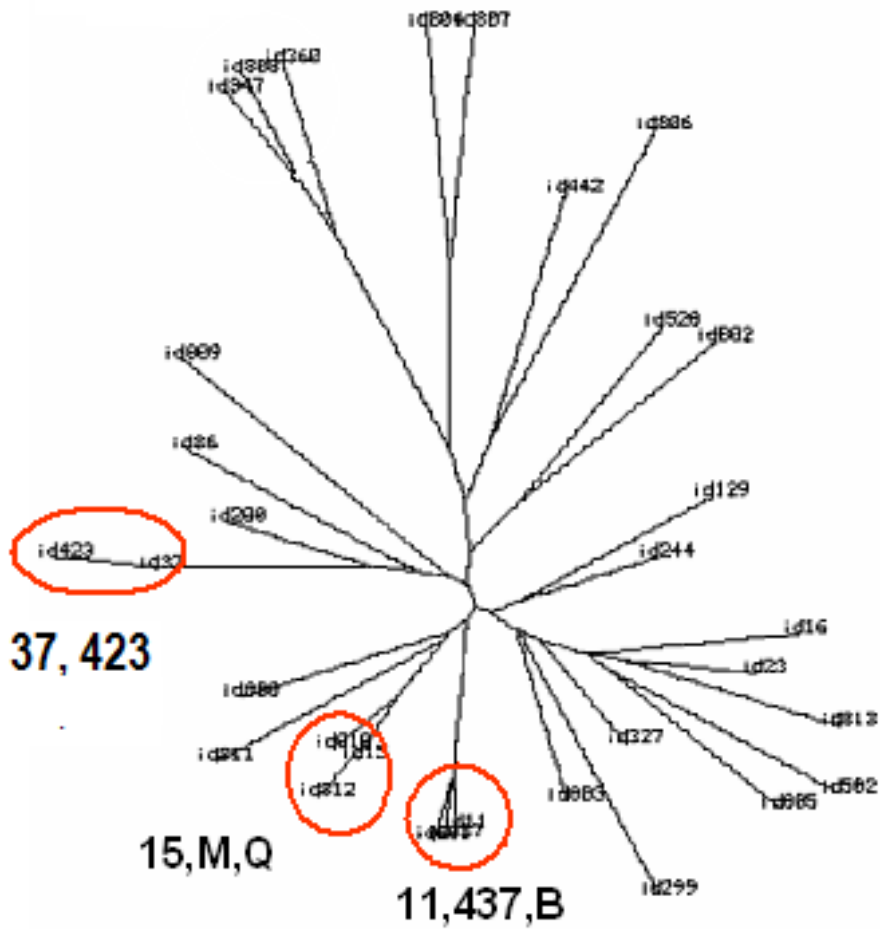


Figura 4.6: Agrupamento das amostras pertencentes aos complexos clonais, utilizando Minimum Spanning Tree algorithm. STs B e 423 ocorrem no Maranhão, os demais no Rio de Janeiro.

Tabela 4.3: Sequências-tipo (ST) identificadas nos isolados clínicos, separadas por estado e ano de isolamento.

MLST	Origem do	Ano de isolamento
200	AM	***
347	AM	***
360	AM	***
23	Ma	2000
299	Ma	2000
E	Ma	2000
F	Ma	2000
I	Ma	2000
423	Ma	2006
B	Ma	2006
244	Ma	***
G	Ma	***
H	Ma	***
11	RJ	2005
11	RJ	2006
15	RJ	2005
16	RJ	2005
16	RJ	2006
37	RJ	2005
129	RJ	2005
327	RJ	2005
327	RJ	2006
437	RJ	2010
442	RJ	2005
502	RJ	2005
528	RJ	2005
664	RJ	2005
A	RJ	2005
A	RJ	2006
A	RJ	2010
D	RJ	2005
J	RJ	2005
M	RJ	2005
Q	RJ	2005
R	RJ	2005
W	RJ	2005

A distribuição mundial das STs identificadas neste estudo foi analisada utilizando as informações presentes no banco de dados do MLST, e mostrou a existência de STs pandêmicos, identificados em países das Américas, Europa, África e Ásia. São elas: ST11, ST23, ST37, ST423 e ST437. As STs 23 e 37 ainda não haviam sido descritas no Brasil. Dessa forma, este é o primeiro relato da presença destas STs pandêmicas no Brasil. Dezesete isolados foram identificados como pertencentes a STs pandêmicas (Tabela 4.5).

Tabela 4.4: Sequências-tipo com distribuição global e regiões onde já foram identificadas.

MLST (ST)	Nº de isolados identificados neste estudo	Países com ocorrência
11	8	Brasil, China, Coréia, Espanha, França, Grécia, Holanda, Hungria, República Tcheca, Índia
23	1	Bélgica, Cingapura, Espanha, França, Holanda, Indonésia, Taiwan
37	2	África, Alemanha, Coréia, Espanha, EUA, Filipinas, Itália
423	3	África, Brasil, Espanha, Filipinas
437	3	Brasil, Indonésia, Noruega

Os isolados de ST idênticas foram analisados por PFGE, para determinar a clonalidade dos mesmos. Foram identificados 29 diferentes perfis de macro-restrição pela técnica de PFGE. Entre isolados de mesma ST observou-se perfis de macro-restrição clonais ou relacionados, mas também perfis não relacionados (Tabela 4.4).

Tabela 4.5: Resultados de MLST e PFGE dos isolados clínicos

Isolado	Origem	MLST	PFGE	Isolado	Origem	MLST	PFGE
KC-45	Ma	423	N	KC-17	RJ	16	D
KC-48	Ma	423	N1	KC-23	RJ	16	E
KC-49	Ma	423	N	KC-31	RJ	16	F1
KC-50	AM	360	M1	KC-38	RJ	16	F
KC-51	AM	360	M	KC-12	RJ	37	G
KC-44	Ma	B	S	KC-21	RJ	37	H
KC-46	Ma	B	R	KC-26	RJ	129	I
KC-47	Ma	B	R1	KC-27	RJ	129	J
KC-15	RJ	11	A	KC-32	RJ	327	K
KC-18	RJ	11	A2	KC-42	RJ	327	L
KC-24	RJ	11	A	KC-55	RJ	437	O
KC-25	RJ	11	B	KC-56	RJ	437	P
KC-28	RJ	11	C	KC-57	RJ	437	P1
KC-37	RJ	11	A	KC-36	RJ	A	Q
KC-39	RJ	11	A1	KC-41	RJ	A	Q1
KC-40	RJ	11	A	KC-43	RJ	A	Q
KC-34	RJ	D	T	KC-54	RJ	A	Q2
KC-35	RJ	D	T1				

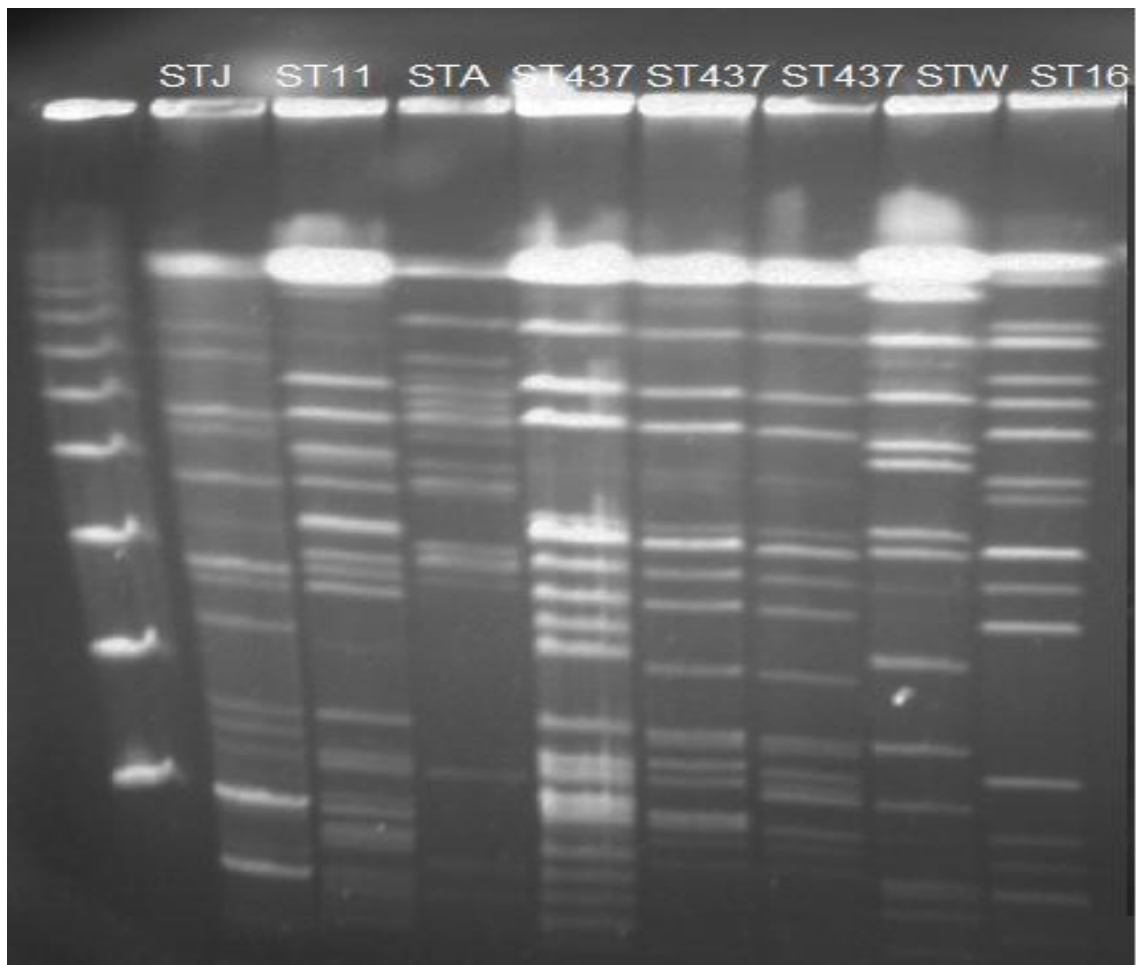


Figura 4.7: Perfis de macro-restrição obtidos no PFGE, utilizando a enzima XbA. Perfis de macro-restrição clonais possuem até três bandas de diferença. Isolados com perfis de macro-restrição clonais pertencem a mesma sequência-tipo(ST), identificada na foto.

4.1.3 Identificação de elementos genéticos relacionados a resistência

4.1.3.1 Presença de integrons

A pesquisa pela presença de integron de classe 1 e 2 foi realizada através da PCR. Quatorze (14) isolados apresentaram resultados positivos para a presença da integrase de classe 1. Gene da integrase de classe 2 não foi detectado em nenhum isolado.

4.1.3.2 Detecção e caracterização de cassetes gênicos associados a integrons

A presença de cassetes gênicos associados aos integrons de classe 1, foi determinada pela amplificação da região variável onde os cassetes estão inseridos. Dos 14 isolados positivos para integrase de classe 1, 11 (78,6%) foram positivos para a presença de cassetes gênicos. Os amplicons correspondentes apresentaram tamanhos que variavam entre 450 a 800 pb.

O sequenciamento dos amplicons INF-INB foi realizado, para verificar os cassetes gênicos presentes nestes isolados. Cinco cassetes gênicos distintos foram identificados, incluindo genes que conferem resistência aos aminoglicosídeos e ao trimetoprim.

Seis isolados apresentaram um mesmo arranjo gênico, composto por um cassete de 400pb, denominado *aac(6')-Ib* seguido de uma *orf* de 350 pb. Essa 6'-N-adenililtransferase está associada à resistência aos aminoglicosídeos (gentamicina, tobramicina, amicacina) (Shaw et al. 1993; Centrón and Roy 1998). Nenhuma identidade relevante foi atribuída à *orf* encontrada, indicando tratar-se de uma nova *orf* denominada *orf1*. Um segundo arranjo gênico, semelhante a este, foi identificado em um isolado, no entanto, o cassete de resistência aos aminoglicosídeos era o alelo *aac(6')-Iq*, descrito pela primeira vez em um isolado de *K. pneumoniae* multirresistente na Argentina (Centrón and Roy 1998).

Outro cassete conferindo resistência aos aminoglicosídeos também foi identificado em dois isolados: uma nucleotidiltransferase denominada *aadA2*, de aproximadamente 800pb.

Três isolados apresentaram um integron possuindo um cassete de 500pb, o qual confere resistência a trimetoprim. KC-55 e KC-56 apresentavam o alelo *dfrA-30* e o isolado KC-39 o alelo *dfrA-25*.

A tabela 4.6 resume os resultados apresentados para os dezessete isolados de STs pandêmicas.

4.1.3.3 Pesquisa por genes de resistência a β -lactâmicos

Dezessete isolados apresentaram resistência a pelo menos uma classe de β -lactâmicos. Para investigar se esta resistência estava associada a presença de genes de β -lactamases, reações de PCR foram realizadas tendo como alvo os vários genes *bla*.

Todos os isolados foram positivos para a presença dos genes *bla_{SHV}* e *bla_{TEM}*. Três isolados apresentaram reação positiva para a presença do gene *bla_{KPC}*. Os genes *bla_{DHA}*, *bla_{OXA}*, e *bla_{CTX}* foram identificados em um isolado, cada.

4.1.4 Associação de resistência a presença de integron

Foi observada relação entre a resistência dos isolados e os cassetes gênicos presentes nos integrons identificados nos mesmos.

Os sete isolados carreando integrons de classe 1 com os cassetes gênicos *aac(6')-Iq*, *aac(6')-Ib* apresentaram fenótipo de resistência a gentamicina, kanamicina e tobramicina. Da mesma forma, os dois isolados carreando os genes *dfrA-25* *dfrA-30* apresentaram resistência ao trimetoprim. KC-45 e KC-57, que possuem o cassete *aadA2*, não apresentaram perfil de susceptibilidade à estreptomicina, apesar de serem resistentes a outros antibióticos da classe dos aminoglicosídeos.

4.1.5 Associação de fenótipo de resistência e presença de genes de resistência

De modo geral, houve correlação entre o fenótipo de resistência aos β -lactâmicos e a presença dos genes identificados. Todos os isolados foram resistentes à classe das penicilinas, que estaria associado à presença do gene *bla*_{SHV} com os alelos 11 (16 isolados) e 36 (1 isolado), que é constitutivo de *K. pneumoniae*, ou do gene *bla*_{TEM}, que também confere resistência às penicilinas. O gene *bla*_{SHV-11} confere resistência às penicilinas e cefalosporinas de espectro restrito, enquanto o alelo 36 codifica uma enzima ESBL, conferindo resistência às penicilinas, cefalosporinas de amplo espectro e ao aztreonam. Com exceção de quatro isolados, resistência às cefalosporinas foi observada em todos os isolados.

Os genes *bla*_{DHA-1} e *bla*_{OXA-3} foram identificados no isolado KC-39. O primeiro confere resistência às cefalosporinas, e o segundo à oxacilina e carbenicilina. Fenótipo de resistência à carbenicilina, cefalotina, cefoxitina e ceftazidime foi observado neste isolado.

O gene *bla*_{CTX-M-2}, que confere resistência às cefalosporinas de espectro estendido e ao aztreonam, foi encontrado no isolado KC-45. No entanto, esse isolado apresenta susceptibilidade a estas duas classes de antibióticos.

O gene *bla*_{KPC-2} foi identificado em KC-55, KC-56 e KC-57. Este gene confere fenótipo de resistência às carbapenemas, penicilinas, cefalosporinas e ao aztreonam, e foi observada nos três isolados.

Tabela 4.6: Características fenotípicas e genotípicas dos isolados de STs pandêmicos.

Isolado	Int1	VR1	Genes de Resistência	Perfil de Resistência	MLST	PFGE
KC-15	+	aac(6)-Iq, orf-1	SHV-11, TEM-1	MDR	11	A
KC-24	+	aac(6)-Ib, orf-1	SHV-11, TEM-1	MDR	11	A
KC-25	+	aac(6)-Ib, orf-1	SHV-11, TEM-1	MDR	11	A
KC-37	+	aac(6)-Ib, orf-1	SHV-11, TEM-1	MDR	11	A
KC-40	+	aac(6)-Ib, orf-1	SHV-11, TEM-1	MDR	11	A
KC-39	+	dfrA25	SHV-11, TEM-1, DHA-1, OXA-3	MDR	11	A1
KC-18	-	-	SHV-11, TEM-15	MDR	11	A2
KC-28	+	aac(6)-Ib, orf-1	SHV-11, TEM-1	MDR	11	B
KC-04	-	-	SHV-11, TEM-1	NÃO-MDR	23	C
KC-12	+	-	SHV-36, TEM-1	MDR	37	G
KC-21	-	-	SHV-11, TEM-1	NÃO-MDR	37	H
KC-48	+	-	SHV-11, TEM-1	MDR	423	N
KC-49	+	-	SHV-11, TEM-1	NÃO-MDR	423	N1
KC-45	+	aadA2	SHV-11, TEM-1, CTX-M-2	MDR	423	N2
KC-55	+	aac(6)-Ib, orf-1, dfrA30	SHV-11, TEM-1, KPC-2	MDR	437	O
KC-56	+	dfrA30	SHV-11, TEM-1, KPC-2	MDR	437	P
KC-57	+	aadA2	SHV-11, TEM-1, KPC-2	MDR	437	P1

Int1- integrase de classe 1

VR1- região variável do integron de classe 1

MDR- multirresistente

4.1.6 Correlação entre os isolados clonais no PFGE

Dentre os oito isolados pertencentes ao ST11, cinco apresentaram perfil idêntico através da técnica de PFGE. A análise da região variável dos integrons encontrados nestes isolados revelou a presença do arranjo *aac(6')-lb-orf-1* em quatro isolados e do arranjo *aac(6')-lq-orf-1* em um quinto isolado. O perfil de resistência aos antibióticos destes isolados também foi semelhante, concordando com os resultados de PFGE, que mostra a clonalidade entre esses isolados. Observando o ano de seu isolamento, foi constatado que esses clones estavam presentes em dois anos distintos, 2005 (KC-15, KC-24 e KC-25) e 2006 (KC-37 e KC-40).

Os isolados KC-12 e KC-21, pertencentes ao ST-37, apresentaram perfis distintos de macro-restrição. Seus perfis de resistência aos antibióticos concordam com estes resultados, visto que KC-21 foi resistente apenas a penicilinas, enquanto KC-12 foi resistente às penicilinas, às cefalosporinas e à combinação sulfametoxazol-trimetoprim. O gene SHV-36 foi identificado em KC-12, enquanto o alelo SHV de KC-21 não era codificante de uma enzima ESBL.

Dos três isolados pertencentes ao ST-437, KC-56 e KC-57 apresentaram perfis relacionados de macro-restrição. Seus perfis de resistência foram o mesmo (PR-24). KC-55 apresentou o PR-26. Os três isolados foram positivos para a presença de integron de classe 1, mas carregavam cassetes distintos. Esses três isolados apresentaram resistência às carbapenemas e apresentaram resultado positivo no teste de Hodge modificado. A identificação do gene KC-2 nestes isolados corrobora estes resultados. KC-55 apresentava dois integrons de classe 1, e um deles possuía o mesmo arranjo encontrado nos isolados KC-25, KC-37 e KC-40 (ST-11), o que poderia indicar a transferência lateral deste integron entre isolados diferentes. Interessantemente, estes isolados pertencem ao mesmo complexo clonal.

Os isolados KC-45, KC-48 e KC-49, pertencentes ao ST423, apresentaram perfis relacionados pela técnica de PFGE. Diferenças de 2

bandas entre os perfis foram observadas. KC-45 e KC-49 apresentaram resultados positivos para a integrase de classe 1, no entanto, apenas KC-45 foi positiva para a reação de amplificação da região variável. Este isolado apresentava o cassete *aadA2*. Os perfis de resistência aos antibióticos foram distintos entre estes isolados.

A transferência lateral de genes poderia explicar perfis de macro-restrição distintos entre isolados de mesma ST, pois a técnica de PFGE é mais discriminatória e avalia a clonalidade entre isolados baseando-se no perfil de macro-restrição de todo o genoma contido em um microorganismo, incluindo plasmídeos e integrons.

4.2. Isolados ambientais

4.2.1 Resistência a antibióticos

A susceptibilidade dos 19 isolados ambientais foi avaliada e foram observados 7 diferentes perfis de resistência (PR), em relação às classes de antimicrobianos testadas. Os isolados com perfis de resistência PR-05 a PR07 são multirresistentes (MDR).

A relação dos perfis de resistência observados se encontra na figura 4.7, e a relação de isolados pertencentes a cada perfil na tabela 4.7.

Dos 19 isolados ambientais testados, quatro apresentaram perfil de multirresistência a antibióticos. Todos os isolados apresentaram resistência à combinação amoxicilina-ácido clavulânico e dezoito isolados também apresentaram perfil de resistência à carbenicilina e à ampicilina. Nenhum isolado apresentou resistência às carbapenemas e à cefoxitina.

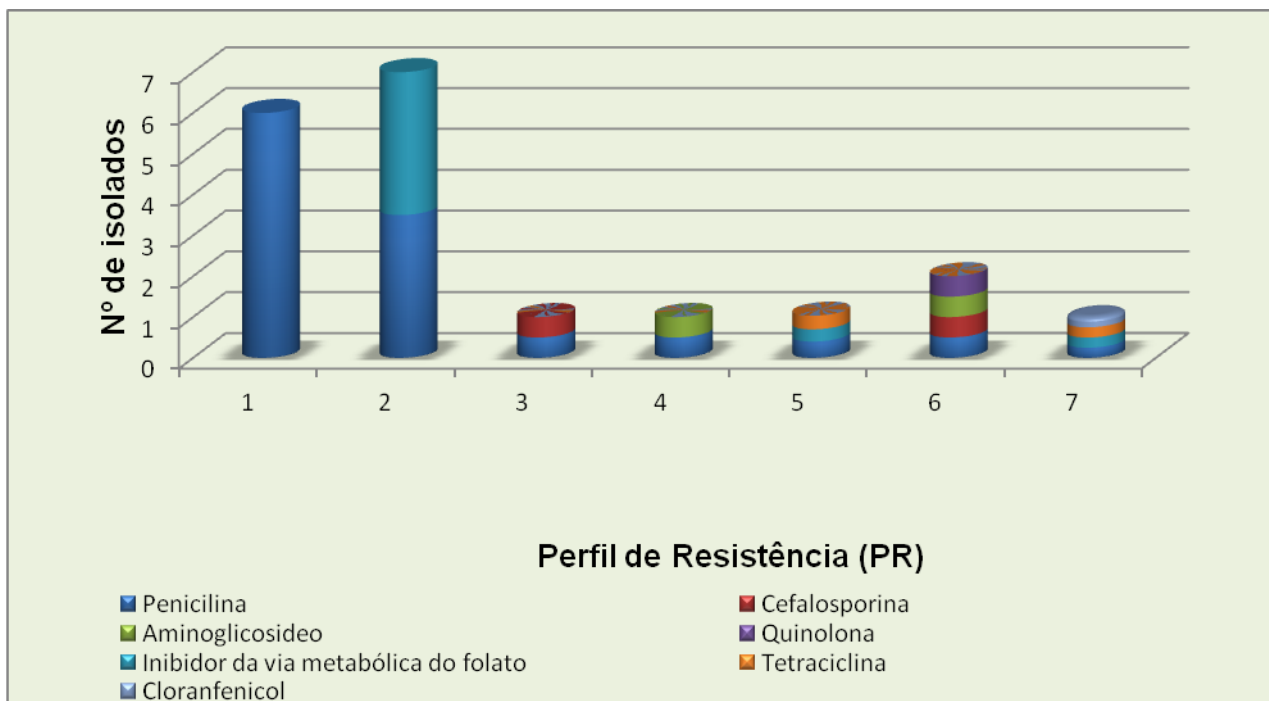


Figura 4.8: Perfis de resistência de isolados ambientais, segundo a classe de antimicrobianos utilizada. Em ordem numérica, os perfis PR-05, PR-06 e PR-07 correspondem a perfis de multirresistência.

Tabela 4.7: Relação dos isolados ambientais e seus perfis de resistência

Perfil de Resistência (PR)	Isolado	Resistência a(s) classe(s) de antimicrobiano(s):
PR-01	KE-01, KE-08, KE-10, KE-11, KE-16, KE-19	Penicilina
PR-02	KE-04, KE-05, KE-06, KE-07, KE-12, KE-17, KE-18	Penicilina, IVF
PR-03	KE-14	Penicilina, Cefalosporina
PR-04	KE-03	Penicilina, Aminoglicosídeo
PR-05	KE-09	Penicilina, IVF, Tetraciclina
PR-06	KE-13, KE-15	Penicilina, Cefalosporina, Aminoglicosídeo, Quinolona
PR-07	KE-02	Penicilina, IVF, Tetraciclina, Cloranfenicol

Os isolados ambientais foram obtidos de dois estados brasileiros, Amazonas (13 isolados) e Pará (6 isolados). A análise dos perfis obtidos, em relação a origem dos isolados, mostrou a existência de perfis de resistência compartilhados entre os estados. A figura 4.8 mostra um diagrama com os perfis identificados, relacionando os estados onde foram identificados.

Os isolados do AM apresentaram-se mais resistentes que os isolados do PA, com três dos quatro isolados MDR. Resistência às classes de cefalosporinas, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas foi observada apenas em isolados do AM da mesma forma que resistência à piperacilina e à combinação ticarcilina-ácido clavulânico. Dos 7 perfis de resistência identificados nos isolados ambientais, 6 eram do AM. Em relação a estes perfis, é possível subdividir os isolados ambientais em três grupos. O primeiro, de 5 isolados, resistentes apenas às penicilinas, o segundo, de 4 isolados, com resistência às cefalosporinas, aos aminoglicosídeos e às fluoroquinolonas, e um terceiro grupo, de 4 isolados, que apresentou resistência à classe de inibidores da via metabólica do folato.

Para os isolados do PA foram identificados três diferentes perfis de resistência, PR-01 e PR-02, compartilhados com isolados do AM, e PR-05, perfil exclusivo de um isolado do PA, o único isolado MDR deste grupo. Com exceção de um isolado, resistência aos inibidores da via metabólica do folato foi observada nos isolados deste estado.

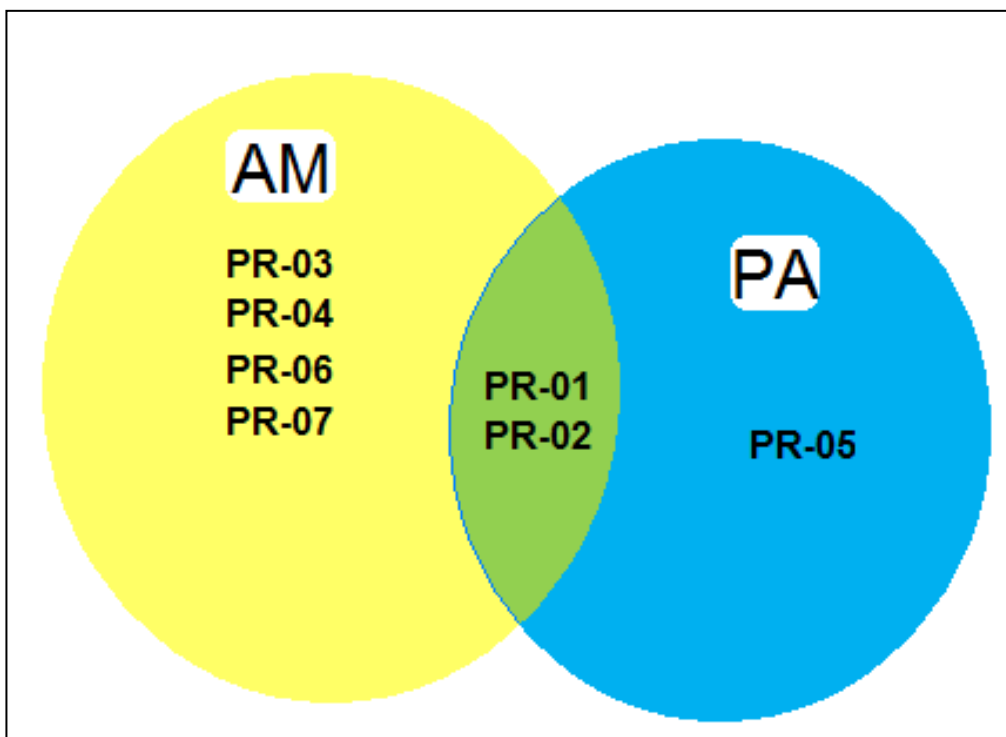


Figura 4.9: Diagrama relacionando os Perfis de Resistência (PRs) identificados em cada estado. Os PRs presentes na intersecção entre círculos indica os perfis compartilhados entre as diferentes regiões.

4.2.2 Presença de elementos genéticos associados a resistência

Pesquisou-se a presença das integrases de classe 1 e 2 para os isolados ambientais. Nenhum isolado apresentou resultado positivo para a presença de integrase de classe 1. Foi detectada a presença de integrase de classe 2 em 2 isolados para os quais foi realizada a amplificação da região variável do integron de classe 2. O isolado KE-12 apresentou a região variável do integron vazia, ou seja, sem a presença de cassetes gênicos, e o isolado KE-13 apresentou dois cassetes, *sat* e *aadA*, que conferem resistência à estreptomicina e aos aminoglicosídeos, respectivamente.

A pesquisa pela presença de genes de resistência também foi realizada para os isolados MDR. Resultado positivo apenas para o gene *bla_{SHV}* foi obtido em todos os isolados. Este gene confere resistência às penicilinas, cujo fenótipo foi observado no antibiograma.

A tabela abaixo (4.8) lista os resultados obtidos para a pesquisa de genes de resistência nos isolados MDR.

Tabela 4.8: Resultados da pesquisa por elementos genéticos associados a resistência nos isolados ambientais multirresistentes

Isolado	Perfil de resistência (classes)	Integron de classe 1	Integron de classe 2	VR2	Genes de Resistência
KE-02	Penicilina, IVF, tetraciclina, cloranfenicol	-	-	-	SHV
KE-09	Penicilina, IVF, tetraciclina	-	-	-	SHV
KE-13	Penicilina, aminoglicosídeo, quinolona, cefalosporina	-	+	sat-2, aadA1	SHV, TEM
KE-15	Penicilinas	-	-	-	SHV

VR2- região variável do integron de classe 2

4.2.3 Diversidade Genética

Os 19 isolados ambientais foram analisados pela técnica de MLST. Foram identificadas 13 sequências-tipo (ST) para os isolados ambientais, sendo 2 STs conhecidas e 11 STs novas. A presença de STs novas em 89,5% destes isolados aponta para a diversidade da espécie no ambiente. O novo ST-C, identificado em dois isolados do AM, é uma variante de locus único do ST244, pertencendo ao mesmo complexo clonal deste. Este ST foi identificado em um isolado clínico do MA. As ST-315 e ST-281, identificadas nesse grupo, já haviam sido associadas a isolados da Holanda e EUA, respectivamente.

A análise regional e temporal dos resultados de MLST mostrou que os isolados de mesma ST encontravam-se na mesma região geográfica, e foram isolados no mesmo ano.

Os isolados ambientais também foram analisados pela técnica de PFGE. Todos os isolados de mesma ST apresentaram perfis de macro-restrição clonais. A correlação entre PFGE e os perfis de resistência aos antibióticos dos isolados clonais mostrou que os resultados foram, de modo geral, concordantes. Isolados de mesmo perfil de macro-restrição apresentaram fenótipo de resistência às mesmas classes de antimicrobianos. A presença de isolados de mesmo ST com perfis diferentes de resistência aos antimicrobianos pode ser explicada por transferência lateral de elementos genéticos carregando genes de resistência, ou alterações genéticas que levem a mudanças na expressão de porinas e bombas de efluxo.

A tabela 4.9 lista os isolados ambientais e seus resultados de MLST, antibiograma e PFGE.

Tabela 4.9: Resultados fenotípicos e genéticos dos isolados ambientais

Origem	Ano	Isolado	Perfil de Resistência (PR)	MLST	PFGE
AM	***	KE-19	PR-01	281	
AM	***	KE-01	PR-01	C	U
AM	***	KE-03	PR-04	C	U
AM	***	KE-16	PR-01	L	V
AM	***	KE-17	PR-02	L	V
AM	***	KE-18	PR-02	L	V
AM	***	KE-02	PR-07	N	
AM	2006	KE-10	PR-01	O	X
AM	2006	KE-11	PR-01	O	X1
AM	2006	KE-12	PR-02	P	
AM	2006	KE-13	PR-06	V	
AM	2006	KE-14	PR-03	X	
AM	2006	KE-15	PR-06	Z	
PA	2003	KE-07	PR-02	315	
PA	2003	KE-04	PR-02	S	Z
PA	2003	KE-05	PR-02	S	Z
PA	2003	KE-06	PR-02	S	Z
PA	2003	KE-08	PR-01	T	
PA	2003	KE-09	PR-05	U	

4.3. Comparação dos resultados de isolados clínicos e ambientais do AM

Os isolados do AM foram obtidos de fonte clínica e ambiental, em quatro períodos distintos. As quatro amostras clínicas foram obtidas em um mesmo período, mas não existe informação sobre o ano de isolamento. Os isolados ambientais foram recebidos em três períodos distintos: KE-01, KE-02 e KE-03 foram recebidas em um período anterior ao ano de 2006, os isolados KE-10 a KE-15 (6 isolados) foram recebidos no ano 2006 e os isolados KE-16 a KE-19 (4 isolados) foram recebidos após o ano 2006.

A análise dos resultados do antibiograma mostrou que os isolados ambientais apresentaram resistência a mais classes de antibióticos do que os isolados clínicos. Resistência apenas a penicilina e a aminoglicosídeos foi observada nos isolados clínicos. Os isolados ambientais apresentaram resistência a essas duas classes e também às classes cefalosporina, quinolonas, inibidores da via metabólica do folato (sulfonamidas), tetraciclina e cloranfenicol. A figura 4.10 mostra os percentuais de resistência às diferentes classes de antibióticos dos isolados clínicos e ambientais, separados por período de recebimento.

Os isolados do ano 2006 apresentaram os maiores percentuais de resistência. Além disso, resistência a cefalosporinas e a quinolonas só foi observada nesse grupo de isolados. Esse grupo de isolados ambientais foi obtido de amostras de lavado de mão. A identificação de isolados com fenótipo de resistência a essas classes de antibióticos é mais uma evidência que as mãos podem atuar como veículos de transmissão de patógenos resistentes a antibióticos.

Analisando os resultados de MLST, observou-se que, com exceção de KE-19 (ST281), todos os isolados ambientais do MA apresentaram ST novo. No grupo de isolados clínicos, todos apresentaram STs existentes no banco de dados de MLST. A tabela 4.10 resume os resultados de MLST e antibiograma dos isolados do AM.

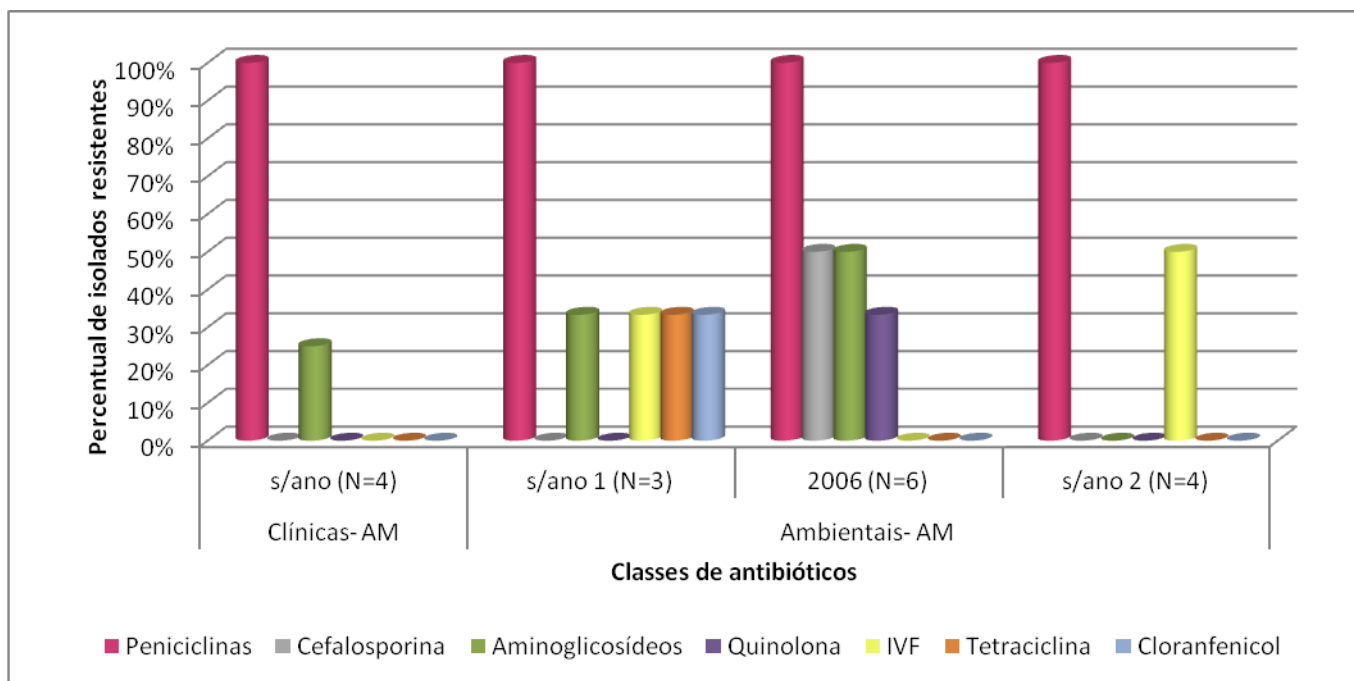


Figura 4.10: Percentual de resistência dos isolados clínicos e ambientais do AM, separados por fonte e período de isolamento.

Tabela 4.10: Resultados de antibiograma e MLST dos isolados do AM

Isolado	Origem	Fonte	Ano	Perfil de Resistência	MLST	PFGE
KC-50	AM	C	***	penicilina	360	M1
KC-51	AM	C	***	penicilina	360	M
KC-52	AM	C	***	penicilina	347	-
KC-53	AM	C	***	penicilina, aminoglicosídeo	200	-
KE-01	AM	A	***	penicilina	C	U
KE-02	AM	A	***	penicilina, IVF, tetraciclina, cloranfenicol	N	-
KE-03	AM	A	***	penicilina, aminoglicosídeo	C	U
KE-10	AM	A	2006	penicilina	O	X
KE-11	AM	A	2006	penicilina	O	X1
KE-12	AM	A	2006	penicilina, aminoglicosídeo	P	-
KE-13	AM	A	2006	penicilina, cefalosporina, aminoglicosídeo, quinolona	V	-
KE-14	AM	A	2006	penicilina, cefalosporina	X	-
KE-15	AM	A	2006	penicilina, cefalosporina, aminoglicosídeo, quinolona	Z	-
KE-16	AM	A	***	penicilina	L	V
KE-17	AM	A	***	penicilina, IVF	L	V
KE-18	AM	A	***	penicilina, IVF	L	V
KE-19	AM	A	***	penicilina	281	-

4.4. Construção da árvore filogenética

Com o intuito de definir as relações genéticas entre os isolados de *K. pneumoniae* utilizados neste estudo, as sequências nucleotídicas dos sete fragmentos gênicos utilizados nas análises de MLST foram concatenadas para através de sua análise estabelecermos uma relação genética entre os isolados. A análise utilizou o método de NJ (Figura 4.9). Foram incluídos 44 isolados clínicos e ambientais, representantes das STs identificadas. Sequências concatenadas dos 7 genes de *Klebsiella ozaenae*, *Klebsiella rhinoscleromatis* (subespécies de *K. pneumoniae*) e *Klebsiella variicola*, obtidas do banco de sequências de MLST, foram incluídas na análise.

A árvore do MLST apresenta uma topologia composta por três grupos: o principal grupo (*K. pneumoniae* e as subespécies *K. ozaenae* e *K. rhinoscleromatis*); um segundo grupo (isolados clínicos e ambientais dos estados do Maranhão, Pará e Amazonas), apresentando STs com perfil alélico novo; e um terceiro grupo relacionado a espécie *K. variicola*. A população de *K. pneumoniae* é geneticamente homogênea, com isolados clínicos e ambientais de diferentes anos de isolamento e regiões geográficas, MDR ou não-MDR, constituindo um único e coeso grupo. Não é possível evidenciar agrupamentos de isolados clínicos, o que evidenciaria a especialização dos mesmos como linhagens patogênicas. A similaridade entre as sequências do grupo de *K. pneumoniae* mostrou que todos os isolados apresentam mais de 99% de similaridade nos genes estudados. A similaridade entre isolados de grupos diferentes apresentou valores entre 95% e 96%. As sequências agrupadas com a espécie *K. variicola*, apresentam mais de 99% de similaridade entre si, o que sugere que os isolados seriam da espécie *K. variicola*.

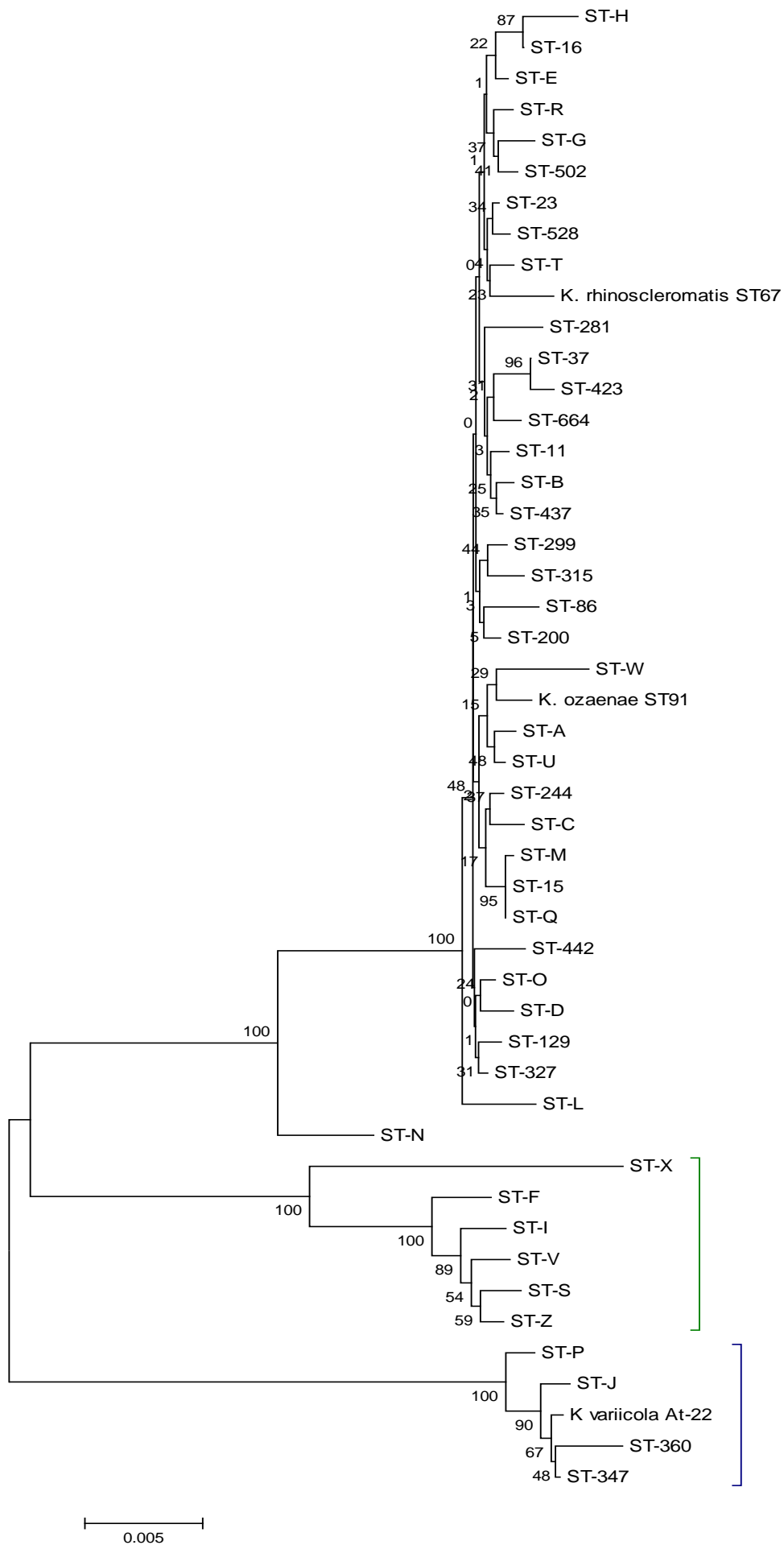


Figura 4.11: Árvore genética dos genes *gapA*, *infB*, *mdh*, *pgi*, *phoE*, *rpoB* e *tonB* concatenados, baseada no método de distância NJ. O modelo de correção utilizado foi Kimura-2-parâmetros.

5. DISCUSSÃO

A resistência das bactérias aos antibióticos são uma questão de particular importância dentro do contexto mundial, visto os surtos e as epidemias causados por bactérias multirresistentes a antibióticos e produtoras de β -lactamases. (Arnoni, Berezin, & Martino, 2007; Kumar et al., 2011; Woodford, Turton, & Livermore, 2011). O Brasil e outros países da América Latina, em geral, apresentam maiores prevalências de patógenos resistentes do que Europa e EUA, principalmente bacilos Gram-negativos não-fermentadores e enterobactérias produtoras de ESBL (Rossi 2011; Rossi et al. 2008; Lima-Bittencourt et al. 2007; Dropa et al. 2009). Nossos resultados mostrando que 67% dos isolados clínicos de *K. pneumoniae* apresentam perfil de multirresistência a antimicrobianos é mais uma evidência neste sentido.

Programas de vigilância de patógenos emergentes e de resistência antimicrobiana existentes em diversos países contribuem para o reconhecimento de tendências espaciais e temporais da resistência antimicrobiana para os principais patógenos causadores de infecções nosocomiais e adquiridas na comunidade. Dentre eles, destaca-se o SENTRY como um dos programas que analisa isolados dos cinco continentes. Na América Latina, diversos centros participam deste programa, incluindo instituições no Brasil (Colombo et al. 2009). Os resultados da análise de isolados obtidos entre 1997 e 2001 mostram que a resistência em bactérias Gram-negativas é maior na América Latina do que na América do Norte e na Europa. Ademais a prevalência de enterobactérias produtoras de ESBL é maior no Brasil do que em qualquer outra região estudada (Helio S Sader et al. 2004). Em relação aos isolados de 1997 a 2000, obtidos de pacientes com infecção do trato urinário, o programa SENTRY mostrou que *Klebsiella spp* multirresistente, mas susceptível às carbapenemas, é o segundo gênero presente em pacientes de UTI, sendo as infecções por *E. coli* as mais prevalentes. A comparação dos perfis de susceptibilidade ao longo do tempo mostrou que houve redução da susceptibilidade a cefepime, aztreonam, ceftriaxona, gentamicina e sulfametoxazol-trimetoprim no curto período de 1997-1999 para 2000 (GALES et al., 2002).

Em nossa casuística esta tendência também foi observada. Aumento na resistência às várias classes de antibióticos entre isolados do MA e do RJ

obtidos ao longo de uma década mostrou, de uma forma geral, uma associação positiva com os isolados atuais.

Resistência à classe das penicilinas foi observada em 100% das nossas amostras, provavelmente devido à presença constitutiva do gene *bla*_{SHV} na espécie (Fevre et al. 2005; Hæggman et al. 2004). Os alelos SHV-11 e SHV-36 foram identificados em 94% e 6% dos isolados. O alelo SHV-11 é identificado com freqüência em *K. pneumoniae*. Um estudo com 17 isolados produtores de KPC-2, obtidos nos 5 continentes, incluindo o Brasil, mostrou que 68,7% dos isolados possuíam o alelo SHV-11 (Cuzon 2010). Outro estudo, avaliando a prevalência de alelos de SHV em isolados de *K. pneumoniae* de diferentes fontes, em Recife, mostrou que SHV-1 e SHV-11 eram os mais freqüentes (Veras et al. 2011). O alelo SHV-36, observado pela primeira vez no Brasil, no presente estudo, já foi identificado em *Klebsiella spp.* em Portugal e nos EUA (Munday et al. 2004; E. Machado et al. 2007).

Em relação aos genes de beta-lactamases adquiridos por transferência lateral, o gene *bla*_{TEM} foi o mais prevalente em nossas amostras, sendo o alelo *bla*_{TEM-1} prevalente em 94% dos isolados. Este é o alelo mais freqüentemente encontrado no mundo tendo sido observado em 81,3% dos isolados de *K. pneumoniae* produtora de KPC-2 (Cuzon 2010). Um estudo realizado com 64 isolados da família *Enterobacteriaceae* de hospitais de São Paulo e do Rio de Janeiro, caracterizou a presença de *bla*_{TEM-1} em todos os isolados de *K. pneumoniae* estudados (89% da amostragem) (Andrade et al. 2011). O alelo *bla*_{TEM-15}, identificado em um de nossos isolados (RJ, 2005) é pela primeira vez descrito na América Latina. Ele já foi observado em bactérias da família *Enterobacteriaceae* na Tunísia, Itália e Eslováquia (Caccamo et al., 2007; Chouchani et al., 2007; Melano et al., 2006; Segatore et al., 2004).

Os genes *bla*_{DHA-1} e *bla*_{OXA-3} estão presentes em apenas um de nossos isolados, obtido no RJ em 2006. DHA-1 já foi descrito em *K. pneumoniae* e *E. coli* na Europa, Ásia, e América Latina, inclusive no Brasil (Sougakoff & Jarlier, 2000; Mata et al., 2011; Yoon et al., 2011). OXA-3 já foi observado em *P. aeruginosa* de vários países (Sanschagrín, Couture, and R. C. Levesque 1995; Gallant et al. 2005).

O gene CTX-M-2, identificado no isolado KC-45, já foi identificado em isolados de *K. pneumoniae* no Brasil (Lopes et al. 2010), inclusive em um surto que atingiu a ala neonatal de um hospital de São Paulo em 2008 (de Oliveira Garcia et al. 2008). Atualmente, isolados produtores desta enzima são considerados endêmicos na maior parte da América do Sul, Europa e Ásia (Cantón and Coque 2006; David M Livermore et al. 2007). No Brasil, estudos demonstraram a alta prevalência do gene $bla_{CTX-M-2}$ em clones de *K. pneumoniae*. A localização destes genes em plasmídeos e integrons de classe 1 provavelmente determinam sua ampla disseminação (Clímaco, Minarini, & da Costa Darini, 2010; Lopes et al., 2010; de Oliveira Garcia et al., 2008; Tollentino et al., 2011). Apesar da identificação do gene CTX-M-2 em KC-45, este isolado apresentou perfil de susceptibilidade às cefalosporinas de espectro estendido e ao aztreonam. Essa observação sugere que o gene identificado possivelmente não está sendo expresso. A expressão do gene CTX pode ser modulada por elementos IS inseridos a montante do gene. Um trabalho publicado em 2002, por Cao et al. mostrou o envolvimento do elemento ISEcp1 na transcrição do gene CTX-M-17 de um isolado de *K. pneumoniae* (Cao, Lambert & Courvalin, 2002). Outro trabalho, publicado em 2003, mostrou o envolvimento do elemento ISEcp1B na expressão e mobilização do gene CTX-M-19, contribuindo para a sua alta expressão na bactéria (Poirel, Decousser & Nordmann, 2003).

Resistência à classe das carbapenemas foi observada em 14% dos isolados, percentual maior que dados da literatura, que mostram uma alta susceptibilidade de isolados de *K. pneumoniae* a essa classe de antibióticos. O programa TEST, realizado com Gram-positivos e negativos entre 2004-2007, procurou avaliar a resistência aos antimicrobianos na América Latina e a susceptibilidade à tigerciclina, comparando-a aos antimicrobianos utilizados rotineiramente na clínica. Trinta e três centros de onze países, incluindo o Brasil, participaram do estudo. Os resultados para a família Enterobacteriaceae mostraram que imipenem e tigerciclina foram os antibióticos mais ativos contra estes microorganismos, com 99,2% e 96,2% de susceptibilidade, assim como para *K. pneumoniae* e *E. coli* produtoras de ESBL (Rossi et al. 2008). Outro estudo, realizado em 2008, parte do programa de vigilância SMART europeu,

mostrou que mais de 90% das *K pneumoniae* apresentavam-se susceptíveis a ertapenem e imipenem (Hawser et al. 2011). No entanto, os relatos crescentes de patógenos apresentando resistência adquirida a essa classe de antimicrobianos têm ocorrido no mundo, particularmente devido à emergência e disseminação do gene KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) (Sacha et al. 2009; Geffen et al. 2010; Zavascki et al. 2010).

Em nosso trabalho 27% dos isolados resistentes às carbapenemas foram positivos para o gene bla_{KPC}. Nos demais oito isolados apresentando resistência a carbapenemas não foi identificada a presença de genes específicos associados ao fenótipo. A resistência completa a carbapenemas envolve não só a produção destas enzimas mas também outros mecanismos, como redução da permeabilidade de membrana externa ao antimicrobiano (NORDMANN et al., 2009; YIGIT et al., 2001). A super-expressão de sistemas de efluxo também contribui para este fenótipo de resistência (Nordmann et al. 2009). O aumento da expressão de bombas de efluxo como mecanismo de resistência a carbapenemas já foi observado em *P. aeruginosa* (Xian-Zhi and Hiroshi 2009). A alteração na expressão de porinas ompK35 e ompK36 é um mecanismo envolvido na resistência carbapenemas, podendo acarretar aumento de MICs para meropenem em *K. pneumoniae* (Y.-K. Tsai et al. 2011). A produção de uma variante de ompK36 foi relacionada à resistência a ertapenem e susceptibilidade reduzida a meropenem (García-Fernández et al. 2010). A alteração da permeabilidade a carbapenemas e/ou redução do acúmulo intracelular do antibiótico na célula bacteriana são mecanismos que podem estar envolvidos no fenótipo de resistência a carbapenemas.

Os isolados KC-55, KC-56 e KC-57 apresentavam o gene KPC-2. Esta enzima, pertencente à classe A de Ambler de β -lactamases, é capaz de hidrolisar carbapenemas, penicilinas, cefalosporinas e aztreonam. De fato, resistência a estas classes de antibióticos foi observada nos três isolados, indicando que este gene possa estar envolvido no fenótipo MDR. Esta enzima foi observada pela primeira vez em *K. pneumoniae* isolada na Carolina do Norte (EUA) (Yigit et al. 2001). Desde então, variantes desta foram relatadas em vários países e gêneros de bactérias. A disseminação do gene da enzima KPC é atribuída à sua associação a plasmídeos e transposons (Naas et al.

2008). Além disso, tem-se observado a disseminação de clones dentro de um país, ou entre países. Atualmente existem 10 enzimas pertencentes à família KPC, no entanto, um re-sequenciamento da KPC-1 mostrou que esta é idêntica a KPC-2 (Nordmann et al. 2009). KC-1/2 e KC-3 são as carbapenemases mais prevalentes em enterobactérias (Nordmann et al. 2009; Sacha et al. 2009). *K. pneumoniae* isoladas em 2006, no Brasil, já carreavam o gene KPC-2 (Monteiro et al. 2009). Estudo avaliando as relações genéticas entre 57 isolados produtores de KPC-2, obtidos de 5 estados brasileiros mostrou a predominância de um clone no Brasil, pertencente ao ST437 (Seki et al. 2011). Os três isolados KPC-2 positivos de nosso estudo pertencem ao ST-437, que pertence ao complexo clonal 243, que é pandêmico.

A presença de integron de classe 1 em 82,4% dos isolados das STs pandêmicas corrobora dados da literatura, que mostram uma alta incidência de integron de classe 1 na família Enterobacteriaceae (White et al. 2001; Frank et al. 2007).

A caracterização molecular dos integrons revelou a ocorrência de seis distintos cassetes gênicos entre nossos isolados, incluindo quatro diferentes categorias de genes *aac*, *aad*, *dfr* e *orf-1*. Os cassetes mais prevalentes correspondem a genes de resistência aos aminoglicosídeos e ao trimetoprim. Esses resultados corroboram dados da literatura, que mostram uma predominância de cassetes conferindo resistência a essas classes de antibióticos em integron de classe 1 de enterobactérias. Dentre isolados da família *Enterobacteriaceae* obtidos entre 1999 e 2000 na Austrália, 53% foram positivos para a presença de integron de classe 1 e os cassetes gênicos *aad* e *dfr* foram os mais prevalentes (White et al. 2001). A caracterização dos cassetes gênicos presentes em bactérias Gram-negativas isoladas da urina e resistentes ao trimetoprim, na Suécia, revelou apenas a presença de *dfr* e *aad* (M Grape et al. 2005).

Os cassetes de resistência aos aminoglicosídeos encontrados em nosso trabalho foram *aadA2*, *aac(6')-Iq* e *aac(6')-Ib* sendo o último o mais freqüente. Sete isolados pertencentes ao mesmo complexo clonal, seis pertencentes ao ST-11 e um pertencente ao ST-437, apresentavam o mesmo arranjo de genes *aac(6')-Ib-orf-1*. Este mesmo arranjo foi identificado em integrons de classe 1

de *Salmonella enterica* isolados no Brasil, entre 1999-2003, de diferentes fontes, incluindo humanos, animais e produtos alimentícios (Peirano et al. 2006). Um isolado de ST-11 também apresentou um arranjo semelhante a esse, composto por *aac(6)-Iq* seguido da mesma orf-1. O cassete *aac(6)-Iq* foi descrito pela primeira vez em um isolado de *K. pneumoniae* multirresistente da Argentina (Centrón and Roy 1998). O cassete encontrava-se em um integron de classe 1 presente em um plasmídeo conjugativo de 50Kb.

O cassete *aadA2*, identificado em KC-45 e KC-57, é um dos mais frequentemente encontrados em integrons de classe 1. Apesar de estreptomicina e espectinomicina não serem rotineiramente usados na terapêutica, cassetes *aadA* são abundantes, o que mostra que a descontinuação do uso de um antibiótico não leva a eliminação imediata dos genes que conferem resistência a ele (White et al. 2001).

Dois cassetes codificando genes de resistência ao trimetoprim foram identificados, *dfrA25* e *dfrA30*. *dfrA25* foi descrito pela primeira vez em 2006, em *S. agona* no Brasil (Agersø, Peirano, and Aarestrup 2006). Posteriormente, *dfrA25* foi identificado em integrons de classe 1 em *K. pneumoniae* e *E. coli* resistentes a quinolonas no Brasil (Minarini et al. 2008). O cassete *dfrA30* foi descrito pela primeira vez em um isolado de *K. pneumoniae* ambiental, obtido de amostra de água do rio Mahananba, na Índia. O isolado era multirresistente, oligotrófico facultativo, e o novo cassete descrito foi apontado como responsável pela resistência do isolado ao trimetoprim (Kumar ET AL., 2011). A identificação deste cassete em isolados obtidos de fontes distintas (ambiental e clínica) mostra que isolados ambientais podem ser reservatórios de genes de resistência.

Enquanto, alguns isolados de casos clínicos carregavam integron de classe 1, foi identificado dentre as *K. pneumoniae* ambientais a presença de integron de classe 2. Este é um achado inédito na literatura. A região variável deste elemento na amostra KE-12 apresentava a composição: *sat-2-aadA1* que é parte do arranjo canônico *dfrA1-sat-2-aadA1* (Dubois et al. 2007). Já o outro isolado apresentava apenas a integrase de classe 2. A maioria dos genes da integrase de classe 2 possuem uma mutação, que leva a produção de uma enzima não-funcional (Mazel 2006), assim a variabilidade de cassete gênicos

neste integron é muito reduzida em relação aos integrons de classe 1. O isolado mostrou-se resistente a todos os aminoglicosídeos testados, incluindo estreptomicina, provavelmente devido à presença dos cassetes *sat* e *aadA*.

Isolados resistentes à quinolona, à tetraciclina e ao cloranfenicol foram identificados. No entanto, não foram encontrados elementos genéticos relacionados à resistência às quinolonas, à tetraciclina e ao cloranfenicol. Essas resistências podem ser devido a genes não identificados neste estudo ou a mecanismos não-específicos como bombas de efluxo e baixa expressão de porinas. Esses mecanismos já foram associados à resistência a essas classes de antibióticos em isolados de *K. pneumoniae* e outras enterobactérias (Hasdemir et al. 2004; Xian-Zhi and Hiroshi 2009; H. B. Kim et al. 2009; Padilla et al. 2010).

Um trabalho recente, realizado por Kumar et al. (2011), comparou o genoma completo de isolados de *K. pneumoniae* com diferentes perfis de resistência. O isolado multirresistente apresentava bombas de efluxo adicionais, que estariam contribuindo para este fenótipo. Mutações nos genes *gyrA* e *parC* poderiam estar contribuindo para a alta resistência do isolado a fluoroquinolonas (V. Kumar, Sun, et al. 2011). Essas mutações são um dos principais mecanismos de resistência às fluoroquinolonas, levando a substituições de aminoácidos no alvo destes antibióticos. Essas alterações na proteína impedem que o antibiótico possa se ligar ao seu alvo e impedir a replicação da bactéria. Os oito isolados de ST11 apresentaram resistência a todas as quinolonas testadas, o que sugere que esse tipo de mutação possa estar envolvida neste perfil.

A caracterização genética dos isolados clínicos e ambientais foi realizada através da abordagem de MLST, sendo encontradas 45 STs, das quais 24 STs são novas, possuindo alelos ou uma combinação alélica ainda não observada, de acordo com o banco de dados *online* de MLST para *K. pneumoniae*. Dos 76 isolados presentes neste estudo, 51,3% possuem uma ST nova o que evidenciaria a diversidade desta espécie no Brasil, principalmente no ambiente.

A análise por MLST e sua resolução em uma árvore filogenética evidenciou a presença de um clado agrupando a maioria de nossos isolados.

Brisse et al. (2009) determinou a estrutura genética populacional de *K. pneumoniae*. Para isso, isolados obtidos de diferentes fontes, anos e regiões geográficas foram analisados utilizando MLST. A população foi caracterizada por apresentar uma baixa divergência nucleotídica nos genes ortólogos o que aponta para uma emergência recente desta população, e portanto sua natureza clonal (Sylvain Brisse et al. 2009). Assim como em nossas análises, Brisse et al. (2009) incluiu as subespécies *K. pneumoniae subsp. ozaenae* e *K. pneumoniae subsp. rhinoscleromatis*. A determinação destas subespécies baseia-se em testes bioquímicos. No entanto, as análises mostraram que as mesmas seriam clones de *K. pneumoniae*. Essa observação corrobora os resultados obtidos por nós estudo, onde ambas as subespécies encontram-se dentro de um mesmo clado com *K. pneumoniae*.

STs identificadas neste estudo são epidemiologicamente relevantes já que encontram-se disseminadas em diferentes países ao redor do mundo, possuindo potencial pandêmico. De particular importância são as STs 437 e 11, que junto com a ST258 definem um complexo clonal. ST-258 é considerado um clone pandêmico, já descrito em isolados de *K. pneumoniae* das Américas, da Europa, da Ásia, e associado à disseminação do gene *bla_{KC}* nestas regiões. Sua descrição no Brasil ocorreu pela primeira vez em 2011, em isolados de *K. pneumoniae* produtores de KC-2, de Ribeirão Preto (SP) (Andrade et al. 2011). Os clones ST-11 e ST-437 já foram descritos em isolados do Brasil, estando distribuídos principalmente na região sudeste do país (Andrade et al. 2011; Seki et al. 2011). De fato, todos os isolados de ST-11 e ST-437 deste estudo foram obtidos de hospitais no RJ. Diferentes estudos utilizando MLST para caracterizar a relação entre isolados de *K. pneumoniae* frequentemente reportam clones pertencentes ao cc11 entre seus isolados (Andrade et al., 2011; Hrabák et al., 2009; Kitchel et al., 2009; Lee et al., 2011; Oteo et al., 2009; Qi et al., 2011). Dessa forma, este complexo clonal encontra-se distribuído mundialmente, sendo predominante no Brasil e em diferentes países europeus e asiáticos.

Outro complexo clonal importante identificado é cc37. Dois isolados de ST-37 e três isolados de ST-423 foram identificados neste estudo. O clone ST-37 já foi identificado em diversos países da América do Norte, África, Ásia e

Europa, estando relacionado à resistência a colistina na Coreia do Sul (Suh et al. 2010), a amostra carreando o gene DHA-1 em um hospital na Espanha (Diestra et al. 2010), e a um clone resistente a ertapenem Itália (García-Fernández et al. 2010). Os dois isolados de ST37 do presente estudo apresentavam perfis distintos de PFGE e de susceptibilidade aos antimicrobianos: KC-12 sendo MDR e KC-21 apenas resistente às penicilinas. KC-12 apresentava o gene SHV-36, codificante de ESBL, sendo resistente às penicilinas, às cefalosporinas e à combinação sulfametoxazol-trimetoprim. Isolados pertencentes à ST-423 já foram identificados na África, Brasil, Espanha e Filipinas, de acordo com dados do banco de MLST para *K. pneumoniae*. No entanto, o único trabalho publicado mencionando este ST é um estudo de produtores de KPC-2 no Brasil (Seki et al. 2011). Os isolados são de diferentes fontes no Rio de Janeiro, no ano de 2008 e possuíam característica de multirresistência a antibióticos e presença da carbapenemase do tipo KPC-2. Em nosso estudo fica claro que a ST-423 tem características de surto já que circulava também no Maranhão em 2006.

ST-23 é outra com potencial epidêmico, apesar de ter sido identificado em um único isolado clínico, não MDR, do Maranhão em 2000. Esta ST já foi descrita na França e no Japão, causando abscesso hepático (Qi et al. 2011; Decré et al. 2011; Harada et al. 2011). Os isolados destes estudos eram MDR e apresentavam fatores de virulência. Este clone também já foi observado na China, em isolados produtores de KPC-2 (Qi et al. 2011), e em isolados da Espanha, Bélgica, França e Holanda, obtidos de fontes clínicas e de animais, nem sempre associados à infecção grave (Sylvain Brisse et al. 2009). Dessa forma, a aquisição de resistência e a transferência lateral de genes podem ser apontadas como mecanismos importantes na evolução dentro das STs.

6. CONCLUSÕES

- O fenótipo de resistência às múltiplas drogas prevalece nos isolados clínicos do Rio de Janeiro ao longo do tempo
- O fenótipo de resistência às múltiplas drogas não prevalece nos isolados clínicos do Maranhão obtidos no ano 2000, exceto pelo isolado que carrega integron de classe 1.
- A maioria dos isolados ambientais não apresenta fenótipo de resistência às múltiplas drogas nem carrega elementos genéticos associados a resistência
- Existe uma linhagem prevalente de *K.pneumoniae* circulando nas regiões estudadas
- STs pertencentes a complexos clonais com distribuição global estão circulando em diferentes regiões geográficas do Brasil

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agersø Yvonne, Peirano Gisele, Aarestrup Frank M. 2006. “dfrA25, a novel trimethoprim resistance gene from Salmonella Agona isolated from a human urine sample in Brazil.” *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 58(5):1044-1047.

Ambler RP, Coulson AF, Frere JM, Ghuysen JM, Joris B, Forsman M, Levesque RC, Tiraby G, Waley SG. 1991. “A standard numbering scheme for the Class A β -lactamases.” *Biochemical Journal* 276:269-270.

Andrade Leonardo Neves, Curiao Tânia, Ferreira Joseane Cristina, Longo Juliana, Mucedola, Clímaco Eduardo Carneiro, Martinez Roberto, Bellissimo-Rodrigues, Fernando, Basile-Filho Aníbal, Evaristo Marco Antônio, Del Peloso Pedro F, Ribeiro Vanessa Bley, Barth Afonso Luis, Paula Milena Cristina, Baquero Fernando, Cantón Rafael, Darini Ana Lúcia Da Costa, Coque Teresa M. 2011. “Dissemination of blaKPC-2 by the spread of Klebsiella pneumoniae clonal complex 258 clones (ST258, ST11, ST437) and plasmids (IncFII, IncN, IncL/M) among Enterobacteriaceae species in Brazil.” *Antimicrobial agents and chemotherapy* 55(7):3579-3583.

Arnoni, Mariana V, Eitan N Berezin, and Marinês D V Martino. 2007. “Risk factors for nosocomial bloodstream infection caused by multidrug resistant gram-negative bacilli in pediatrics.” *The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases* 11(2):267-271.

Baraniak, Anna, Izdebski, Radosław, Herda, Małgorzata, Fiett, Janusz, Hryniewicz, Waleria, Gniadkowski, Marek, Kern-Zdanowicz, Izabela, Filczak, Krzysztof Łopaciuk, Urszula. 2009. “Emergence of Klebsiella pneumoniae ST258 with KPC-2 in Poland.” *Antimicrobial agents and chemotherapy* 53(10):4565-4567.

Blaschke, Anne J, Korgenski, Kent, Daly, Judy A, Lafleur, Bonnie, Pavia, Andrew T, Byington, Carrie L. 2010. “Extended Spectrum β -Lactamase-Producing Pathogens in a Children’s Hospital: A five-Year Experience.” *American journal of infection Control* 37(6):435-441.

Brisse, Sylvain, Fevre, Cindy, Passet, Virginie, Issenhuth-Jeanjean, Sylvie, Tournebize, Régis, Diancourt, Laure, Grimont, Patrick. 2009. “Virulent clones of Klebsiella pneumoniae: identification and evolutionary scenario based on genomic and phenotypic characterization.” *PloS one* 4(3):e4982.

Brolund, Alma, Martin Sundqvist, Gunnar Kahlmeter, and Malin Grape. 2010. “Molecular characterisation of trimethoprim resistance in Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae during a two year intervention on trimethoprim use.” *PloS one* 5(2):e9233.

Bush, Karen, and George A. Jacoby. 2010. “Updated Functional Classification of β -Lactamases.” *Antimicrobial agents and chemotherapy* 54(3):969-976.

Bush, Karen, George A Jacoby, and Antone A Medeiros. 1995. “MINIREVIEW A Functional Classification Scheme for β -Lactamases and Its Correlation with Molecular Structure.” *Antimicrobial agents and chemotherapy* 1211-1233.

Cantón, Rafael, and Teresa M Coque. 2006. “The CTX-M beta-lactamase pandemic.” *Current opinion in microbiology* 9(5):466-475.

- Cao Van, Lambert Thierry, Courvalin Patrice. 2002. "ColE1-Like Plasmid pIP843 of *Klebsiella pneumoniae* Encoding Extended-Spectrum β -Lactamase CTX-M-17." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 46(5):1212-1217.
- Centrón, D, and P H Roy. 1998. "Characterization of the 6'-N-aminoglycoside acetyltransferase gene aac(6)-Iq from the integron of a natural multiresistance plasmid." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 42(6):1506-1508.
- Chen, Luke F, Teena Chopra, and Keith S Kaye. 2009. "Pathogens resistant to antibacterial agents." *Infectious disease clinics of North America* 23(4):817-845, vii.
- Chuang, Yi-Ping, Chi-Tai Fang, Shau-Yan Lai, Shan-Chwen Chang, and Jin-Town Wang. 2006. "Genetic determinants of capsular serotype K1 of *Klebsiella pneumoniae* causing primary pyogenic liver abscess." *The Journal of infectious diseases* 193(5):645-654.
- Clímaco, Eduardo C, Luciene a R Minarini, and Ana Lúcia da Costa Darini. 2010. "CTX-M-producing *Klebsiella* spp. in a Brazilian hospital: what has changed in 6 years?" *Diagnostic microbiology and infectious disease* 68(2):186-189.
- Colombo, Arnaldo L, Janini, Mario, Salomão, Reinaldo, Medeiros, Eduardo a S, Wey, Sergio B, Pignatari, Antonio C C. 2009. "Surveillance programs for detection and characterization of emergent pathogens and antimicrobial resistance: results from the Division of Infectious Diseases, UNIFESP." *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 81(3):571-587.
- Cornaglia, Giuseppe, Helen Giamarellou, and Gian Maria Rossolini. 2011. "Metallo- β -lactamases: a last frontier for β -lactams?" *The Lancet infectious diseases* 11(5):381-393.
- Cuzon, Gaelle, Jocelyne Ouanich, Remy Gondret, Thierry Naas, and Patrice Nordmann. 2011. "Outbreak of OXA-48-positive carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in France." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 55(5):2420-2423.
- Cuzon, Gaelle. 2010. "Worldwide Diversity of *Klebsiella pneumoniae* That Produce Beta-Lactamase blaKPC-2 Gene." *Emerging Infectious Diseases* 16(9):1349-1356.
- de Oliveira Garcia, Doroti, Doi, Yohei, Szabo, Dora, Adams-Haduch, Jennifer M, Vaz, Tânia M I, Leite, Daniela, Padoveze, Maria Clara, Freire, Maristela P, Silveira, Fernanda P, Paterson, David. 2008. "Multiclonal outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-2 and novel variant CTX-M-59 in a neonatal intensive care unit in Brazil." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 52(5):1790-1793.
- Decré, Dominique, Verdet, Charlotte, Emirian, Aurélie, Le Gourrierec, Thibault, Petit, Jean-Claude, Offenstadt, Georges, Maury, Eric, Brisse, Sylvain, Arlet, Guillaume. 2011. "Emerging Severe and Fatal Infections Due to *Klebsiella pneumoniae* in Two University Hospitals in France." *Journal of clinical microbiology* 49(8):3012-3014.
- Diancourt, Laure, Virginie Passet, Jan Verhoef, Patrick A D Grimont, and Sylvain Brisse. 2005. "Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates." *Journal of clinical microbiology* 43(8):4178-4182.

Diestra, K, Miró, E, Martí, C, Navarro, D, Cuquet, J, Coll, P, Navarro, F. 2011. "Multiclonal epidemic of *Klebsiella pneumoniae* isolates producing DHA-1 in a Spanish hospital." *Clinical Microbiology And Infection* 17(7):1032-1036.

Dropa, Milena, Balsalobre, Lívia C., Lincopan, Nilton, Lincopan, Elisa M., Murakami, Thays M., Cassettari, Valéria C., Franco, Fábio, Guida, Stella M., Balabakis, Angelica Passadore, Lilian F., Santos, Silvia R., Matté, Glavur R., Matté, Maria H. J.. 2009. "Extended-spectrum beta-lactamases among Enterobacteriaceae isolated in a public hospital in Brazil." *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 51(4):203-209.

Dubois, Véronique, Parizano, Marie-Pierre, Arpin, Corinne, Coulange, Laure, Bezian, Marie-Christine, Quentin, Claudine. 2007. "High genetic stability of integrons in clinical isolates of *Shigella* spp. of worldwide origin." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 51(4):1333-1340.

Dworkin, M, S Falkow, E Rosenberg, KH Schleifer, and E Stackebrandt. 1992. "Volume 6: Proteobacteria: Gamma Subclass. The Genus *Klebsiella*." in *The prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications*. Springer.

Empel, Joanna, Hrabák, Jaroslav, Kozińska, Aleksandra, Bergerová, Tamara, Urbášková, Pavla, Kern-Zdanowicz, Izabela, Gniadkowski, Marek. 2010. "DHA-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in a teaching hospital in the Czech Republic." *Microbial drug resistance* 16(4):291-295.

Fevre, Cindy, Virginie Passet, François-Xavier Weill, Patrick A D Grimont, and Sylvain Brisse. 2005. "Variants of the *Klebsiella pneumoniae* OKP Chromosomal Beta-Lactamase Are Divided into Two Main Groups , OKP-A and OKP-B." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 49(12):5149-5152.

Fouts, Derrick E, Tyler, Heather L, DeBoy, Robert T, Daugherty, Sean, Ren, Qinghu, Badger, Jonathan H, Durkin, Anthony S, Huot, Heather, Shrivastava, Susmita, Kothari, Sagar, Dodson, Robert J, Mohamoud, Yasmin, Khouri, Hoda, Roesch, Luiz F W, Krogfelt, Karen a, Struve, Carsten, Triplett, Eric W, Methé, Barbara a. 2008. "Complete genome sequence of the N₂-fixing broad host range endophyte *Klebsiella pneumoniae* 342 and virulence predictions verified in mice." *PLoS genetics* 4(7):e1000141.

Frank, Thierry, Valérie Gautier, Antoine Talarmin, Raymond Bercion, and Guillaume Arlet. 2007. "Characterization of sulphonamide resistance genes and class 1 integron gene cassettes in Enterobacteriaceae, Central African Republic (CAR)." *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 59(4):742-745.

Fung, C-P, Chang, F-Y, Lee, S-C, Hu, B-S, Kuo, B I-T, Liu, C-Y, Ho, M, Siu, L K. 2002. "A global emerging disease of *Klebsiella pneumoniae* liver abscess: is serotype K1 an important factor for complicated endophthalmitis?" *Gut* 50(3):420-424.

Gad, Gamal F, Heba a Mohamed, and Hossam M Ashour. 2011. "Aminoglycoside resistance rates, phenotypes, and mechanisms of Gram-negative bacteria from infected patients in upper Egypt." *PloS one* 6(2):e17224.

Gales, Ana C, Hélio S Sader, and Ronald N Jones. 2002. "Respiratory tract pathogens isolated from patients hospitalized with suspected pneumonia in Latin America: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility profile: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2000)." *Diagnostic microbiology and infectious disease* 44(3):301-311.

Gallant, Claude V, Daniels, Craig, Leung, Jacqueline M Ghosh, Anindya S, Young, Kevin D, Kotra, Lakshmi P, Burrows, Lori L.2005. "Common β -lactamases inhibit bacterial biofilm formation." *Molecular microbiology* 58(4):1012-1024.

García-Fernández, Aurora, Miriagou, Vivi, Papagiannitsis, Costas C, Giordano, Alessandra, Venditti, Mario, Mancini, Carlo, Carattoli, Alessandra 2010. "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.

Geffen, Y, Finkelstein, R, Oren, I, Shalaginov, R, Tavleva, I, Sprecher, H. 2010. "Changing epidemiology of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae carriage during an outbreak of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*." *The Journal of hospital infection* 76(4):355-356.

Goering, Richard V. 2010. "Pulsed field gel electrophoresis: a review of application and interpretation in the molecular epidemiology of infectious disease." *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* 10(7):866-875.

Grape, M, a Farra, G Kronvall, and L Sundström. 2005. "Integrans and gene cassettes in clinical isolates of co-trimoxazole-resistant Gram-negative bacteria." *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 11(3):185-192.

Hæggman, S, S Löfdahl, A Paauw, J Verhoef, and S Brisse. 2004. "Diversity and Evolution of the Class A Chromosomal Beta-Lactamase Gene in *Klebsiella pneumoniae*." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 48(7):2400-2408.

Harada, Sohei, Tateda, Kazuhiro, Mitsui, Hiroshi, Hattori, Yusuke, Okubo, Masao, Kimura, Sei, Sekigawa, Kenichiro, Kobayashi, Katsuya, Hashimoto, Naoaki, Itoyama, Satoru, Nakai, Tatsuro, Suzuki, Takeo, Ishii, Yoshikazu, Yamaguchi, KeizoHarada, Sohei et al. 2011. "Familial Spread of a Virulent Clone of *Klebsiella pneumoniae* Causing Primary Liver Abscess." *Journal of clinical microbiology* 49(6):2354-2356.

Hasdemir, Ufuk Over, Jacqueline Chevalier, Patrice Nordmann, and Jean-marie Page. 2004. "Detection and Prevalence of Active Drug Efflux Mechanism in Various Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Strains from Turkey." *Journal of clinical microbiology* 42(6):2701-2706.

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

Hawkey, Peter M, and Annie M Jones. 2009. "The changing epidemiology of resistance." *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 64 Suppl 1:i3-10.

Hawser, S, Hoban, D, Bouchillon, S, Badal, R, Carmeli, Y. 2011. "Antimicrobial susceptibility of intra-abdominal gram-negative bacilli from Europe: SMART Europe 2008." *European journal of clinical microbiology & infectious diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology* 30(2):173-179.

Hrabák, Jaroslav, Empel, Joanna, Bergerová, Tamara, Fajfrlík, Karel, Urbásková, Pavla, Kern-Zdanowicz, Izabela, Hryniewicz, Waleria, Gniadkowski, Marek. 2009. "International clones of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* with extended-spectrum beta-lactamases in a Czech hospital." *Journal of clinical microbiology* 47(10):3353-3357.

Huovinen, Pentti, Lars Sundstrom, Göte Swedberg, and Ola Sköld. 1995. "MINIREVIEW Trimethoprim and Sulfonamide Resistance." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 39(2):279-289.

Jacoby, George a. 2009. "AmpC beta-lactamases." *Clinical microbiology reviews* 22(1):161-82.

Kabha, K, Nissimov, L, Athamna, A, Keisari, Y, Parolis, H, Parolis, L a, Grue, R M

Kim, Hong Bin, Wang, Minghua, Park, Chi Hye, Kim, Eui-Chong, Jacoby, George a, Hooper, David C2009. "oqxAB encoding a multidrug efflux pump in human clinical isolates of Enterobacteriaceae." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 53(8):3582-3584.

Kitchel, Brandon, Rasheed, J Kamile, Patel, Jean B, Srinivasan, Arjun, Navon-Venezia, Shiri, Carmeli, Yehuda, Brolund, Alma, Giske, Christian G. 2009. "Molecular epidemiology of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in the United States: clonal expansion of multilocus sequence type 258." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 53(8):3365-3370.

Kumar, Arvind, Soumynanda Chakraborti, Prachi Joshi, Pinak Chakrabarti, and Ranadhir Chakraborty. 2011. "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.

Kumar, Vinod, Sun, Peng, Vamathevan, Jessica, Li, Yong, Ingraham, Karen, Palmer, Leslie, Huang, Jianzhong, Brown, James R. 2011. "Comparative Genomics of *Klebsiella pneumoniae* strains with Different Antibiotic Resistance Profiles." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 55(9):4267-4276.

Leavitt, Azita, Carmeli, Yehuda, Chmelnitsky, Inna, Goren, Moran G, Ofek, Itzhak, Navon-Venezia, Shiri. 2010. "Molecular epidemiology, sequence types, and plasmid analyses of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Israel." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 54(7):3002-3006.

Lee, Mi Young, Ko, Kwan Soo, Kang, Cheol-In, Chung, Doo Ryeon, Peck, Kyong Ran, Song, Jae-Hoon. 2011. "High prevalence of CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Asian countries: diverse clones and clonal dissemination." *International journal of antimicrobial agents* 38(2):160-163.

- Lima-Bittencourt, C I, Cursino, L, Gonçalves-Dornelas, H, Pontes, D S, Nardi, R M D, Callisto, M, Chartone-Souza, E, Nascimento, A M A. 2007. "Multiple antimicrobial resistance in Enterobacteriaceae isolates from pristine freshwater." *Genetics and molecular research* 6(3):510-521.
- Livermore, D M, and D F Brown. 2001. "Detection of beta-lactamase-mediated resistance." *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 48 Suppl 1:59-64.
- Livermore, David M, Canton, Rafael, Gniadkowski, Marek, Nordmann, Patrice, Rossolini, Gian Maria, Arlet, Guillaume, Ayala, Juan, Coque, Teresa M, Kern-Zdanowicz, Izabela, Luzzaro, Francesco, Poirel, Laurent, Woodford, Neil. 2007. "CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe." *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 59(2):165-174.
- Lopes, Ana Catarina S, Dyana Leal Veras, Aleksandra Mariá S Lima, Rita de Cásia Andrade Melo, and Juan Ayala. 2010. "blactx-m-2 and blactx-m-28 extended spectrum beta-lactamase genes and class 1 integrons in clinical isolates of Klebsiella pneumoniae from Brazil." *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 105(2):163-167.
- Machado, Elisabete, Coque, Teresa M, Cantón, Rafael, Novais, Angela, Sousa, João Carlos, Baquero, Fernando, Peixe, Luísa. 2007. "High diversity of extended-spectrum beta-lactamases among clinical isolates of Enterobacteriaceae from Portugal." *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 60(6):1370-1374.
- Marra, Alexandre R, Wey, Sérgio B, Castelo, Adauto, Gales, Ana Cristina, Cal, Ruy, Guilherme R, Filho, José R Do Carmo, Edmond, Michael B, Pereira, Carlos Alberto P. 2006. "Nosocomial bloodstream infections caused by Klebsiella pneumoniae: impact of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) production on clinical outcome in a hospital with high ESBL prevalence." *BMC infectious diseases* 6:24.
- Martínez, Julio, Lucía Martínez, Monica Rosenblueth, Jesús Silva, and Esperanza Martínez-Romero. 2004. "How are gene sequence analyses modifying bacterial taxonomy? The case of Klebsiella." *International microbiology* 7(4):261-268.
- Mataseje, L F, Boyd, D a, Willey, B M, Prayitno, N, Kreiswirth, N, Gelosia, A, Poutanen, S M, Low, D E, Jenkins, S G, Katz, K, Mulvey, M R. 2011. "Plasmid comparison and molecular analysis of Klebsiella pneumoniae harbouring blaKPC from New York City and Toronto." *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 1:1-5.
- Mazel, Didier. 2006. "Integrons: agents of bacterial evolution." *Nature reviews. Microbiology* 4(8):608-620.
- McBride, M E, W C Duncan, G P Bodey, and C M McBride. 1976. "Microbial skin flora of selected cancer patients and hospital personnel." *Journal of clinical microbiology* 3(1):14-20.
- Minarini, Luciene a R, Laurent Poirel, Vincent Cattoir, Ana Lucia C Darini, and Patrice Nordmann. 2008. "Plasmid-mediated quinolone resistance determinants among enterobacterial isolates from outpatients in Brazil." *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 62(3):474-8.

Monteiro, Jussimara, Anderson Fernandes Santos, Marise Dutra Asensi, Gisele Peirano, and Ana Cristina Gales. 2009. "First report of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 53(1):333-334.

Munday, C J, G M Whitehead, N J Todd, M Campbell, and P M Hawkey. 2004. "Predominance and genetic diversity of community- and hospital-acquired CTX-M extended-spectrum beta-lactamases in York, UK." *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 54(3):628-633.

Naas, Thierry, Cuzon, Gaele, Villegas, Maria-Virginia, Lartigue, Marie-Frédérique, Quinn, John P, Nordmann, Patrice. 2008. "Genetic structures at the origin of acquisition of the beta-lactamase bla KPC gene." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 52(4):1257-63.

Nordmann, Patrice, Gaele Cuzon, and Thierry Naas. 2009. "The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria." *The Lancet Infectious Diseases* 9(4):228-236.

Oña-Compán, Salvador, García-Cobos, Silvia, Campos, José. 2009. "Emergence of CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* of multilocus sequence types 1, 11, 14, 17, 20, 35 and 36 as pathogens and colonizers in newborns and adults." *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 64(3):524-528.

Oteo, Jesús, Cuevas, Oscar, López-Rodríguez, Inmaculada, Banderas-Florido, Ana, Vindel, Ana, Pérez-Vázquez, María, Bautista, Verónica, Arroyo, Margarita, García-Caballero, Juan, Marín-Casanova, Pilar, González-Sanz, Rubén, Fuentes-Gómez, Víctor

Padilla, Emma, Llobet, Enrique, Doménech-Sánchez, Antonio, Martínez-Martínez, Luis, Bengoechea, José Antonio, Albertí, Sebastián. 2010. "Klebsiella pneumoniae AcrAB efflux pump contributes to antimicrobial resistance and virulence." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 54(1):177-183.

Peirano, Gisele, Yvonne Agersø, Frank M Aarestrup, Eliane Moura Falavina dos Reis, and Dalia dos Prazeres Rodrigues. 2006. "Occurrence of integrons and antimicrobial resistance genes among *Salmonella enterica* from Brazil." *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 58(2):305-309.

Podschun, R, and U Ullmann. 1998. "Klebsiella spp. as Nosocomial Pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods, and Pathogenicity Factors." *Clinical Microbiology Reviews* 11(4):589-603.

Poirel Laurent, Decousser Jean-Winoc, Nordmann Patrice. 2003. "Insertion Sequence ISEcp1B Is Involved in Expression and Mobilization of a blaCTX-M β -Lactamase Gene" *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2003, 47(9):2938-2945.

Qi, Yan, Wei, Zeqing, Ji, Shujuan, Du, Xiaoxing, Shen, Ping, Yu, Yunsong. 2011. "ST11, the dominant clone of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in China." *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 66(2):307-312.

Rodríguez-Martínez, J M, Pichardo, C, García, I, Pachón-Ibañez, M E, Docobo-Pérez, F, Pascual, A, Pachón, J, Martínez-Martínez, LRodríguez-Martínez, J M et al. 2008.

“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* 14(7):691-697.

Rossi, Flávia, Patricia García, Bernardo Ronzon, Daniel Curcio, and Michael J Dowzicky. 2008. “Rates of antimicrobial resistance in Latin America (2004-2007) and in vitro activity of the glycylcycline tigecycline and of other antibiotics.” *The Brazilian journal of infectious diseases* 12(5):405-415.

Rossi, Flávia. 2011. “The challenges of antimicrobial resistance in Brazil.” *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 52(9):1138-43.

Ruiz, Joaquim. 2003. “Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection.” *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 51(5):1109-1117.

Sacha, Paweł, Ostas, Alina, Jaworowska, Jadwiga, Wieczorek, Piotr, Ojdana, Dominika, Ratajczak, Jerzy, Tryniszewska, Elzbieta. 2009. “The KPC type beta-lactamases: new enzymes that confer resistance to carbapenems in Gram-negative bacilli.” *Folia histochemica et cytobiologica* 47(4):537-543.

Sader, Helio S, Ronald N Jones, Ana C Gales, Juliana B Silva, and Antonio C Pignatari. 2004. “SENTRY antimicrobial surveillance program report: Latin American and Brazilian results for 1997 through 2001.” *The Brazilian journal of infectious diseases: an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases* 8(1):25-79.

Samuelsen, Ørjan, Naseer, Umaer, Tofteland, Ståle, Skutlaberg, Dag Harald, Onken, Annette, Hjetland, Reidar, Sundsfjord, Arnfinn, Giske, Christian G. 2009. “Emergence of clonally related *Klebsiella pneumoniae* isolates of sequence type 258 producing plasmid-mediated KPC carbapenemase in Norway and Sweden.” *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 63(4):654-658.

Sanders, C C, W E Sanders, R V Goering, and V Werner. 1984. “Selection of multiple antibiotic resistance by quinolones, beta-lactams, and aminoglycosides with special reference to cross-resistance between unrelated drug classes.” *Antimicrobial agents and chemotherapy* 26(6):797-801.

Sanschagrín, F, F Couture, and R C Levesque. 1995. “Primary structure of OXA-3 and phylogeny of oxacillin-hydrolyzing class D beta-lactamases.” *Antimicrobial agents and chemotherapy* 39(4):887-893.

Schlepper-Schafer, J, Ezekowitz, a R, Ohman, D E. 1995. “Relationships among capsular structure, phagocytosis, and mouse virulence in *Klebsiella pneumoniae*.” *Infection and immunity* 63(3):847-852.

Schwarz, Stefan, Corinna Kehrenberg, Benoît Doublet, and Axel Cloeckaert. 2004. “Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol.” *FEMS microbiology reviews* 28(5):519-542.

Seki, Liliane M, Pereira, Polyana S, de Souza, Maria Da Penha a H, Conceição, Magda De S, Marques, Elizabeth a, Porto, Carlos Oliveira, Colnago, Elvira Maria L, Alves, Carlene De F M, Gomes, Deize, Assef, Ana Paula D a Carvalho, Samuelson, Orjan, Asensi, Marise D. 2011. "Molecular epidemiology of KPC-2- producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Brazil: the predominance of sequence type 437." *Diagnostic microbiology and infectious disease* 70(2):274-277.

Sekowska, Alicja, Hryniewicz, Waleria, Gniadkowski, Marek, Deptuła, Aleksander, Kusza, Krzysztof, Gospodarek, Eugenia. 2010. "Antimicrobial susceptibility of metallo-beta-lactamase positive and negative *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from intensive care unit patients." *Polish journal of microbiology* 59(1):67-69.

Shakil, Shazi, Rosina Khan, Raffaele Zarrilli, and Asad U Khan. 2008. "Aminoglycosides versus bacteria--a description of the action, resistance mechanism, and nosocomial battleground." *Journal of biomedical science* 15(1):5-14.

Shaw, K J, P N Rather, R S Hare, and G H Miller. 1993. "Molecular Genetics of Aminoglycoside Resistance Genes and Familial Relationships of the Aminoglycoside-Modifying Enzymes." *Microbiology Reviews* 57(1):138-163.

Simoons-Smit, a M, a M Verweij-van Vught, and D M MacLaren. 1986. "The role of K antigens as virulence factors in *Klebsiella*." *Journal of medical microbiology* 21(2):133-137.

Speer, B S, N B Shoemaker, and a a Salyers. 1992. "Bacterial resistance to tetracycline: mechanisms, transfer, and clinical significance." *Clinical microbiology reviews* 5(4):387-399.

Strahilevitz, Jacob, George a Jacoby, David C Hooper, and Ari Robicsek. 2009. "Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat." *Clinical microbiology reviews* 22(4):664-689.

Struve, Carsten, and Karen Angeliki Krogfelt. 2004. "Pathogenic potential of environmental *Klebsiella pneumoniae* isolates." *Environmental microbiology* 6(6):584-590.

Struve, Carsten, Martin Bojer, Eva Møller Nielsen, Dennis Schrøder Hansen, and Karen a Krogfelt. 2005. "Investigation of the putative virulence gene *magA* in a worldwide collection of 495 *Klebsiella* isolates: *magA* is restricted to the gene cluster of *Klebsiella pneumoniae* capsule serotype K1." *Journal of medical microbiology* 54(11):1111-3.

Suh, Ji-Yoeun, Son, Jun Seong, Chung, Doo Ryeon, Peck, Kyong Ran, Ko, Kwan Soo, Song, Jae-Hoon. 2010. "Nonclonal emergence of colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates from blood samples in South Korea." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 54(1):560-562.

Tenover, Fred C. 2006. "Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria." *The American journal of medicine* 119(6 Suppl 1):S3-10; discussion S62-70.

Thaker, Maulik, Peter Spanogiannopoulos, and Gerard D Wright. 2010. "The tetracycline resistome." *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 67(3):419-31.

Toleman, Mark A, Simm, Alan M, Murphy, Tanya A, Gales, Ana C, Biedenbach, Douglas J, Jones, Ronald N, Walsh, Timothy R. 2002. "Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo-beta-lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 50(5):673-679.

Tollentino, Fernanda M, Polotto, Milena, Nogueira, Mauricio L, Lincopan, Nilton, Neves, Patrícia, Mamizuka, Elsa M, Remeli, Gisele a, De Almeida, Margarete T G, Rúbio, Fernando G, Nogueira, Mara C L. 2011. "High prevalence of bla(CTX-M) extended spectrum beta-lactamase genes in *Klebsiella pneumoniae* isolates from a tertiary care hospital: first report of bla(SHV-12), bla(SHV-31), bla(SHV-38), and bla(CTX-M-15) in Brazil." *Microbial drug resistance* 17(1):7-16.

Tóth, a, Damjanova, I, Puskás, E, Jánvári, L, Farkas, M, Dobák, A, Böröcz, K, Pászti, J. 2010. "Emergence of a colistin-resistant KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST258 clone in Hungary." *European journal of clinical microbiology & infectious diseases* 29(7):765-769.

Tsai, Yu-Kuo, Fung, Chang-Phone, Lin, Jung-Chung, Chen, Jiun-Han, Chang, Feng-Yee, Chen, Te-Li, Siu, L Kristopher. 2011. "Klebsiella pneumoniae outer membrane porins OmpK35 and OmpK36 play roles in both antimicrobial resistance and virulence." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 55(4):1485-1493.

Turton, Jane F, Hatice Baklan, L K Siu, Mary E Kaufmann, and Tyrone L Pitt. 2008. "Evaluation of a multiplex PCR for detection of serotypes K1, K2 and K5 in *Klebsiella* sp. and comparison of isolates within these serotypes." *FEMS microbiology letters* 284(2):247-252.

Veras, Dyana Leal, Alves, Luiz Carlos, Brayner, Fábio André, Guedes, Duschinka, Ribeiro Duarte, Maciel, Maria Amélia Vieira, Rocha, Cíntia Renata Costa, de Souza Lopes, Ana Catarina. 2011. "Prevalence of the bla (SHV) gene in *Klebsiella pneumoniae* isolates obtained from hospital and community infections and from the microbiota of healthy individuals in Recife, Brazil." *Current microbiology* 62(5):1610-1616.

White, Peter A, Christopher J M C Iver, and William D Rawlinson. 2001. "Integrans and Gene Cassettes in the Enterobacteriaceae." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 45(9):2658-2661.

Woodford, Neil, Jane F Turton, and David M Livermore. 2011. "Multi-resistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance." *FEMS microbiology reviews* 35(5):736-755

Wu, Keh-Ming, Li, Ling-Hui, Yan, Jing-Jou, Tsao, Nina, Liao, Tsai-Lien, Tsai, Hui-Chi, Fung, Chang-Phone, Chen, Hsiang-Ju, Liu, Yen-Ming, Wang, Jin-Tung, Fang, Chi-Tai, Chang, Shan-Chwen, Shu, Hung-Yu, Liu, Tze-Tze, Chen, Ying-Tsong, Shiau, Yih-Ru, Lauderdale, Tsai-Ling, Su, Ih-Jen, Kirby, Ralph, Tsai, Shih-Feng. 2009. "Genome sequencing and comparative analysis of *Klebsiella pneumoniae* NTUH-K2044, a strain causing liver abscess and meningitis." *Journal of bacteriology* 191(14):4492-4501.

Xian-Zhi, Li, and Nikaido Hiroshi. 2009. "Efflux-Mediated Drug Resistance in Bacteria: An Update." *Drugs* 69(12):1555-1623.

Yigit, Hesna, Queenan, Anne Marie, Anderson, Gregory J, Domenech-sanchez, Antonio, Biddle, James W, Steward, Christine D, Alberti, Sebastian, Bush, Karen, Tenover, Fred C. 2001. "Novel Carbapenem-Hydrolyzing β -lactamase, KPC-1, from a Carbapenem-Resistant Strain of *Klebsiella pneumoniae*." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 45(4):1151-1161.

Yu, Zhou, Sean E Reichheld, Leslie Cuthbertson, Justin R Nodwell, and Alan R Davidson. 2010. "Characterization of tetracycline modifying enzymes using a sensitive in vivo reporter system." *BMC biochemistry* 11:34.

Zavascki, Alexandre P, Zoccoli, Cassia M, Machado, Alice B M P, de Oliveira, Kátia R, P, Superti, Silvana V, Pilger, Diogo a, Cantarelli, Vlademir V, Barth, Afonso L. 2010. "KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil: a widespread threat in waiting?" *International journal of infectious diseases* 14(6):e539-e540.

8. ANEXO

Tabela Anexa: Informações e resultados dos isolados clínicos e ambientais utilizados neste estudo.

Isolado	Origem	Fonte	Ano	Perfil de Resistência	MLST	PFGE
KC-01	MA	clínica	2000	PR-01	E	***
KC-02	MA	clínica	2000	PR-01	F	***
KC-03	MA	clínica	2000	PR-01	299	***
KC-04	MA	clínica	2000	PR-03	23	***
KC-05	MA	clínica	2000	PR-17	***	***
KC-06	MA	clínica	***	PR-09	G	***
KC-07	MA	clínica	***	PR-12	H	***
KC-08	MA	clínica	***	PR-13	244	***
KC-09	MA	clínica	2000	PR-02	I	***
KC-10	***	***	***	PR-06	86	***
KC-11	RJ	clínica	2005	PR-04	W	***
KC-12	RJ	clínica	2005	PR-07	37	G
KC-13	RJ	clínica	2005	PR-21	15	***
KC-14	RJ	clínica	2005	PR-03	J	***
KC-15	RJ	clínica	2005	PR-26	11	A
KC-16	RJ	clínica	2005	PR-02	528	***
KC-17	RJ	clínica	2005	PR-01	16	D
KC-18	RJ	clínica	2005	PR-25	11	A2
KC-19	RJ	clínica	2005	PR-11	Q	***
KC-20	RJ	clínica	2005	PR-26	442	***
KC-21	RJ	clínica	2005	PR-01	37	H
KC-22	RJ	clínica	2005	PR-24	664	***
KC-23	RJ	clínica	2005	PR-06	16	E
KC-24	RJ	clínica	2005	PR-25	11	A
KC-25	RJ	clínica	2005	PR-25	11	A
KC-26	RJ	clínica	2005	PR-05	129	I
KC-27	RJ	clínica	2005	PR-04	129	J
KC-28	RJ	clínica	2005	PR-25	11	B
KC-29	RJ	clínica	2005	PR-16	M	***
KC-30	RJ	clínica	2005	PR-03	502	***
KC-31	RJ	clínica	2005	PR-25	16	F1
KC-32	RJ	clínica	2005	PR-25	327	K
KC-33	RJ	clínica	2005	PR-01	R	***
KC-34	RJ	clínica	2005	PR-10	D	T
KC-35	RJ	clínica	2005	PR-01	D	T1
KC-36	RJ	clínica	2005	PR-19	A	Q
KC-37	RJ	clínica	2006	PR-23	11	A
KC-38	RJ	clínica	2006	PR-15	16	F
KC-39	RJ	clínica	2006	PR-25	11	A1
KC-40	RJ	clínica	2006	PR-22	11	A
KC-41	RJ	clínica	2006	PR-14	A	Q1
KC-42	RJ	clínica	2006	PR-18	327	L
KC-43	RJ	clínica	2006	PR-19	A	Q
KC-44	MA	clínica	2006	PR-20	B	S

Isolado	Origem	Fonte	Ano	Perfil de Resistência	MLST	PFGE
KC-45	MA	clínica	2006	PR-11	423	N
KC-46	MA	clínica	2006	PR-20	B	R
KC-47	MA	clínica	2006	PR-25	B	R1
KC-48	MA	clínica	2006	PR-26	423	N1
KC-49	MA	clínica	2006	PR-01	423	N
KC-50	AM	clínica	***	PR-01	360	M1
KC-51	AM	clínica	***	PR-01	360	M
KC-52	AM	clínica	***	PR-01	347	***
KC-53	AM	clínica	***	PR-03	200	***
KC-54	RJ	clínica	2010	PR-08	A	Q2
KC-55	RJ	clínica	2010	PR-26	437	O
KC-56	RJ	clínica	2010	PR-24	437	P
KC-57	RJ	clínica	2010	PR-24	437	P1
KE-01	AM	ambiental	***	PR-01	C	U
KE-02	AM	ambiental	***	PR-07	N	***
KE-03	AM	ambiental	***	PR-04	C	U
KE-04	PA	ambiental	2003	PR-02	S	Z
KE-05	PA	ambiental	2003	PR-02	S	Z
KE-06	PA	ambiental	2003	PR-02	S	Z
KE-07	PA	ambiental	2003	PR-02	315	***
KE-08	PA	ambiental	2003	PR-01	T	***
KE-09	PA	ambiental	2003	PR-05	U	***
KE-10	AM	ambiental	2006	PR-01	O	X
KE-11	AM	ambiental	2006	PR-01	O	X1
KE-12	AM	ambiental	2006	PR-02	P	***
KE-13	AM	ambiental	2006	PR-06	V	***
KE-14	AM	ambiental	2006	PR-03	X	***
KE-15	AM	ambiental	2006	PR-06	Z	***
KE-16	AM	ambiental	***	PR-01	L	V
KE-17	AM	ambiental	***	PR-02	L	V
KE-18	AM	ambiental	***	PR-02	L	V
KE-19	AM	ambiental	***	PR-01	281	***