

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**Perfil de susceptibilidade antimicrobiana *in vitro* de
Klebsiella pneumoniae isoladas de animais domésticos e
silvestres**

ALESSANDRA TAMMY HAYAKAWA ITO

Cuiabá, Mato Grosso, Brasil

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**Perfil de susceptibilidade antimicrobiana *in vitro* de
Klebsiella pneumoniae isoladas de animais domésticos e
silvestres**

Alessandra Tammy Hayakawa Ito

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração: Sanidade Animal da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Mato Grosso para a obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

ORIENTADORA: Professora Doutora Valéria Dutra

Cuiabá, Mato Grosso, Brasil, 2018

FICHA CATALOGRÁFICA

Dados Internacionais de Catalogação na Fonte.

H413p HAYAKAWA ITO, ALESSANDRA TAMMY.
Perfil de susceptibilidade antimicrobiana in vitro de *Klebsiella pneumoniae* isoladas de animais domésticos e silvestres /
ALESSANDRA TAMMY HAYAKAWA ITO. -- 2018
70 f. : il. color. ; 30 cm.

Orientadora: VALÉRIA DUTRA.
Co-orientadora: Luciano Nakazato.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Mato Grosso, Faculdade de Agronomia, Medicina Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Cuiabá, 2018.
Inclui bibliografia.

1. *Klebsiella pneumoniae*. 2. Multirresistência. 3. Perfil de susceptibilidade. 4. MDR. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Permitida a reprodução parcial ou total, desde que citada a fonte.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS
Avenida Fernando Corrêa da Costa, 2367 - Boa Esperança - Cep: 78060900 - CUIABÁ/MT
Tel : +55 65 3615-8627 - Email : cpgvet@ufmt.br

FOLHA DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "Perfil de susceptibilidade antimicrobiana in vitro de *Klebsiella pneumoniae* isoladas de animais domésticos e silvestres"

AUTOR : Mestranda Alessandra Tammy Hayakawa Ito

Dissertação defendida e aprovada em 22/02/2018.

Composição da Banca Examinadora:

Presidente Banca / Orientadora Doutora Valéria Dutra *Valéria Dutra*
Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO

Examinador Interno Doutor(a) Arleana do Bom Parto Ferreira de Almeida *Arleana BPF Almeida*
Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO

Examinador Externo Doutora Isabela de Godoy Menezes *Isabela de Godoy Menezes*
Instituição : Médica Veterinária Autônoma

Examinador Suplente Doutor Ruberlei Godinho de Oliveira
Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO

CUIABÁ, 22/02/2018.

Agradecimentos

À **Deus** primeiramente por todos as minhas conquistas realizadas até neste momento, pois sem ele não teria chegada até aonde estou.

Ao meu **marido Nelson e meu filho Daniel Yuuki** que sempre me apoiaram, tanto nos momentos de alegria e tristeza.

Aos meus pais **Sandra e Nelson**, e aos meus irmãos **Katiúscia e Tadao** e a minha sobrinha **Yasmine** por estarem sempre ao meu lado.

Aos meus familiares, tanto da **família Ito, Hayakawa e Pinheiro Marques de Sousa**, sempre dando os incentivos e me apoiando constantemente para passar para a próxima etapa e por nunca deixarem de acreditar em mim.

Aos meus amigos do **Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular** do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Mato Grosso, e dos amigos que carreguei desde época da graduação, principalmente **Hérica Makino, Thalita Peres e Samar Jarrah** por estar sempre ao meu lado passando pelos momentos de alegria, tristeza, desespero e descontração.

A **Universidade Federal de Mato Grosso** pela oportunidade de ensino e aprendizagem durante esse período de pós- graduação.

À **Professora Dr^a Valéria Dutra e o Professor Dr Luciano Nakazato** pela dedicação, compreensão, paciência e pelo aprendizado proporcionado.

Aos demais professores pela contribuição de ensinamentos.

A todos que fazem parte da minha vida e que estão torcendo pelo meu sucesso.

Muito obrigada!

Perfil de susceptibilidade antimicrobiana de *Klebsiella pneumoniae* isoladas de animais domésticos e silvestres

RESUMO

Klebsiella pneumoniae (*K. pneumoniae*) é um patógeno oportunista responsável por diversos tipos de infecções nosocomiais e é considerado um microrganismo multirresistente. Dados na literatura que forneçam informações a respeito da resistência desse microrganismo a antimicrobianos em amostras de animais são escassos. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil de resistências a antimicrobianos dentro da Medicina Veterinária. Um total de 67 isolados de *K. pneumoniae* provenientes de diferentes sítios de lesão de animais domésticos (39/67) e silvestres (28/67), foram confirmados por sequenciamento do gene 16S rRNA. O maior percentual de isolamento de *K. pneumoniae* foi de isolados de urina com 16% (11/67), pulmão 13% (09/67) e fezes 12% (08/67). No perfil de susceptibilidade foram testados 11 categorias de antibióticos, sendo a maior taxa de resistência ao metronidazol 97% (65/67), ampicilina 94% (63/67), amoxicilina 93% (62/67), sulfonamidas 93% (62/67), colistina 93% (62/67) e nitrofurantoína 88% (59/67). Os que apresentaram menor taxa de resistência foram: meropenem 3% (2/67), imipenem 6% (4/67) e amicacina 16% (11/67). Todos os isolados demonstraram um fenótipo de multirresistência, sendo 100% (67/67) consideradas bactérias multirresistentes (MDR). O resultado deste estudo reforça que os animais são reservatórios de *K. pneumoniae* multirresistentes.

Palavras-chave: *Klebsiella pneumoniae*, multirresistência, perfil de susceptibilidade, MDR.

Antimicrobial susceptibility profile of *Klebsiella pneumoniae* isolated from domestic and wild animals

ABSTRACT

Klebsiella pneumoniae (*K. pneumoniae*) is an opportunistic pathogen responsible for several types of nosocomial infections and is considered a multiresistant microorganism. Data in the literature that provide information regarding the resistance of this microorganism to antimicrobials in animal samples are scarce. Thus, the objective of this work was to evaluate the profile of antimicrobial resistance within Veterinary Medicine. A total of 67 *K. pneumoniae* isolates from different lesion sites of domestic (39/67) and wild (28/67) animals were confirmed by sequencing the 16S rRNA gene. The highest percentage of *K. pneumoniae* isolation was from urine isolates with 16% (11/67), lung 13% (09/67) and faeces 12% (08/67). In the susceptibility profile, 11 categories of antibiotics were tested, with the highest resistance to metronidazole being 97% (65/67), ampicillin 94% (63/67), amoxicillin 93% (62/67), sulfonamides 93% (62 / 67), 93% colistin (62/67), and 88% nitrofurantoin (59/67). The ones with the lowest resistance were: meropenem 3% (2/67), imipenem 6% (4/67) and amikacin 16% (11/67). All isolates demonstrated a multidrug resistance phenotype, with 100% (67/67) considered multiresistant bacteria (MDR). The result of this study reinforces that the animals are reservoirs of multiresistant *K. pneumoniae*.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, multiresistance, susceptibility profile, MDR.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação dos principais antimicrobianos disponíveis para tratamento de infecções bacterianas de acordo com Guimarães et al., (2010).....	13
Tabela 2. Classificação dos grupos de penicilinas (derivados do ácido 6-aminopenicilâmico) de acordo com Guimarães et al., (2010).....	15
Tabela 3. Classificação das cefalosporinas com base na atividade antibacteriana (DE SOUSA, 2006).....	17
Tabela 4. Frequencia de <i>K. pneumoniae</i> isoladas dos animais domesticos e silvestres oriundos de Cuiabá – 2017.....	33
Tabela 5. Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos das amostras de <i>K. pneumoniae</i> através de difusão em ágar.....	34

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	11
2.	Revisão de Literatura	11
2.1	Antimicrobianos	11
2.1.1	B- lactâmicos	14
2.1.1.1	Penicilinas	14
2.1.1.2	Cefalosporinas	15
2.1.1.3	Monobactamas	18
2.1.1.4	Carbapenêmicos	18
2.1.2	Polimixina	18
2.1.3	Nitroimidazóis	19
2.2	Resistência a antimicrobianos e bactérias multirresistentes	19
2.3	Uso de antimicrobianos na Medicina Veterinária	22
2.4	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	26
2.3	Resistência de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	27
3.	MATERIAL E MÉTODO	29
3.1	Aprovação e declarações éticas.....	29
3.2	Isolados	29
3.3	Extração de DNA.....	30
3.4	Reação em Cadeia pela Polimerase	30
3.5	Sequenciamento do DNA	31
3.6	Teste de difusão em disco.....	31
3.7	Análise de perfil de multirresistência	32
3.8	Análise estatística.....	32
4.	RESULTADOS	32
4.1	Isolados	32
4.2	Perfil de susceptibilidade ao antimicrobianos.....	34

4.2.1	Difusão em ágar	34
4.2.2	Análise de perfil de multirresistência	35
5.	DISCUSSÃO	35
6.	CONCLUSÃO.....	39
7.	REFERÊNCIAS	39
8.	APÊNDICE	52
A	Isolados e confirmados de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	52
B	Artigo submetido para Revista Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.....	54
9.	ANEXO.....	68
A	Autorização do comitê de ética animal (CEUA).....	68
B	Avaliação Capes da Revista Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.....	69
C	Página submissão do artigo	70

1. INTRODUÇÃO

As infecções clínicas causadas por bactérias multirresistentes tem causado grande preocupação mundial, sendo considerado um grave problema médico-social. Estão comumente associadas às falhas em terapias, aumento dos custos dos tratamentos e na morbidade e mortalidade de pacientes (PEREIRA et al., 2015).

Uma diversidade de patógenos pode estar relacionada à etiologia dessas infecções. Dentre as bactérias Gram negativas, responsáveis por grande parte das infecções nosocomiais resistentes, a *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*), pertencente à família Enterobacteriaceae, destaca-se pela habilidade de desenvolver mecanismos de resistência enzimáticos e são consideradas grandes responsáveis por diferentes doenças infecciosas (ZIVANORVIC et al., 2017).

As doenças causadas por *K. pneumoniae* geralmente estão relacionadas com o estado imunológico do hospedeiro e sua gravidade muitas vezes é potencializada devido a capacidade patogênica da cepa capaz de criar um fenótipo de multirresistência ao uso exacerbado de antimicrobianos (PEREIRA et al., 2015).

Estudos de resistência de isolados de origem animal são escassos no Brasil, desta forma, o objetivo deste estudo foi investigar o perfil de susceptibilidade à antimicrobianos da *K. pneumoniae* isoladas de animais domésticos e silvestres.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Antimicrobianos

Antimicrobianos ou antibióticos são substâncias químicas que apresentam a capacidade de inibir o crescimento de microrganismos e são indicados para o tratamento de infecções (MOTA et al., 2010). São classificados quanto a sua atividade como bactericidas, quando atuam provocando diretamente a morte do microrganismo, ou bacteriostáticos, quando impedem a replicação do mesmo. Neste ultimo caso, o sistema imune do hospedeiro é o maior responsável por debelar a infecção (DRAWZ e BONOMO, 2010).

Diferentes tipos de enfermidades têm afetado tanto a Medicina Humana, quanto a Veterinária, causando vários surtos, elevando as taxas de mortalidade e morbidade ao longo dos tempos. No ano de 1929, foi descoberto o primeiro antibiótico, penicilina, seguido de outros, como sulfonamidas, estreptomicina, cloranfenicol e tetraciclina (ZAFFIRI et al., 2012).

O uso da terapia antimicrobiana transformou a prática médica e veterinária de uma abordagem centrada no diagnóstico para uma abordagem centrada no tratamento. Com isso, possibilitou à cura de diversas enfermidades, o aumento da expectativa de vida, a prevenção e tratamento de infecções, menor tempo de recuperação das infecções, o que resultou em uma melhora de qualidade de vida. Porém, poucos anos após o advento da utilização dos antimicrobianos, o aparecimento de microrganismos resistentes reduziu muito a eficácia desta nova abordagem (PAPHITOU, 2013)

Mesmo com os avanços no desenvolvimento de novos medicamentos, a produção de novos fármacos antimicrobianos tem diminuído, tanto pela necessidade de alta tecnologia e grandes investimentos em longo prazo, como também longo período para a inclusão de um novo fármaco no mercado, o que pode levar anos após a realização dos ensaios pré-clínicos (O'NEILL J. et al., 2015).

Os principais antimicrobianos de interesse clínico estão inseridos nas seguintes classes: β -lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas, monobactamas, carbapenêmicos e oxapeninas), fencóis, tetraciclinas, polipeptídios, poliênicos, macrolídios, aminoglicosídios, ansamicinas, antracilinas, lincomicinas, nucleosídios, glutarimidas, poliéter ionóforos, nitroimidazol e outros (HARAGUCHI, 2010).

Os principais mecanismos de ação são descritos na tabela 1.

Tabela 1. Classificação dos principais antimicrobianos disponíveis para tratamento de infecções bacterianas de acordo com Guimarães et al., (2010).

Antibióticos	Alvo	Mecanismo de ação
B-lactâmicos Penicilinas Cefalosporinas Carbapênicos Monobactamas	Enzima transpeptidase	Inibição da formação de ligação cruzada entre cadeias de peptidoglicano, impedindo a formação correta da parede celular bacteriana
B-lactâmicos Oxapeninas Sulfoxapeninas	Enzima β -lactamase	Inibição da enzima de resistência bacteriana, que degrada antibióticos β -lactâmicos
Macrolídeos Lincosamidas Estreptograminas (dalfopristina e quinupristina) Cloranfenicol Oxazolidinonas (linezolida)	Subunidade 50S ribossômica	Inibição da síntese proteica bacteriana
Aminoglicosídeos Tetraciclina	Subunidade 30S ribossômica	Inibição da síntese proteica bacteriana
Glicopeptídeos (vancomicina e teicoplanina)	Dipeptídeo terminal D-Ala-D-Ala do peptidoglicano	Complexação com as cadeias peptídicas não ligadas e bloqueio da transpeptidação, impedindo a formação correta da parede celular bacteriana
Peptídeos não ribossomais (bacitracina, gramicidina C, polimixina B)	Membrana plasmática	Afetam permeabilidade da membrana bacteriana por facilitarem o movimento descontrolado de íons através da membrana
Lipodepsipeptídeos (daptomicina)	Membrana plasmática	Afeta permeabilidade da membrana bacteriana e bloqueia síntese de ácido lipoteicoico, componente da membrana externa de bactérias Gram positivo.
Rifampicina	RNA polimerase dependente de DNA	Inibição da síntese de RNA
Fluoroquinolonas	Enzima DNA girase	Bloqueio da replicação e reparo do DNA.
Sulfonamidas	Enzima di-hidropteroato sintetase	Bloqueio da formação de cofatores do ácido fólico, importantes para síntese de ácidos nucleicos

Legenda: RNA- Ácido ribonucleico; DNA- Ácido desoxirribonucleico.

2.1.1 β -lactâmicos

O grupo dos antibióticos β -lactâmicos reúne alguns dos antimicrobianos mais importantes e mais utilizados na prática clínica para o tratamento de infecções hospitalares, pertencendo a esse grupo as penicilinas, cefalosporinas, monobactamas, carbapenêmicos e oxapeninas. A característica comum entre eles é a presença do anel β -lactâmico na estrutura da molécula. O uso de antibióticos β -lactâmicos encontra-se disseminado em razão de sua seletividade, versatilidade e baixa toxicidade (VERDI et al., 2016).

Os antibióticos β -lactâmicos impedem a formação da parede celular da bactéria por inibir enzimas responsáveis por catalisar a biossíntese do peptidoglicano. Esta inibição ocorre devido a uma ligação covalente entre o antibiótico e uma ou mais dessas enzimas denominadas *Penicillin-Binding proteins* (PBS), formado um complexo estável. Conseqüentemente a não formação do peptidoglicano, a bactéria entra em ciclo lítico e morte celular (DA SILVA, 2012).

2.1.1.1 Penicilinas

As penicilinas constituem o primeiro grupo de antimicrobianos indicados para uso na terapia clínica (ZAFFIRI et al., 2012). São compostas por um anel β -lactâmico e um anel de tiazolidina, que juntos dão origem ao ácido 6-aminipenicilânico (6-APA). As penicilinas são facilmente distinguíveis com base na atividade antimicrobiana, em seis grupos, classificado de acordo com o seu tempo de introdução no uso clínico (Tabela 2) conforme Guimarães e colaboradores (2010).

Tabela 2. Classificação dos grupos de penicilinas (derivados do ácido 6-aminopenicilâmico) de acordo com Guimarães et al., (2010).

Grupo	Derivados importantes	Atividades antimicrobianas
Benzilpenicilinas	Procaína, benzatina (formas de longa ação)	Bactérias Gram positivas
Benzilpenicilinas de absorção oral	Fenoximetilpenicilina	Bactérias Gram positivas
Isoxazolilpenicilinas Penicilinas antiestafilocócicas	Cloxacilina, dicloxacilina, oxacilina, metecilina, nafcilina	Atividade contra <i>Staphylococcus aureus</i>
Penicilinas de espectro ampliado (amplo)	Aminobenzil penicilinas (ampicilina, hetacilina, pivampicilina, amoxicilina); amido penicilinas (mecilinam)	Espectro mais amplo do que benzilpenicilinas, porém sensível à β -lactamases
Penicilinas contra <i>Pseudomonas</i>	Ureidopenicilinas (azlocilina, mezlocilina, piperacilina); carboxipenicilinas (carbenicilina, ticarcilina)	Atividade contra <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ; menor contra bactérias Gram positivas
Penicilinas resistentes à β -lactamase	Temocilina	Resistente à β -lactamase

2.1.1.2 Cefalosporinas

Nas cefalosporinas, o anel β -lactâmico se liga ao anel di-hidrotiazina 6, fazendo com que o núcleo da cefalosporina seja inerentemente mais resistente à β -lactamase do que o núcleo das penicilinas, apresenta o ácido 7-aminocefalosporânico (7-ACA) como núcleo central. Todas as cefalosporinas em uso clínico são derivadas semissintéticas do 7-ACA, o qual foi obtido inicialmente de um antibiótico natural, a cefalosporina C, oriundo do fungo *Cephalosporinum acremonium* (atual *Acremonium chrysogenum*) (CRAIG et al., 2015).

Uma das vantagens das cefalosporinas é a estabilidade a β -lactamases, com boa atividade contra proteínas-alvo e boa capacidade de penetração nas paredes das células bacterianas. Atualmente, estão entre os antimicrobianos mais prescritos na prática, por apresentar um amplo espectro, baixa toxicidade, facilidade de administração e perfil farmacocinético favorável (TAVARES, 2009).

São classificados por gerações de acordo com a ordem do desenvolvimento e espectro e possui diferentes drogas (Tabela 3). A mudança de espectro ocorre

devido a alterações na cadeia lateral da estrutura química básica das cefalosporinas (de SOUSA, 2006).

Tabela 3: Classificação das cefalosporinas com base na atividade antibacteriana (de SOUSA, 2006)

Geração	Características	Exemplos	Espectro de ação
Primeira geração	União do acilo do cloreto de ácido, à função aminogénica do 7-ACA, foi as primeiras a ser sintetizadas	Cefalotina Cefaloridina Cefradina Cefadroxil Cefazolina Cefalexina Cefatrizina	Efetiva contra algumas espécies de <i>Staphylococcus</i> e <i>Streptococcus</i> (não é a primeira escolha). Também eficazes contra <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> e <i>Proteus mirabilis</i> . Mais ativas sobre bactérias Gram positivas do que as de 2ª geração.
Segunda geração	Aparece na década de 70, grupo metoximino na posição 7	Cefamandol Cefaclor Cefuroxima Cefonicida Cefoxitina Cefotetan	Mais eficazes contra bactérias Gram negativo produtores de β -lactamases
Terceira Geração	Final da década de 70	Cefotaxima Cefsulodina Ceftazidima Cefoperazona Ceftiaxona Cefixima	Bactérias Gram negativo e Gram positivo; Usado em infeções hospitalares
Quarta Geração	Adição de grupos acídicos nas cadeias introduzidas na posição 7	Cefepime Cefpiroma	Mesma atividade contra Gram negativas, mas mais potentes para Gram positivas do que os de terceira geração. Mais resistentes à degradação por β -lactâmicos
Quinta Geração	Última geração, com enorme potencial devido ao seu espectro de ação contra bactérias multirresistentes. Mecanismo de ação ligeiramente diferente dos restantes β -lactâmicos	Ceftaroline Ceftobiprole	Atividade contra estafilococos meticilino-resistentes Sem ação contra <i>Pseudomonas</i>

2.1.1.3 Monobactamas

É o primeiro β -lactâmico monocíclico, que apresenta um anel β -lactâmico simples, sem o anel tiazolidina. São derivados do ácido 3-aminomonobactâmico (3-AMA) e têm como principal representante o aztreonam, que é análogo sintético originado de uma espécie de *Streptomyces*. (GUIMARÃES et al., 2010).

2.1.1.4 Carbapenêmicos

Contém um anel β -lactâmico fusionado com um anel pirrolidínico compartilhado uma molécula de nitrogênio, sendo considerados os β -lactâmicos de maior espectro de ação. Os carbapenêmicos (imipenem, meropenem e ertapenem) são os antimicrobianos de escolha para o tratamento de infecções por enterobactérias resistente aos antimicrobianos de primeira linha, ou seja, as produtoras de β -lactamases de espectro estendido (ESBL) (BRADFORD, 2001; XIA et al, 2017). Os carbapenens são ativos contra quase todos os cocos ou bastonetes aeróbicos ou anaeróbicos Gram positivos ou Gram negativos clinicamente importantes. Desde o surgimento de bactérias multirresistentes produtoras de ESBL, os carbapenêmicos representam uma das únicas alternativas terapêuticas, sendo frequentemente utilizados no tratamento de infecções graves, por sua estabilidade frente às ESBLs. Além disso, apresentam amplo espectro de ação e são bem aceitos pelos pacientes (NORDMANN et al., 2011; SHENG et al., 2012).

2.1.2 Polimixina

As polimixinas são antimicrobianos polipeptídicos cíclicos, que agem diretamente com o lipídeo A, componente do lipopolissacarídeo (LPS) que está presente na membrana externa de organismos Gram negativos. São descritas cinco tipos de polimixinas (A a E), mas somente duas delas são utilizadas na prática clínica: a polimixina B e a polimixina E, também denominada colistina (JEANNOT et al., 2017).

Uma das desvantagens dessa classe de antibióticos é o índice de toxicidade, podendo levar a reações adversas com quadros neurológicos e renais, o que levou ao desuso na Medicina Humana, aliado a disponibilidade de outros antimicrobianos que traziam sucesso terapêutico com menor índice de toxicidade, e na Medicina

Veterinária era muito utilizada em animais de produção e animais domésticos (LANDMAN et al., 2008).

Com o aumento da multirresistência bacteriana e da emergência de organismos extensivamente resistentes, e a diminuição da eficácia de outros antimicrobianos menos tóxicos, foi reintroduzido o uso da polimixina na terapia humana, foi criada estratégia a fim de minimizar a ocorrência de eventos adversos dos medicamentos para tentar amenizar o sua toxicidade (JEANNOT et al., 2017).

2.1.3 Nitroimidazóis

Os nitroimidazóis são compostos heterocíclicos com base em núcleos de cinco membros, que após a entrada na célula do fármaco sofrem uma reação de redução no grupo de nitro e originam vários produtos intermediários instáveis, inclusive compostos antibacterianos. A reação de redução ocorre em condições anaeróbicas. Os compostos intermediários instáveis interagem com o DNA de bactérias e protozoários, lesionando a estrutura helicoidal e provocando dano ao filamento, com isso inibe a síntese de ácido nucleico e provoca a morte do microrganismo. Os metronidazóis são amplamente utilizadas na Medicina Veterinária em animais de companhia, porém devido ao potencial carcinogênico, atualmente o uso é proibido em animais de produção (GUARDABASSI e KRUSE, 2008).

2.2 Resistência a antimicrobianos e bactérias multirresistentes

A medida que iniciou o uso dos antibióticos na terapia clínica, apareceram rapidamente os primeiros relatos de casos de resistência bacteriana. Com o passar dos anos, novos antimicrobianos começaram a ser sintetizados pela indústria farmacêutica para uso em terapia clínica. Contudo, os microrganismos criaram mecanismos de resistência, tornando-se capazes de sobreviver perante esses compostos (SILVA, 2012).

Sendo assim as bactérias podem adquirir a resistência ou ser intrinsecamente resistentes a determinado antimicrobiano. A resistência adquirida ocorre quando populações inicialmente susceptíveis de bactérias se tornam resistentes a um agente antibacteriano, podendo proliferar-se e espalhar-se sob a pressão seletiva do uso desse agente. A resistência intrínseca a uma ou mais classes de antibióticos é

caracterizada por todas as cepas da mesma espécie apresentar resistência a todos os representantes de uma determinada classe de antimicrobianos (TENOVER, 2006).

Os principais mecanismos de ação pelos quais as bactérias se tornam resistentes são: mutações em genes cromossômicos, aquisição de material genético por transferência horizontal de genes, alteração do sítio alvo ao qual o agente antibacteriano se liga, produção de enzimas que inativam o agente antimicrobiano, alteração de permeabilidade seletiva da membrana externa ou expressão de bombas de efluxo que expõem o fármaco da célula (MUNOZ-PRICE e QUINN, 2009).

A dinâmica do surgimento e disseminação da resistência bacteriana aos antibióticos envolve diversos fatores que interagem e contribuem para a seleção de bactérias. No entanto, como chave para a evolução bacteriana, talvez, o principal fator seja a impressionante capacidade das bactérias em mobilizar genes de resistência (FROST et al., 2005)

A mobilização de genes de resistência pode ocorrer de uma célula bacteriana para outra (transmissão horizontal), por plasmídeos e transposons mobilizáveis ou conjugativos, como também num mesmo genoma (recombinação), por transposons, cassetes gênicos em integrons e sequências de inserção. Esses últimos elementos podem estar inseridos em plasmídeos ou transposons, sendo assim, transferíveis para outras bactérias (BOERLIN e REID-SMITH, 2008).

São vários eventos genéticos que pode levar a uma resistência aos antibióticos, uma delas é a mutação em genes que passam a conferir resistência e transmissão horizontal de genes de resistência. Mesmo que a mutação tenha papel importante e muita primordial, a transmissão horizontal é determinante para a disseminação de genes de resistência, pois contribui marcadamente para selecionar bactérias com multirresistência (SNYDER e CHAMPNESS, 2007; HAWKEY, 2008).

Uma das formas de sobrevivência de bactéria sob pressão seletiva de antibióticos de diferentes classes é a presença de elementos genéticos móveis com a mobilização de múltiplos genes (SNYDER e CHAMPNESS, 2007; CARATTOLI, 2009).

A associação dos plasmídeos conjugativos com a utilização empírica inadequada de antibióticos (irregularidade, subdosagem, baixa absorção dos medicamentos, dentre outros fatores), foi e continua sendo os principais fatores que

causam surtos de resistência por microrganismos multirresistentes (QUEENAN e BUSH, 2007; CARATTOLI, 2009; LEAVITT, et al., 2010).

Os microrganismos multirresistentes são aqueles resistentes a quase todas as classes de antimicrobianos testados em exames microbiológicos. De acordo com Magiorakos et al. (2012), são definidas em três categorias para resistência adquirida para bactérias: multirresistentes (*Multidrug-resistant*, MDR), extensivamente resistente (*Extensively drug-resistan*, XDR) e pan-resistentes (*Pandrug-resistant*, PDR). As MDR foram definidas como resistência a pelo menos um agente em três ou mais categorias antimicrobianas; bactérias XDR são resistentes a pelo menos um agente em todas as categorias de antimicrobianos com exceção de dois ou menos (ou seja, isolados bacterianos permanecem suscetíveis a apenas um ou duas categorias); e PDR são definidas como resistentes a todos os agentes em todas as classes antimicrobianas. No entanto, para a validação dessas definições, tais autores agruparam categorias de antimicrobianos para cada microrganismo, a fim de selecionar aqueles com relevância terapêutica, determinar um número adequado de fármacos a ser testado e comparação com banco de dados.

As infecções clínicas causadas por bactérias multirresistentes causam grande preocupação mundial e é considerado um grave problema médico-social (LIANG et al., 2017). No Brasil, as infecções hospitalares representam a quarta maior causa de mortalidade (SILVA, 2012). A resistência aos antimicrobianos é um grave problema de saúde pública, comumente associada às falhas em terapias, aumento dos custos dos tratamentos e na morbidade e mortalidade de pacientes (NÓBREGA e BROCCCHI, 2014).

Uma diversidade de patógenos de bactérias conhecidas como multirresistentes pode estar relacionada à etiologia dessas infecções, geralmente causadas por bactérias Gram negativas β -lactamase não fermentadores de glicose como a *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* e espécies da família Enterobacteriaceae, como a *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* e *K. pneumoniae*. Mas existem casos de Gram positivos multirresistentes como o *Staphylococcus* spp. e *Enterococcus* spp (ZIVANORVIC et al., 2017).

As bactérias resistentes têm sido alvo de grande preocupação tanto na Medicina Humana e Veterinária. O uso de antimicrobianos em animais de produção e sua associação com a emergência de bactérias resistentes na cadeia alimentar vem sendo um grande problema. Vários autores tem relatado bactérias

multirresistentes em cadeia produtiva, já sendo descrito em leite mastítico (LOCATELLI et al., 2010), produtos cárneos (SUNDE et al., 2009), aves (HIROI et al., 2011), equinos (RANKIN et al., 2005), suínos (ZOU et al., 2011) e ambiente (ARIAS; DE MAIO CARRILHO, 2012). O uso de antimicrobianos como aditivos melhoradores de desempenho e o uso para tratamento sistêmico dos animais de produção colabora com a manutenção de genes relacionados à resistência a antibióticos e favorece a seleção de isolados multirresistentes no ambiente, pois os resíduos são eliminados via leite, fezes e urina dos animais (BENGTSSON et al., 2009; JECHALKE et al., 2014; BINH et al 2018).

São vários os fatores que contribuíram com o aumento desta resistência, como o uso abusivo de antimicrobianos em seres humanos e animais, e a eliminação incorreta dos medicamentos e o tratamento inadequado de esgoto. Para tentar minimizar o problema, os profissionais da saúde, produtores, autoridades de saúde e a companhias farmacêuticas devem implementar medidas adequadas que diminuam a transmissão da resistência, levando em consideração a epidemiologia das bactérias, a interação entre seres humanos e animais, o uso correto de antimicrobianos em todas as espécies, aplicação de princípios gerais de controle de infecção, práticas modernas de criação e abate de animais, manipulação e preparo adequado dos alimento (WEESE e DUIJKEREN, 2010).

2.3. Uso de antimicrobianos na Medicina Veterinária

Na Medicina Veterinária, o primeiro trabalho científico relacionado com o uso de antibióticos em animais foi publicado em 1949, onde foi observado o efeito benéfico do uso de clortetraciclina em níveis subterapêuticos para aves, melhorando o seu crescimento e a saúde dos animais (GUARDABASSI; KRUSE, 2008).

Desde então, tem se utilizado na medicina de animais de companhia, silvestres e animais de produção de forma terapêutica, metafilática, profilática e como aditivo melhorador de desempenho animal (ARIAS; DE MAIO CARRILHO, 2012).

Alguns fármacos antibacterianos foram desenvolvidos especificamente para a saúde e produção animal (tilosina, tiamulina, tilmicosin, ceftiofur, tulatromicina).

Porém, na maioria das vezes têm sido utilizados os fármacos que foram desenvolvidos para o uso em medicina humana (GIGUÈRE, 2013).

As razões para o uso de antimicrobianos em Medicina Veterinária são para promover o bem estar animal, prevenção da propagação epidêmica de doenças infecciosas, melhora no desempenho animal, prevenção da transferência de zoonoses, segurança de produtos de origem animal e a prevenção de doenças transmitidas por alimentos (UNGEMACH et al., 2006).

Os antibióticos usados como aditivos melhoradores de desempenhos promove um ganho econômico para obter maior produtividade e maior crescimento, aumentar a eficiência de utilização da dieta, melhorar a saúde e a resistência a doenças e diminuir mortalidade (GONZALES; DE CARVALHO MELLO; CAFÉ, 2012).

Geralmente os antibióticos utilizados como aditivos na alimentação animal são de amplo espectro de ação sobre bactérias, têm o seu uso restrito a essa finalidade e possuem baixa absorção intestinal o que evita a deposição nos produtos consumíveis pelo homem (GONZALES; DE CARVALHO MELLO; CAFÉ, 2012).

No Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) é o órgão responsável para fiscalizar o uso de aditivos na alimentação animal, possui a Lei 6.198, de 26/12/1974 que regulamenta o uso de aditivos na alimentação e existem várias normativas do MAPA para evitar o uso indiscriminado de antibióticos na alimentação dos animais. Foi criado recentemente o Plano de Ação Nacional para Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos (AgroPrevine) preconizado pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), Organização Mundial da Saúde (OMS) e Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO). O AgroPrevine tem como objetivo fortalecer as ações de prevenção e controle da resistência aos antimicrobiano na agropecuária, considerando a saúde pública, que vai estabelecer a interdependência entre a saúde humana, animal e ambiental, utilizando como ferramentas a educação sanitária, vigilância e defesa agropecuária. Não pode ser utilizado antibiótico de uso humano e veterinário para melhorar o desempenho animal. Essa atitude já esta bem consolidada no setor privado de carne, leite e ovos (MAPA, 2017).

Muitos países estão banindo o uso de antibióticos para melhoramento de desempenho na pecuária. A União Européia vetou desde 2006 o uso de antibióticos

e muitos mercados exportadores tiveram que se adaptar a legislação estabelecida por esse bloco para continuar a exportar (BEZERRA et al., 2017).

Com o banimento completo do uso destes aditivos estima-se que os prejuízos decorrentes seriam de elevado impacto econômico. Estudo realizado por Salois et al. (2016) que analisaram quais seriam os impactos ambientais e econômicos diante da retirada de antibióticos da produção de frangos de corte, que concluíram que essa ação causaria reflexo negativo na conservação de recursos naturais, bem como prejuízo econômico ao consumidor, pois levaria um aumento no custo de produção, tornando maiores os preços de aquisição de matéria prima para a produção de alimentos, retardando o desenvolvimento desses animais pela diminuição da conversão alimentar.

Os antibióticos são essenciais para tratar doenças infecciosas e manter a saúde animal, e para tentar inibir o uso destes antibióticos em animais de produção deve-se investir no controle do sistema de produção, sanidade e biossegurança. Alternativas também podem ser implementadas como a combinação de vacinas, bacteriófagos aliados à suplementação com ácidos orgânicos, probióticos, prebióticos, produtos naturais (extratos de plantas, temperos naturais, óleos essenciais), enzimas digestivos e complexos minerais orgânicos (ALLEN et al., 2013; DIAZ-SANCHEZ et al., 2015). Porém, isso levaria a um aumento no custo final do produto, além do que a eficácia depende de uma combinação entre essas alternativas (SARTORI et al., 2007).

Uma das preocupações é o destino dos antibióticos no ambiente, e especialmente os antibióticos utilizados na criação de animais. São milhares de toneladas por ano de antibióticos que são excretados pela criação de animais. Os medicamentos administrados, os seus metabolitos ou produtos de degradação atingem o ambiente terrestre e aquático através de dejetos de animais e humanos ou substâncias que foram utilizadas na agricultura, levando a uma contaminação ambiental. Alguns antibióticos parecem persistir muito tempo no ambiente, especialmente no solo, enquanto outros degradam muito rápido. Uma das principais preocupações em relação ao uso excessivo de antibióticos na produção pecuária é a potencialização dos mecanismos de resistência dos antibióticos e diminuição a sua eficiência terapêutica (BINH et al., 2018; COMBER et al., 2018).

Na comunidade científica existe uma grande discussão sobre o uso de antibióticos na Medicina Veterinária proporcionarem uma transferência de

resistência para as bactérias emergentes humanas. Muitos autores concordam com esta afirmação (ORDEN GUTIÉRREZ e DE LA FUENTE LÓPEZ, 2001; GIMENO e ORTEGA, 2005; JECHALKE et al., 2014; COMBER et al., 2018; BINH et al., 2018) que esta transferência de resistência para o homem ocorreria por meio do alimento e água. O primeiro relato documentado foi no ano de 1975, com a utilização da clortetraciclina como aditivo de melhorador de desempenho em frangos, com isso teve um aumento de *Escherichia coli* resistentes à tetraciclina nestas aves, e a mesma resistência foi encontrada no trato gastrointestinal da família que habitava essa fazenda e que se alimentava destas aves (ROLAIN, 2013). Uma das justificativas é que o uso de aditivos melhoradores de desempenho exerce forte pressão seletiva sobre os patógenos e a microbiota saprófita. Com isso ocorre o aparecimento de resistência através da codificação de genes para resistência antimicrobiana pela ação dos transposons e plasmídeos. Por meio da análise molecular desses genes, foram encontrados elementos idênticos em animais e seres humanos (GUIMARÃES et al., 2010). No estudo realizado por Arias e de Maio Carrilho do ano de 2012 foi observado que houve transferência de patógenos resistentes aos seres humanos através do contato direto com animais ou através do consumo de alimentos ou água contaminados, ou seja, pode ocorrer esta troca de microbiota de animais para a microbiota de humanos. Em contrapartida, outros autores (PHILLIPS et al., 2004; SORENSEN et al., 2001) afirmam que mesmo com a eliminação do uso de antimicrobianos em animais de produção, não vai ocorrer a diminuição da resistência aos antimicrobianos se continuar o uso de forma imprudente na terapia da Medicina Humana.

O obstáculo principal para determinar se as bactérias resistentes provenientes de fontes animais representam uma ameaça para a saúde humana é a dificuldade na detecção de todas as etapas, partindo do animal até a chegada da doença em humanos. Esta dificuldade se dá pelo fato de que tanto animais quanto os seres humanos recebem o mesmo tipo de antimicrobianos e são colonizados por espécies bacterianas comuns ou intimamente relacionadas e seus ambientes não são separados (GUARDABASSI; KRUSE, 2008).

Para diminuir o uso indiscriminado dos antibióticos, deve-se ter conhecimento do perfil de susceptibilidade em isolados humanos e animais para tratamento adequado, diminuindo o período médio internação (ROSSI e ANDREAZZI, 2005).

2.4 *K. pneumoniae*

Primeira descrição do gênero *Klebsiella* foi no ano de 1885 por Trevisan e foi designado em homenagem ao microbiologista alemão Edwin Kleb, sendo que em 1887 foi descrita a espécie *K. pneumoniae* (MARTINEZ E MARTINEZ, 2004).

A *K. pneumoniae* pertence ao filo Proteobacteria, classe Gammaproteobacteria, ordem Enterobacteriales, família Enterobacteriaceae. O gênero *Klebsiella* contém cinco espécies sendo elas a *K. alba*, *K. granulomatis*, *K. michiganensis*, *K. oxytoca*, e *K. pneumoniae*. Esta última foi subclassificada em três subespécies: *K. pneumoniae* subespécie *ozaenae*, *K. pneumoniae* subespécie *rhinoscleromatis* e a *K. pneumoniae* subespécie *pneumoniae* sendo esta a mais observada em infecções em humanos e animais (DWORKIN et al., 2006).

K. pneumoniae é um bacilo Gram negativo, não esporulado, aeróbio facultativo, com tamanho aproximado de 0,3 x 1,5 µm a 0,4 x 2,0 µm. Pode ser visualizado em células únicas, pares ou cadeias curtas. Possui a capacidade de degradar a lactose, não possui a enzima citocromo oxidase e nem produz gás sulfídrico (H₂S). Contém a enzima lisina descarboxilase e utiliza o citrato como única fonte de carbono. Não há degradação do triptofano, sendo negativo na prova do indol, imóvel e urease positiva. Em meios de cultura para isolamento como no Ágar MacConkey, possui uma característica mucoide (figura 1) devido a grande produção de cápsula polissacarídeo (POEHLEIN; NAJDENSKI; SIMEONOVA, 2017).

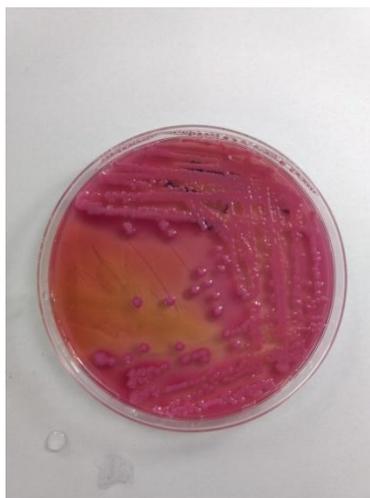


Figura 1. Isolamento de *K. pneumoniae* em ágar MacConkey

Fonte: Arquivo pessoal

Este gênero encontra-se distribuído no meio ambiente, como rios, esgoto, solo, vegetação, mucosas, principalmente do trato gastrointestinal na maioria dos animais, incluindo os seres humanos (PEREIRA et al., 2015).

A relação deste organismo extracelular com humanos varia desde colonização até infecções. No ambiente hospitalar a principal transmissão se dá por equipamentos contaminados com sangue, conteúdo do trato gastrointestinal dos pacientes e mãos não higienizadas dos profissionais de saúde. Existem muitos relatos de surtos, principalmente em Unidades Intensivas e Neonatais (NOGUEIRA et al., 2009).

As infecções mais frequentes são: bacteremias, infecções do trato urinário, pneumonia, dermatite, rinite crônica atrófica, artrite, enterite, meningite em crianças e sepse. Os microrganismos usualmente fazem parte da microbiota da pele, nasofaringe e principalmente o trato gastrointestinal dos indivíduos (PITOUT; NORDMANN; POIREL, 2015).

As principais condutas terapêuticas para evitar ou eliminar casos de *K. pneumoniae* deve ser cura do paciente, desinfecção, sanitização do ambiente hospitalar e o isolamento de doentes afetados com a bactéria.

Os principais antibióticos utilizados para o tratamento são a penicilinas como a ampicilina, os β -lactâmicos associado com outras drogas como a amoxicilina mais o ácido clavulânico, cefalosporinas de terceira geração, os monobactamas, os carbapenêmicos como o imipenem, os aminoglicosídeos, as tetracilinas como a doxiciclina, as fluorquinolonas, nitrofurantoína, anfenicóis (CLSI, 2016).

2.4.1. Resistencia de *K. pneumoniae*

As doenças causadas por *K. pneumoniae* geralmente estão relacionadas com o estado imunológico do hospedeiro (PEREIRA et al., 2015) e sua gravidade muitas vezes é potencializada devido a capacidade patogênica da cepa capaz de criar um fenótipo de multirresistência ao uso exacerbado de antimicrobianos (SILVA; LINCOPAN, 2012).

As infecções causadas por microrganismos multirresistentes na maioria das vezes não respondem à terapia convencional e isso prolonga a duração da doença, podendo levar a óbito (TIAN et al., 2016).

O mecanismo de resistência a β -lactâmicos da *K. pneumoniae* ocorre através da diminuição da expressão de porinas, aumento da expressão bombas de efluxo e produção de enzimas β -lactamases que tem sido apontada como o principal mecanismo de resistência (JACOBY G. A.; MILLS D. M.; CHOW N., 2004)

As β -lactamases são classificadas em diferentes formas, baseado no seu espectro hidrolítico, susceptibilidade a inibidores e sua localização genética. A produção de β -lactamase tipo *AmpC* pode levar a resistência a cefoxitina, e de carbapenemases, como as metalo- β -lactamases (MBL) e carbapenemases tipo KPC (PEIRANO et al., 2009).

A *K. pneumoniae* principalmente *K. pneumoniae* carbapenemase (KPC) é capaz de provocar resistência de até 95% dos antimicrobianos existentes no mercado farmacêutico, pois produz uma enzima que confere resistência a diversas classes de antibióticos como aminoglicosídeos, fluorquinolonas e principalmente aos β -lactâmicos, como os carbapenêmicos e os que produzem β -lactamases de espectro estendido (ESBL) tornando assim, as opções de tratamento muito restritas (TIAN et al., 2016).

A enzima KPC pode ser diferenciada em KPC-1 a 9: KPC-1 e KPC-2 isolados em *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *Salmonella entérica* e em *Enterobacter* sp.; KPC-3 em *K. pneumoniae* e *Enterobacter cloacae*; KPC-4 foi encontrada em isolados de *K. pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*; KPC-5 foi descrito em cepas de *P. aeruginosa*; KPC-6, 7 e 8 isoladas de *K. pneumoniae* e KPC-9 encontradas em *Escherichia coli* (ZANOL, 2017).

As metodologias que são utilizadas para a detecção da enzima KPC englobam tanto testes fenotípicos, como moleculares. Dentre métodos fenotípicos podem ser utilizados os testes de Hodge-modificado, Disco Difusão e E-test, já os testes moleculares para pesquisa do gene *bla KPC* pode ser utilizada as técnicas de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e a ribotipagem (CLSI, 2016).

Os diferentes genes de carbapenemase que circulam dentro de *K. pneumoniae* são frequentemente transportados por estruturas móveis, incluindo plasmídeos e transposons, portanto, podem se espalhar eficientemente para diferentes membros da família Enterobacteriaceae, com a presença do clone de resistência possuem a tenacidade e flexibilidade para acumular e trocar genes de resistência e virulência com outras bactérias (PITOUT; NORDMANN; POIREL, 2015).

K. pneumoniae destaca-se pela habilidade de desenvolver mecanismos de resistência enzimáticos e sua aquisição e associação de fatores de virulência. Os componentes principais destes fatores são as adesinas, fímbrias, metabolismo de alantoína, lipopolissacarídeo (LPS), sistemas de busca ativa de ferro (sideróforos) e a cápsula de polissacarídeos, sendo a cápsula de polissacarídeos um dos principais mecanismos que leva a resistência em todos os grupos de antimicrobiano (LEE et al., 2015).

No caso de infecções causadas por cepas de *K. pneumoniae* multirresistentes, a identificação de possíveis surtos deve ser realizada o mais prontamente possível, a fim de servir como ferramenta de auxílio nas medidas de controle de infecções. Diferentes técnicas moleculares têm sido utilizadas para se definir o diagnóstico, sendo uma delas a determinação da relação clonal entre as cepas encontradas em diferentes partes do mundo (PITOUT; NORDMANN; POIREL, 2015).

Os fatores de virulência apresentado por determinados isolados podem estar associados à prevalência de um determinado clone ou grupo clonal (PEREIRA et al., 2015).

Devido à importância da *K. pneumoniae*, tanto na Medicina Veterinária e Humana, são necessários estudos que investiguem o perfil de susceptibilidade a antimicrobianos para averiguar a multirresistência desta bactéria dentro do Estado de Mato Grosso.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Aprovações e declarações éticas:

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) sob número 23108.236834/2017-13 (Anexo A).

3.2 Isolados

Os isolados foram oriundos de amostras biológicas recebidos e processados no Laboratório de Microbiologia do Hospital Veterinário da UFMT em 2016 e 2017.

Um total de 67 isolados foram obtidos de diferentes sítios de isolamento de animais domésticos e silvestres tanto de vida livre e cativo (Apêndice A).

Os materiais foram semeados em Ágar sangue ovino a 8% (Sigma-Aldrich) e Ágar MacConkey (Neogen Corporation), em aerobiose, incubadas a 37°C por até 72 horas, sendo feita a leitura das placas em 24, 48 e 72 horas. A identificação das colônias foi realizada de acordo com Quinn et al. (1994), através de morfologia, coloração de Gram, prova da catalase, teste de oxidase e séries bioquímicas como o Triplo Sugar Iron (TSI), Sulfeto Indol Motilidade (SIM), Teste OF (GOF), Citrato, Manitol, Inusitol e Uréia.

3.3 Extração de DNA

Após isolamento e a identificação da colônia, foi extraído o DNA genômico dos isolados através da inoculação de uma colônia em Caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI) e incubado sob agitação a 37°C *overnight*. Após centrifugação o precipitado foi ressuspensão em 1mL tampão de lise (100mM NaCl, 25mM EDTA, 100mM Tris-HCl pH 8,0, 0,5% SDS, 0,1mg Proteinase K), e foi tratado pelo método de fenol-clorofórmio de acordo com o Sambrook e Russel (2004). Os tubos foram agitados em vórtex e centrifugados a 10.000 X g por 5 min. A fase aquosa foi transferida para outro tubo e adicionada um volume de isopropanol gelado e acetato de sódio 0,3 M. O DNA foi coletado por centrifugação a 10.000 X g por 5 min, descartado o sobrenadante e foi lavado com etanol 70%. O DNA foi novamente coletado por centrifugação a 10.000 X g por 5 min e o sobrenadante foi descartado. O DNA foi ressuspensão com 50 µl de água ultra pura. A integridade e qualidade do DNA extraído foram verificadas por eletroforese à 100V por 40min em gel de agarose 1,5% corado com *Gel Red* (Biotium) e foi visualizada no ChemiDoc™ XRS utilizando o software ImageLab™®. O material foi armazenado à -20°C até a utilização nos testes moleculares.

3.4 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

Os DNAs extraídos foram submetidos à PCR para o gene 16 S Ribossomal Ácido Ribonucleico (16S rRNA) para confirmação da espécie. A sequência de oligonucleotídeos utilizada foi 27 Forward: AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG

(LANE, 1991) e 1492 Reverse: GGT TAC CTT GTT ACG ACT T (TURNER et al., 1999) que amplifica um fragmento de 1512 pares de base (pb).

Cada reação foi composta de 10ng de DNA genômico, 0,4 pmol de cada oligonucleotídeo, 0,2mM de *deoxynucleoside triphosphates* (dNTPs), 3mM de MgCl₂, 1x PCR *buffer* 10x (200mM Tris-HCL pH 8.4 e 500mM KCl), 1U de taq DNA polimerase (Invitrogen) e completar com água ultrapura para volume final de 25 µL. As reações foram amplificadas em um termociclador My CyclexTM (Biorad) com desnaturação inicial de 5 minutos a 95°C, sucedido de 35 ciclos de desnaturação por 45 segundos a 95°C, hibridização por 1 minuto a 52°C e 1 minuto e 30 segundos a 72°C de extensão, sendo concluída com um ciclo de extensão final a 72°C por 7 minutos. Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,0%, corado com Gel RedTM (Biotium®) a 10 V/cm e visualizados em fotodocumentador ChemiDocTM XRS utilizando o *software* Image LabTM. O marcador de massa molecular empregado foi o Lambda/Hind III (Ludwig).

3.5 Sequenciamento do DNA

Posteriormente, o produto obtido pela PCR foi purificado com o Kit *ExoProStarTMS* (GE Healthcare Life Sciences *illustraTM*) e foi utilizado na reação de sequenciamento, juntamente com o *BigDye Terminator Ready Reaction Cycle Sequencing* (Applied Biosystems) no sequenciador automático ABI 3500 *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems). As sequências foram confrontadas com o banco de dados do GenBank usando o BLAST no servidor NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), sendo selecionados os isolados que tiveram identidade de no mínimo 97% (STACKEBRANDT e GOEBEL, 1994) com a *K. pneumoniae* para a realização do teste de susceptibilidade.

3.6 Teste de difusão em disco

O teste de susceptibilidade aos antimicrobianos foi realizado pelo método de difusão em disco como descrito pelo Bauer e Kirb (1966), sendo testadas 11 categorias de antibióticos; os β-lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos), aminoglicosídeo, quinolonas, anfenicol, tetracíclicos, polimixina, nitroimidazol, nitrofuranos e sulfonamidas. Os discos testados foram: ampicilina

(10µg), amoxicilina (10µg), amoxicilina com ácido clavulânico (30µg), amicacina (30µg), gentamicina (10µg), neomicina (30µg), cefalexina (30µg), ceftiofur (30µg), enrofloxacina (5µg), ciprofloxacina (5µg), marbofloxacina (5µg), imipinem (10µg), meropenem (10µg), cloranfenicol (30µg), doxiciclina (30µg), colistina (10µg), metronidazol (50µg), nitrofurantoína (300µg), sulfonamidas (300µg) e sulfonamidas com trimetoprim (25µg). Foram classificados de acordo com os critérios do *Clinical and Laboratory Standards Institute* – CLSI (2016) sendo que os que apresentaram como parcialmente sensíveis foram agrupados como resistentes.

3.7 Análise de perfil de multirresistência

Os isolados foram classificadas quanto ao perfil de resistência como descrito por Magiorakos et al. (2012), na qual é definida como bactéria multirresistente a drogas (MDR) quando possui resistência a um ou mais agente em três ou mais classes de antimicrobianos.

3.8 Análise Estatística

Os dados obtidos foram tabulados e analisados de forma descritiva e pelo método de distribuição de frequência percentual.

4 RESULTADOS

4.1 Isolados

Foram confirmadas 67 amostras como *K. pneumoniae* pelo sequenciamento, sendo 58% (39/67) isoladas de animais domésticos e 42% (28/67) de animais silvestres (Tabela 4). A distribuição entre as espécies animais foram caninos 41% (16/39), equinos 21% (8/39), bovinos 18% (7/39) felinos 13% (5/39), suínos 5% (2/39) e roedor 2% (1/39)(Tabela 4).

Tabela 4. Frequencia de *K. pneumoniae* isoladas dos animais domesticos e silvestres oriundos de Cuiabá - 2017

	Hospedeiro (Nome popular)	Hospedeiro (Nome científico)	Total
Domésticos (n=39)	Canina	<i>Canis lupus familiaris</i>	16
	Equina	<i>Equus caballus</i>	8
	Bovina	<i>Bos taurus</i>	7
	Felina	<i>Felis catus</i>	5
	Suína	<i>Suis scrofa domesticus</i>	2
	Roedor	<i>Rattus norvegicus</i>	1
Silvestres (n=28)	Tucano-toco	<i>Ramphastos toco</i>	2
	Gavião-caboclo	<i>Buteogallus meridionalis</i>	1
	Arara-canindé	<i>Ara ararauna</i>	3
	Roselha do leste	<i>Platycercus euimius</i>	1
	Arara azul	<i>Anodorhynchus hyacinthinus</i>	6
	Urutau	<i>Nyctibius griséus</i>	2
	Pato do mato	<i>Cairina moschata</i>	1
	Papagaio verdadeiro	<i>Amazona aestiva</i>	1
	Socó	<i>Tigrisoma lineatum</i>	1
	Jibóia-constrictora	<i>Boa constrictor</i>	1
	Jacaré	<i>Caiman yacare</i>	1
	Onça parda	<i>Puma concolor</i>	1
	Macaco prego	<i>Sapajus apela</i>	1
	Cachorro do mato	<i>Cerdocyon thous</i>	2
	Quati	<i>Nasua nasua</i>	2
Tamanduá bandeira	<i>Myrmecophaga tridactyla</i>	1	
Anta	<i>Tapirus terrestres</i>	1	

Os isolados foram obtidos de diferentes sítios de isolamento, sendo 22 locais diferentes: urina 16% (11/67), pulmão 13% (09/67), fezes 12% (08/67), suabe otológico 7% (05/67), suabe cavidade oral 6% (04/67), suabe ocular 6 % (04/67), fígado 4% (03/67), lesão de membro ulcerativa 4% (03/67), saco aéreo 4% (03/67), pele 4% (03/67), lavado traqueobrônquico 3% (02/67), intestino 3% (02/67), coração 1% (01/67), encéfalo 1% (01/67), ingluvío 1% (01/67), leite 1% (01/67), líquido articular 1% (01/67), liquido torácico 1% (01/67), líquido abdominal 1% (01/67), placenta 1% (01/67), suabe de cloaca 1% (01/67) e suabe nasal 1% (01/67).

4.2. Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos

4.2.1. Método de Disco Difusão em ágar

No teste de disco difusão em ágar, foram observados altos percentuais de resistência aos antimicrobianos testados de acordo com os critérios do CLSI 2016 (Tabela 5).

Tabela 5. Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos, através de difusão em ágar, de isolados de *K. pneumoniae* obtidos de animais domésticos e silvestres.

Antimicrobianos Categorias	Resistência* (%)			
	Agente	Domésticos (n=39)	Silvestres (n=28)	Total (n= 67)
Penicilinas β- lactâmicos	Amoxicilina	92% (36/39)	93%(26/28)	93%(62/67)
	AMC	44% (17/39)	50% (14/28)	46% (31/67)
	Ampicilina	92% (36/39)	96%(27/28)	94%(63/67)
Cefalosporinas β- lactâmicos	Cefalexina	44% (17/39)	64%(18/28)	51%(34/67)
	Ceftiofur	49% (19/39)	61%(17/28)	51%(34/67)
Carbapenêmicos β- lactâmicos	Meropenem	5% (2/39)	0% (0/28)	3%(2/67)
	Imipenem	3% (1/39)	11% (3/28)	6%(4/67)
Aminoglicosídeos	Amicacina	20% (7/39)	14% (4/28)	16%(11/67)
	Gentamicina	38% (15/39)	36%(10/28)	37%(25/67)
	Neomicina	69% (27/39)	75%(21/28)	72%(48/67)
Quinolonas	Enrofloxacina	62% (24/39)	75%(21/28)	67%(45/67)
	Ciprofloxacina	49% (19/39)	46%(13/28)	48%(32/67)
	Marbofloxacina	54% (21/39)	61%(17/28)	57%(38/67)
Fenicol	Cloranfenicol	51% (20/39)	68%(19/28)	58%(39/67)
Polimixina	Colistina	87% (34/39)	93%(26/28)	93%(62/67)
Tetracíclicos	Doxiciclina	44% (17/39)	79%(22/28)	43%(29/67)
Nitroimidazol	Metronidazol	95% (37/39)	100%(28/28)	97%(65/67)
Nitrofuranos	Nitrofurantoína	82% (32/39)	96% (27/28)	88%(59/67)
Sulfonamidas	Sulfonamidas	97% (38/39)	96% (27/28)	93%(62/67)
	SUT	44% (17/39)	36% (10/28)	40%(27/67)

Legenda: AMC: Amoxicilina + Acido clavulânico; SUT: Sulfonamida+Trimetoprima; Colistina: Polimixina E

*Os isolados classificados como intermediário foram agrupados juntamente com os resistentes.
Em destaque???

Em relação ao perfil de susceptibilidade dos isolados do estudo, tanto em animais domésticos como silvestres foi observada alta resistência a metronidazol 97% (65/67), ampicilina 94% (63/67), amoxicilina 93% (62/67), sulfonamidas 93% (62/67) , colistina 93% (62/67) e nitrofurantoína 88% (59/67). Os que apresentaram menor taxa de resistência foram: meropenem 3% (2/67), imipenem 6% (4/67) e amicacina 16% (11/67) (Tabela 5).

4.2.2. Análise de perfil de multirresistência

Os critérios utilizados para análise do perfil de multirresistência foram de acordo com Magiorakos et al., (2012). No total foram 11 categorias de antimicrobianos e as amostras foram classificadas quanto ao perfil de resistência.

Todos os isolados de *K. pneumoniae* demonstraram um fenótipo de multirresistência a drogas (MDR).

5 DISCUSSÃO

Um dos maiores problemas na saúde pública é o aumento de cepas multirresistentes a antimicrobianos e dentre as bactérias pertencentes a este grupo, está a *K. pneumoniae*, que pode pertencer à microbiota do trato intestinal de animais e humanos (BI et al., 2017).

A ocorrência de *K. pneumoniae* neste estudo foi maior em animais domésticos, principalmente cães, provavelmente devido ao maior número de amostras recebidas, no entanto, foi observado alta frequência de isolados de aves silvestres. Existe relato de estudo envolvendo gaviões carijós, onde foi coletado suabe cloacal de nove animais saudáveis para estudo de microbiota e foi identificada *K. pneumoniae* com perfil de alta resistência (DE ARAÚJO SILVA et al., 2016). Em aves esta bactéria está envolvida em processos mórbidos (CUBAS, SILVA e CATÃO-DIAS, 2006), e são identificadas como causadora de enterites (CARRER E KORNFIELD, 1999), podendo levar a óbitos (MELVILLE et al., 2004).

As principais infecções que a *K. pneumoniae* causam em humanos são urinárias, pulmonares e enterites (PEREIRA et al., 2015; VERDI et al., 2016), como foi observado nos isolados deste estudo.

Observamos em animais domésticos e silvestres a alta taxa de resistência antimicrobiana em isolados de *K. pneumoniae*, principalmente aos β -lactâmicos como a amoxicilina e ampicilina por terem capacidade de produzir enzimas hidrolíticas, que inativam os antimicrobianos da classe, sendo o mecanismo de resistência bacteriana mais importante, em isolados humanos também possui o mesmo perfil de resistência alta (SFACIOTTE; VIGNOTO.; WOSIACKI, 2014; OGALO et al., 2016). No entanto, dentro deste mesmo grupo quando se utilizou a

associação de penicilina com inibidor da β -lactamase encontramos um aumento de sensibilidade.

Os isolados apresentaram altas taxas de resistência para o metronidazol, o que divergiu comparado com isolados de humanos (NAKANO et al., 2011). O metronidazol é muito utilizado na Medicina Veterinária em animais de companhia em razão de sua excelente atividade contra microorganismos anaeróbicos e protozoários, e isso pode ter levado a aquisição de mecanismos de resistência a esse antibiótico (DECHAN, 1997).

A resistência a sulfonamidas encontra-se amplamente disseminada em bactérias isoladas de animais, refletindo o uso indiscriminado destas drogas ao longo de anos como melhoradores de desempenho animal, controle de infecções e tratamento. Isso limitou muito a eficácia deste fármaco no tratamento de doenças bacterianas de animais, assim são poucas as indicações para uso primário (GUARDABASSI; KRUSE, 2008; ARIAS; DE MAIO CARRILHO, 2012; BEZERRA et al., 2017).

Atualmente na medicina humana a polimixina B e E são utilizadas como opção terapêutica em infecções causadas por bactérias multirresistentes, principalmente as Gram negativas. Apesar de as taxas de resistência às polimixinas serem consideradas baixas na medicina humana, já existem relatos de resistência a esses antibióticos, principalmente a colistina em isolados de *K. pneumonia* (JEANNOT; BOLARD; PLÉSIAT, 2017; HERNANDEZ et al., 2018). Em isolados de animais já apresenta altas taxas de resistência por ser ter sido muito utilizada como melhoradores de desempenho em animais de produção, como aditivo da composição na ração para aves, bovino e suíno, tendo hoje seu uso proibido para animais de produção (MAPA, 2017).

Em isolados de animais silvestres e domésticos foram observadas altas taxas de resistência em nitrofurantoína, isso também se deve ao uso indiscriminado deste antibiótico como aditivos melhoradores de desempenho em animais de produção, o que pode ter levado a contaminação ambiental e aquisição de resistência pelas bactérias a esse fármaco (BEZERRA et al., 2017; BINH et al., 2018). Em contrapartida, na medicina humana, esse antimicrobiano voltou a ser utilizado, por ser bactericida de amplo espectro. Com o aumento contínuo da resistência aos antibióticos em bactérias Gram negativas produtoras de β -lactamases de espectro estendido (ESBL) e a disponibilidade limitada de novos antibióticos, o uso da

nitrofurantoína tem sido reavaliado, principalmente para o tratamento de infecções do trato urinário, e tem apresentado eficiência contra a maioria dos isolados de *K. pneumoniae* (HUTTNER et al., 2015; FRANSEN et al., 2017; SEIFU e GEBISSA, 2018).

Dentro dos aminoglicosídeos a amicacina apresentou maior perfil de sensibilidade, e é o que tem menor potencial para induzir a resistência bacteriana, pois a *K. pneumoniae* possui pouca detecção do gene metilase que é o principal mecanismo de resistência a esse fármaco, por isso são muito utilizados para o tratamento de infecções nosocomiais (BENNETT; DOLIN; BLASER, 2014; DE ARAÚJO SILVA et al., 2016; JAJIĆ et al., 2017; ZHENG et al., 2018).

Os carbapenêmicos apresentaram baixa taxa de resistência, pois esta classe ainda é pouco utilizada na Medicina Veterinária. São utilizados em animais de companhia, em infecções graves (MONTEANI-FERREIRA et al., 1999; HARADA et al., 2015; ROPSKI et al., 2017). Já os isolados de humanos tem apresentado alta taxa de resistência pela presença enzima carbapenemase (KPC) como descrito pelos autores (PEREIRA et al., 2015; ESPOSITO et al., 2017; JAJIĆ et al., 2017; CHEW; LIN; TEO, 2017).

O aumento de cepas multirresistentes a antibióticos de isolados humanos de *K.pneumoniae* tem sido descritos em vários estudos (JEANNOT et al., 2017; WANG et al., 2018; Hernández et al., 2018), neste estudo todos os isolados foram classificados como multirresistentes. Portanto deve ocorrer o monitoramento da resistência aos medicamentos das cepas multirresistentes.

Em um estudo realizado por Kolpa e colaboradores (2018) foi analisado o perfil de susceptibilidade a antimicrobianos em uma Unidade de Tratamento Intensivo (UTI) humana no sul da Polônia, onde foram estudados 510 isolados de pacientes de diversos quadros clínicos, como pneumonia, infecção sanguínea, infecção do trato urinário, enterites, infecção no local cirúrgico, infecção da pele e tecidos moles, e outras infecções. Dos 35 isolados de *K. pneumoniae*, 42% foram classificados como MDR.

Existem muitos estudos descrevendo que o uso de antibióticos na Medicina Veterinária proporciona uma transferência de resistência para as bactérias emergentes humanas, pois muitas classes destes fármacos que são usadas em animais também são empregadas em seres humanos (KEMPER, 2008; ARIAS; DE MAIO CARRILHO, 2012; BINH et al., 2018; COMBER et al., 2018). Vários

questionamentos têm sido feitos em relação ao risco para a saúde pública pelo uso exacerbado de fármacos na produção animal e na agricultura (ARIAS e DE MAIO CARRILHO, 2012).

De acordo com Gandolfi-Decristophorus et al. (2013), Seiffert et al. (2013), Jechalke et al. (2014) e Nóbrega et al. (2016), existe esta associação e já foi relatada a transferência de material genético entre espécies, uma vez que isolados de humanos e animais apresentam similaridades genéticas (GUENTHER et al., 2012). Porém, Phillips et al. (2004) afirmam que maior causa de resistência em medicina humana advém de tratamento mal conduzido, que a influência de terapias em animais são mínimas e as bactérias isoladas de animais não persistem em seres humanos. Mesmo com a eliminação do uso de antimicrobianos em animais, não reduzirá a multirresistência das bactérias na medicina humana se o uso de forma imprudente nas terapias continuar (SMITH et al., 2002).

Foi realizado um estudo em vários países da União Européia relacionado à susceptibilidade antimicrobiana de isolados intestinais de *Escherichia coli*, *Salmonella* spp, *Campylobacter* spp e *Enterococcus* spp de frangos, suínos e bovinos e constatou-se uma variação na resistência entre antimicrobianos, bactérias, hospedeiros e países. Observou-se uma baixa ou ausência de resistência em isolados de *Escherichia coli*, *Campylobacter* spp, *Enterococcus* spp e *Salmonella* spp a novos antimicrobianos usados em humanos, restritos a uso hospitalar, enquanto que resistência aos antimicrobianos mais utilizados na Medicina Veterinária e mais antigos como ampicilina, tetraciclina e sulfametoxazol-trimetoprima apresentou-se alta. Concluiu-se que os antimicrobianos utilizados somente na Medicina Humana apresentaram baixa ou nula taxa de resistência (DE JONG et al., 2009) como foi observada no nosso estudo.

Um dos problemas na atualidade é o uso e a prevalência ambiental de produtos farmacêuticos ativos, que são detectados em todo meio ambiente como água, solo, sedimentos, esgotos e lamas (KASPRZYK-HORDERN et al., 2008; ZORITA et al., 2009; WAHLBERG et al., 2011; JONES et al., 2014; LEES et al., 2016). A presença de antibióticos no meio ambiente é uma preocupação séria por poder levar ao surgimento de resistência. De acordo com o Martinez (2004), as atividades comerciais e o transporte entre países podem levar a presença de bactérias resistentes em populações humanas e animais, incluindo espécies silvestres e aves que não receberam antimicrobianos. Foi relatada por Carneiro e

colaboradores (2007) a presença de resíduos de compostos farmacêuticos em peixes para o consumo humano. Neste estudo foram observadas altas taxas de resistência mesmo em animais silvestres de vida livre que não haviam sido medicados, que provavelmente adquiriram estas bactérias multirresistentes pela contaminação ambiental (KEMPER, 2008; JECHALKE et al., 2014; BINH et al., 2018).

O conhecimento prévio sobre perfil de resistência do microrganismo causador da infecção é de suma importância para iniciar uma terapia correta e com a dose suficiente para atingir o patógeno. Essa conduta pode reduzir os erros nos tratamentos e evitar aquisição de resistência por parte de tratamentos mal conduzidos (CLSI, 2016). Os resultados do presente estudo reforçam a importância do antibiograma como parâmetro para tratamento eficiente, visto que o tratamento empírico pode levar a resistência antimicrobiana.

6 CONCLUSÃO

A *K. pneumoniae* se torna cada vez mais uma ameaça à saúde pública, pela alta taxa de resistência a antimicrobianos observada nos isolados de animais domésticos e silvestres, sendo uma importante fonte para transferência cruzada de genes de resistência. Neste estudo se evidenciou a ocorrência de isolados MDR com alta taxa de resistência a metronidazol, ampicilina, amoxicilina, sulfonamidas, colistina e nitrofurantoína em isolados de animais domésticos e silvestres. Estes animais podem ser uma fonte de isolados resistentes aos principais antimicrobianos utilizados em medicina humana.

São necessárias medidas de controle da disseminação de resistência a antimicrobianos sendo uma das formas para diminuir o uso indiscriminado dos antibióticos, a realização de cultura e antibiograma para tratamento mais eficaz, com administração em doses corretas por tempo adequado.

7 REFERÊNCIAS

ALLEN, H. K.; LEVINE, U. Y.; LOOFT, T.; BANDRICK, M.; CASEY, T. A. Treatment, promotion, commotion: antibiotic alternatives in food-producing animals. **Trends in microbiology**, v. 21, n. 3, p. 114-119, 2013.

ARIAS, M. V. B.; DE MAIO CARRILHO, C. M. D. Antimicrobial resistance in animals and in human being. There is reason for concern?. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 2, p. 775-790, 2012.

BAUER, A. W.; KIRBY, W. M. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American journal of clinical pathology**, v. 45, n. 4, p. 493, 1966.

BENGTSSON, B.; UNNERSTAD, H. E.; EKMAN, T.; ARTURSSON, K.; NILSSON-OST, M.; WALLER, K. P. Antimicrobial susceptibility of udder pathogens from cases of acute clinical mastitis in dairy cows. **Vet Microbiol**, v. 136, n. 1-2, p. 142-9, 2009.

BENNETT, J. E.; DOLIN, R.; BLASER, M. J. **Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases E-Book**. Elsevier Health Sciences, 2014.

BEZERRA, W. G. A.; HORN, R. H.; SILVA, I. N. G.; TEIXEIRA, R. S. C.; LOPES, E. S.; ALBUQUERQUE, Á. H.; CARDOSO, W. C. Antibióticos no setor avícola: uma revisão sobre a resistência microbiana. **Archivos de Zootecnia**, v. 66, n. 254, p. 301-307, 2017.

BI, W.; LIU, H.; DUNSTAN, R. A.; LI, B.; TORRES, V. V. L.; CAO, J.; ZHOU, T. Extensively Drug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Causing Nosocomial Bloodstream Infections in China: Molecular Investigation of Antibiotic Resistance Determinants, Informing Therapy, and Clinical Outcomes. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 1230, 2017

BINH, V. N.; DANG, N.; ANH, N. T. K.; THAI, P. K. Antibiotics in the aquatic environment of Vietnam: Sources, concentrations, risk and control strategy. **Chemosphere**, 2018.

BOERLIN, P.; REID-SMITH, R. J. Antimicrobial resistance: its emergence and transmission. **Animal Health Research Reviews**, v. 9, n. 2, p. 115-126, 2008.

BRADFORD, P. A. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. **Rev. Clin Microbiol.** V.14, n.4, p933-951,2001..

CARATTOLI, A. Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 53, n. 6, p. 2227-2238, 2009.

CARNEIRO, D. O.; FIGUEIREDO H. C. P.; PEREIRA JUNIOR, D. J.; LEAL, C. A. G.; LOGATO, P. V. R. Perfil de susceptibilidade de bactérias isoladas em diferentes sistemas de cultivo de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*). **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia** , Belo Horizonte, v. 59, n. 4, p. 869-876, 2007.

CARRER, C. C.; KORNFELD, M. E. A criação de avestruzes no Brasil. **Pirassununga: Brasil Ostrich Comercial**, p. 304, 1999.

CHEW, K. L.; LIN, R. T.; TEO, J. W. *Klebsiella pneumoniae* in Singapore: Hypervirulent Infections and the Carbapenemase Threat. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 7, 2017.

CLSI. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 26th informational supplement, 2016. (CLSI document M100-S26).

COMBER, S.; GARDNER, M.; SÖRME, P.; LEVERETT, D.; ELLOR, B. Active pharmaceutical ingredients entering the aquatic environment from wastewater treatment works: A cause for concern?. **Science of The Total Environment**, v. 613, p. 538-547, 2018.

CRAIG, W. A.; ANDES, D. R. Cephalosporins. In: **Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases (Eighth Edition)**. 2015. p. 278-292. e4.

CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. Tratado de animais selvagens - medicina veterinária. São Paulo: **Roca**, 2006.

DE ARAÚJO SILVA, E. F.; DE BARROS, J. F. S.; FRAGA, K. B.; MAGALHÃES, C. P.; GARCIA, J. E.; CAVALCANTI, I. M. F. Enterobactérias isoladas da cloaca de Gaviões-carijós (*Rupornis magnirostris*, GMELIN, 1788) cativos e seu perfil de susceptibilidade a antimicrobianos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 53, n. 2, p. 207-213, 2016.

DE JONG, A.; BYWATER, R.; BUTTY, P.; DEROVER, E.; GODINHO, K.; KLEIN, U.; MARION, H.; SIMJEE, S.; SMETS, K.; THOMAS, V.; VALLÉ, M.; WHEADON, A. A pan-European survey of antimicrobial susceptibility towards human-use antimicrobial drugs among zoonotic and commensal enteric bacteria isolated from healthy food-producing animals. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 63, n. 4, p. 733-744, 2009.

DE SOUSA, J. C. F. **Manual de antibióticos antibacterianos**. Universidade Fernando Pessoa, 2006.

DECHAN, J. Combination of medical and surgical therapy for pleuropneumonia in a horse. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 38, n. 8, p. 499, 1997.

DIAZ-SANCHEZ, S.; D'SOUZA, D.; BISWAS, D.; HANNING, I. Botanical alternatives to antibiotics for use in organic poultry production. **Poultry science**, v. 94, n. 6, p. 1419-1430, 2015.

DRAWZ, S. M.; BONOMO, R. A. Three decades of β -lactamase inhibitors. **Clinical microbiology reviews**, v. 23, n. 1, p. 160-201, 2010.

DWORKIN, M. The Prokaryotes: Vol. 2: Ecophysiology and Biochemistry. **Springer Science & Business Media**, 2006.

ESPOSITO, E. P.; GAIARSA, S.; DEL FRANCO, M.; CRIVARO, V.; BERNARDO, M.; CUCCURULLO, S.; ZARRILLI, R. A Novel IncA/C1 Group Conjugative Plasmid, Encoding VIM-1 Metallo-B--Lactamase, Mediates the Acquisition of Carbapenem Resistance in ST104 *Klebsiella pneumoniae* Isolates from Neonates in the Intensive Care Unit of V. Monaldi Hospital in Naples. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 2135, 2017.

FRANSEN, F.; MELCHERS, M. J.; LAGARDE, C. M.; MELETIADIS, J.; MOUTON, J. W. Pharmacodynamics of nitrofurantoin at different pH levels against pathogens involved in urinary tract infections. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 72, n. 12, p. 3366-3373, 2017.

FROST, L. S.; LEPLAE, R.; SUMMERS, A. O.; TOUSSAINT, A. Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 9, p. 722-732, 2005.

GANDOLFI-DECRISTOPHORIS, P.; PETRINI, O.; RUGGERI-BERNARDI, N.; SCHELLING, E. Extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in healthy companion animals living in nursing homes and in the community. **American journal of infection control**, v. 41, n. 9, p. 831-835, 2013.

GIGUÈRE, S. Antimicrobial drug action and interaction: an introduction. In: **Giguère, S.; Prescott, J.F. and Dowling, P.M. (Eds.). Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine**. 5th ed. Wiley Blackwell. USA. pp. 1-10, 2013.

GIMENO, O.; ORTEGA, C. Antibioterapia y salud pública veterinaria; desarrollo de microorganismos resistentes, mecanismos de resistencia y estrategias para el uso prudente de antibióticos. **Zaragoza (España) pp**, v. 11, 2005.

GONZALES, E.; DE CARVALHO MELLO, H. H.; CAFÉ, M. B.. Uso de antibióticos promotores de crescimento na alimentação e produção animal. **Revista UFG**, v. 13, n. 13, 2012.

GUARDABASSI, L AND KRUSE, H. Principles of prudent and rational use of antimicrobials in animals. **Guide to antimicrobial use in animals**, p. 1-12, 2008.

GUENTHER, S.; BETHE, A.; FRUTH, A.; SEMMLER, T.; ULRICH, R. G.; WIELER, L. H.; EWERS, C. Frequent combination of antimicrobial multiresistance and extraintestinal pathogenicity in *Escherichia coli* isolates from urban rats (*Rattus norvegicus*) in Berlin, Germany. **PLoS One**, v. 7, n. 11, p. e50331, 2012.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S. and PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.

HARADA, K.; SHIMIZU, T.; TSUKA, T.; IMAGAWA, T.; TAKEUCHI, T. First case of *Propionibacterium acnes* urinary tract infection in a dog. **BMC veterinary research**, v. 11, n. 1, p. 304, 2015.

HARAGUCHI, T. Antibióticos: classificação geral. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 57, n. 10, 2010.

HAWKEY, P. M. Molecular epidemiology of clinically significant antibiotic resistance genes. **British journal of pharmacology**, v. 153, n. S1, 2008.

HERNÁNDEZ, M.; QUIJADA, N. M.; LORENTE, L. L. U.; DE FRUTOS, M.; RODRÍGUEZ-LÁZARO, D.; EIROS, J. M. Infrequent isolation of extensively drug-resistant (XDR) *Klebsiella pneumoniae* resistant to colistin in Spain. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 2018.

HIROI, M.; HARADA, T.; KAWAMORI, F.; TAKAHASHI, N.; KANDA, T.; SUGIYAMA, K.; OHASHI, N. A survey of β -lactamase-producing *Escherichia coli* in farm animals and raw retail meat in Shizuoka Prefecture, Japan. **Japanese journal of infectious diseases**, v. 64, n. 2, p. 153-155, 2011.

HUTTNER, A.; VERHAEGH, E. M.; HARBARTH, S.; MULLER, A. E.; THEURETZBACHER, U.; MOUTON, J. W. Nitrofurantoin revisited: a systematic review and meta-analysis of controlled trials. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, n. 9, p. 2456-2464, 2015.

JACOBY, G. A.; MILLS, D. M.; CHOW, N. Role of β -lactamases and porins in resistance to ertapenem and other β -lactams in *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 48, n. 8, p. 3203-3206, 2004.

JAJIĆ, I.; BENČIĆ, A.; SIROGLAVIĆ, M.; ZARFEL, G. RUŽIĆ, B., PEZELJ, I.; BEDENIĆ, B. *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* OXA-48 IN A UROLOGY PATIENT: CASE REPORT. **Acta clinica Croatica**, v. 56, n. 1., p. 166-171, 2017.

JEANNOT, K.; BOLARD, A.; PLÉSIAT, P. Resistance to polymyxins in Gram-negative organisms. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 49, n. 5, p. 526-535, 2017.

JECHALKE, S.; HEUER, H.; SIEMENS, J.; AMELUNG, W.; SMALLA, K. Fate and effects of veterinary antibiotics in soil. **Trends in microbiology**, v. 22, n. 9, p. 536-545, 2014.

JONES, V.; GARDNER, M.; ELLOR, B. Concentrations of trace substances in sewage sludge from 28 wastewater treatment works in the UK. **Chemosphere**, v. 111, p. 478-484, 2014.

KASPRZYK-HORDERN, B.; DINSDALE, R. M.; GUWY, A. J. The occurrence of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs in surface water in South Wales, UK. **Water research**, v. 42, n. 13, p. 3498-3518, 2008.

KEMPER, N. Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. **Ecological indicators**, v. 8, n. 1, p. 1-13, 2008.

KOŁPA, M.; WAŁASZEK, M.; GNIADEK, A. WOLAK, Z.; DOBROŚ, W. Incidence, Microbiological Profile and Risk Factors of Healthcare-Associated Infections in Intensive Care Units: A 10 Year Observation in a Provincial Hospital in Southern Poland. **International journal of environmental research and public health**, v. 15, n. 1, p. 112, 2018.

LANDMAN, D.; GEORGESCU, C.; MARTIN, D. A.; QUALE, J. Polymyxins revisited. **Clinical microbiology reviews**, v. 21, n. 3, p. 449-465, 2008.

LANE, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. Nucleic acid techniques in bacterial systematics, New York: **John Wiley & Sons**, p. 125-175, 1991.

LEAVITT, A.; CARMELI, Y.; CHMELNITSKY, I.; GOREN, M. G.; OFEK, I.; NAVON- VENEZIA, S. Molecular epidemiology, sequence types, and plasmid analyses of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Israel. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 54, n. 7, p. 3002-3006, 2010.

LEE, H. S.; LOH, Y. X.; LEE, J.J.; LIU, C.S.; CHU, C. Antimicrobial consumption and resistance in five Gram-negative bacterial species in a hospital from 2003 to 2011. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 48, n. 6, p. 647-654, 2015.

LEES, K.; FITZSIMONS, M.; SNAPE, J.; TAPPIN, A.; COMBER, S. Pharmaceuticals in soils of lower income countries: physico-chemical fate and risks from wastewater irrigation. **Environment international**, v. 94, p. 712-723, 2016.

LIANG, W.; XIE Y.; XIONG W.; TANG Y.; LI G.; JIANG X. and LU Y. Anti-restriction Protein, KlcAHS, Promotes Dissemination of Carbapenem Resistance. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, 2017.

LOCATELLI, C.; SCACCABAROZZI, L.; PISONI, G.; MORONI, P. CTX-M1 ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* isolated from cases of bovine mastitis. **Journal of clinical microbiology**, v. 48, n. 10, p. 3822-3823, 2010.

MAGIORAKOS, A. P.; SRINIVASAN, A.; CAREY, R. B.; CARMELI, Y.; FALAGAS, M. E.; GISKE, C. G.; PATERSON, D. L. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard

definitions for acquired resistance. **Clinical microbiology and infection**, v. 18, n. 3, p. 268-281, 2012.

MAPA. 2017. Substâncias proibidas na alimentação animal com a finalidade de aditivos e legislação correspondente. <http://www.agricultura.gov.br/noticias/ministerio-da-agricultura-cria-programa-de-prevencao-e-controle-de-antimicrobianos>. Acessado no dia 20/01/2017.

MARTÍNEZ, J.; MARTÍNEZ, L. How are gene sequence analyses modifying bacterial taxonomy? The case of *Klebsiella*. **International Microbiology**, Barcelona, v. 7, p. 261-268, 2004.

MELVILLE, P. A.; COGLIATI, B.; MANGIATERRA, M. B. B. C. D.; PERES, M. R.; ALVES MOURA, S. C. A.; MATSUDA, L.; KIM, A.; BENITES, N. R. Determinação da microbiota presente na cloaca e orofaringe de avestruzes (*Struthio camelus*) clinicamente sadios. **Ciência Rural**, v. 34, n. 6, 2004.

MONTEANI-FERREIRA, F.; WARTH, J. F.; PACHALY, J. R.; REIFUR, L.; DOTTI, C. F. Contribuição ao estudo da ação da meropenema, in vitro e in vivo, em infecções diagnosticadas em pequenos animais. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 2, n. 2, 1999.

MOTA, L. M.; VILAR, F. C.; DIAS, L. B.; NUNES, T. F.; MORIGUTI, J. C. Uso racional de antimicrobianos. **Medicina (Ribeirao Preto. Online)**, v. 43, n. 2, p. 164-172, 2010.

MUNOZ-PRICE, L. S.; QUINN, J. P. The spread of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases: a tale of strains, plasmids, and transposons. 2009.

NAKANO, V.; SILVA, A. N.; MERINO, V. R. C.; WEXLER, H. M.; CAMPOS, M. J. A. Antimicrobial resistance and prevalence of resistance genes in intestinal Bacteroidales strains. **Clinics**, v. 66, p. 543-547, 2011.

NÓBREGA, D. B. Perfil fenotípico e genotípico da resistência aos antimicrobianos em "*Klebsiella pneumoniae*", "*Salmonella enterica*" e estafilococos coagulase-negativa. 2016.

NÓBREGA, D. B.; BROCCHI, M. An overview of extended-spectrum β -lactamases in veterinary medicine and their public health consequences. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 8, n. 08, p. 954-960, 2014.

NOGUEIRA, P. S. F.; MOURA, E. R. F.; COSTA, M. M. F.; MONTEIRO, W. M. S.; BRONDI, L. Perfil da infecção hospitalar em um hospital universitário. **Rev enferm UERJ**, v. 17, n. 1, p. 96-101, 2009.

NORDMANN, P.; NAAS, T.; POIREL, L. Global spread of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. **Emerging infectious diseases**, v. 17, n. 10, p. 1791, 2011.

OGALO, E. A.; OWUOR, C. O.; BOOR, K. G.; MUTAI, K. K. High prevalence of multi-drug resistant *Klebsiella pneumoniae* in a tertiary teaching hospital in western Kenya. **African journal of infectious diseases**, v. 10, n. 2, p. 89-95, 2016.

O'NEILL J. Securing new drugs for future generations: the pipeline of antibiotics - the review on antimicrobial resistance. **Review on antimicrobial resistance**. 2015

ORDEN GUTIÉRREZ, J. A.; DE LA FUENTE LÓPEZ, R. Repercusiones en la salud pública de la resistencia a quinolonas en bacterias de origen animal. **Revista Española de salud publica**, v. 75, n. 4, p. 313-320, 2001.

PAPHITOU, N. I. Antimicrobial resistance: action to combat the rising microbial challenges. **International journal of antimicrobial agents**, v. 42, p. S25-S28, 2013.

PEIRANO, G.; SEKI, L. M.; VAL PASSOS, V. L.; PINTO, M. C. F.; GUERRA, L. R.; ASENSI, M. D. Carbapenem-hydrolysing β -lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 63, n. 2, p. 265-268, 2008.

PEREIRA, P. S.; BORGHI, M.; de ARAÚJO, C. F.; AIRES, C.A.; OLIVEIRA, J.C.; ASENSI, M.D.; ASSEF, A.P. Clonal dissemination of OXA-370-producing *Klebsiella pneumoniae* in Rio de Janeiro, Brazil. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 59, n. 8, p. 4453-4456, 2015.

PHILLIPS, I.; CASEWELL, M.; COX, T.; DE GROOT, B.; FRIIS, C.; JONES, R.; NIGHTINGALE, C.; PRESTON, R.; WADDELL, J. Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 53, n. 1, p. 28-52, 2004.

PITOUT, J. D. D.; NORDMANN, P.; POIREL, L. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*, a key pathogen set for global nosocomial dominance. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 59, n. 10, p. 5873-5884, 2015.

POEHLEIN, A.; NAJDENSKI, H.; SIMEONOVA, D. D. Draft Genome Sequence of *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* ATCC 9621. **Genome Announcements**, v. 5, n. 12, p. e01718-16, 2017

QUEENAN, A. M.; BUSH, K. Carbapenemases: the versatile β -lactamases. **Clinical microbiology reviews**, v. 20, n. 3, p. 440-458, 2007.

QUINN, P.J.; CARTER, M.E.; MARKEY, B.K.; CARTER, G.R. General procedures in microbiology. **Clinical Veterinary Microbiology**. London, Wolfe Publishing, p. 648, 1994.

RANKIN, S. C.; WHICHARD, J. M.; JOYCE, K.; STEPHENS, L.; O'SHEA, K.; ACETO, H.; BENSON, C. E. Detection of a blaSHV extended-spectrum β -lactamase in *Salmonella enterica* serovar Newport MDR-AmpC. **Journal of clinical microbiology**, v. 43, n. 11, p. 5792-5793, 2005.

ROPSKI, M.K.; GUILLAUMIN, J.; MONNIG, A.A.; TOWNSEND, K.; McLOUGHLIN, M.A. Use of cryopoor plasma for albuminreplacement and continuous antimicrobialinfusion for treatment of septic peritonitis in a dog. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v. 27, n. 3, p. 348-356, 2017.

ROLAIN, J. M. Food and human gut as reservoirs of transferable antibiotic resistance encoding genes. **Frontiers in microbiology**, v. 4, p. 173, 2013.

ROSSI, F.; ANDREAZZI, D. B. **Resistência bacteriana: interpretando o antibiograma**. Atheneu, 2005.

SALOIS, M. J.; CADY, R. A.; HESKETT, E. A. The environmental and economic impact of withdrawing antibiotics from US broiler production. *J Food Distrid Res*, v. 47, p 79-80, 2016

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3 ed. New York; Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2004. p.5.65 – 5.67.

SARTORI, J. R.; PEREIRA, K. A.; GONÇALVES, J. C.; CRUZ, V. C. D.; PEZZATO, A. C. Enzyme and symbiotic for broilers bred in conventional and alternative systems. **Ciência Rural**, v. 37, n. 1, p. 235-240, 2007.

SEIFFERT, S. N.; HILTY, M.; PERRETTEN, V.; ENDIMIANI, A. Extended-spectrum cephalosporin-resistant Gram-negative organisms in livestock: an emerging problem for human health?. **Drug Resistance Updates**, v. 16, n. 1, p. 22-45, 2013.

SEIFU, W. D.; GEBISSA, A. D. Prevalence and antibiotic susceptibility of Uropathogens from cases of urinary tract infections (UTI) in Shashemene referral hospital, Ethiopia. **BMC infectious diseases**, v. 18, n. 1, p. 30, 2018.

SFACIOTTE, R. A. P.; VIGNOTO, V. K. C.; WOSIACKI, S. R. Perfil de resistência antimicrobiana de isolados bacterianos de afecções clínicas do Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Maringá. **Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública**, v. 1, n. 1, p. 29-38, 2014.

SHENG, J. F.; LI, J. J.; TU, S.; SHENG, Z. K.; BI, S.; ZHU, M. H.; LI, L. J. blaKPC and rmtB on a single plasmid in *Enterobacter amnigenus* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from the same patient. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases**, v. 31, n. 7, p. 1585-1591, 2012.

SILVA, E.R.M. Análise do perfil das prescrições de antimicrobianos na clínica médica de um hospital público do Pará. **Revista Brasileira Farmácia Hospitalar Serviços de Saúde**, v. 3, n. 2, p. 15-19, 2012.

SILVA, G. V. Avaliação das espécies e perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos de *Staphylococcus* isolados de leite de ovelha. 2012.

SILVA, K. C.; LINCOPAN, N. Epidemiologia das β -lactamases de espectro estendido no Brasil: impacto clínico e implicações para o agronegócio. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 48, n. 2, p. 91-99, 2012.

SMITH, D. L.; HARRIS, A. D.; JOHNSON, J. A.; SILBERGELD, E. K.; MORRIS, J. G. Animal antibiotic use has an early but important impact on the emergence of antibiotic resistance in human commensal bacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 9, p. 6434-6439, 2002.

SNYDER, L.; CHAMPNESS, W. Molecular Genetics of bacteria, 3th ed. **American Society for Microbiology**: Washington, D.C., 2007.

SORENSEN, T. L.; BLOM, M.; MONNET, D. L.; FRIMODT-MOLLER, N.; POULSEN, R. L.; ESPERSEN, F. Transient intestinal carriage after ingestion of antibiotic-resistant *Enterococcus faecium* from chicken and pork. **New England Journal of Medicine**, v. 345, n. 16, p. 1161-1166, 2001.

STACKEBRANDT, E. B. M. G. ; GOEBEL, B. M. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 44, n. 4, p. 846-849, 1994.

SUNDE, M.; THARALDSEN, H.; SLETTEMEÅS, J. S.; NORSTRÖM, M.; CARATTOLI, A.; BJORLAND, J. Escherichia coli of animal origin in Norway contains a bla TEM-20-carrying plasmid closely related to bla TEM-20 and bla TEM-52 plasmids from other European countries. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 63, n. 1, p. 215-216, 2008.

TAVARES, W. **Antibióticos e quimioterápicos para o clínico**. Atheneu, 2009.

TENOVER, F. C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. **American journal of infection control**, v. 34, n. 5, p. S3-S10, 2006.

TIAN, L.; TAN, R.; CHEN, Y.; SUN, J.; LIU, J.; QU H. Epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections in a teaching hospital: factors related to the carbapenem resistance and patient mortality. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, v. 5, n. 1, p. 48, 2016.

TURNER, S.; PRYER, K.M.; MIAO, V.P.W. & AMP; PALMER, J.D. Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 46, n. 4, p. 327-338, 1999.

UNGEMACH, F. R.; MÜLLER-BAHRDT, D.; ABRAHAM, G. Guidelines for prudent use of antimicrobials and their implications on antibiotic usage in veterinary medicine. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 296, p. 33-38, 2006.

VERDI, C. M.; ZIMMERMANN, C. E. P.; ANDRADE, E. N. C.; LEDUR, P. C.; VELASQUEZ, P. G. Detecção laboratorial dos mecanismos de resistência da *Klebsiella pneumoniae*: uma revisão. **REVISTA SAÚDE INTEGRADA**, v. 9, n. 17, p. 16-27, 2016.

WAHLBERG, C.; BJÖRLENIUS, B.; PAXÉUS, N. Fluxes of 13 selected pharmaceuticals in the water cycle of Stockholm, Sweden. **Water Science and Technology**, v. 63, n. 8, p. 1772-1780, 2011.

WANG, Z.; QIN, R. R.; HUANG, L.; SUN, L. Y. Risk Factors for Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* Infection and Mortality of *Klebsiella pneumoniae* Infection. **Chinese medical journal**, v. 131, n. 1, p. 56, 2018.

WEESE, J. S.; VAN DUIJKEREN, E. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in veterinary medicine. **Veterinary microbiology**, v. 140, n. 3-4, p. 418-429, 2010.

XIA, J.; FANG, L. X.; CHENG, K.; XU, G. H.; WANG, X. R.; LIAO, X. P.; SUN, J. Clonal Spread of 16S rRNA Methyltransferase-Producing *Klebsiella pneumoniae* ST37 with High Prevalence of ESBLs from Companion Animals in China. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 2017.

ZAFFIRI, L.; GARDNER, J. AND TOELDO-PEREYRA, L.H. History of antibiotics. From salvarsan to cephalosporins. **Journal of Investigative Surgery**, v. 25, n. 2, p. 67-77, 2012.

ZANOL, F. M. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC): um mecanismo de resistência emergente. **Suplemento especial de microbiologia e micologia**, v. 48, n. 3 supl 1, p. 4-9, 2016.

ZHENG, S. H.; CAO, S. J.; XU, H., FENG, D.; WAN, L. P.; WANG, G. J.; XIAO, X. G. Risk factors, outcomes and genotypes of carbapenem-nonsusceptible *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infection: a three-year retrospective study in a large tertiary hospital in Northern China. **Infectious Diseases**, p. 1-9, 2018.

ZIVANORVIC, V.; BUKARICA, L. G.; SCEPANOVIC, R.; VITOROVIC, T.; NOVAKOVIC, R.; MILANOV, N.; BUKUMIRIC, Z.; CAREVIC, B.; TRAJKOVIC, J.; RAJKOVIC, J.; DJOKIC, V. Differences in antimicrobial consumption, prescribing and isolation rate of multidrug resistant *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* on surgical and medical wards. **PloS one**, v. 12, n. 5, p. e0175689, 2017.

ZORITA, S.; MÅRTENSSON, L.; MATHIASSEN, L. Occurrence and removal of pharmaceuticals in a municipal sewage treatment system in the south of Sweden. **Science of the total environment**, v. 407, n. 8, p. 2760-2770, 2009.

ZOU, L. K.; WANG, H. N.; ZENG, B.; ZHANG, A. Y.; LI, J. N.; LI, X. T.; TIAN, G. B.; WEI, K.; ZHOU, Y. S.; XU, C. W.; YANG, Z. R. Phenotypic and genotypic characterization of β -lactam resistance in *Klebsiella pneumoniae* isolated from swine. **Vet Microbiol**, v.149, n. 1, p. 139-46, 2011

APÊNDICE

APÊNDICE A- Isolados e confirmados de *Klebsiella pneumoniae*.

Isolados	Espécie	Sítios de isolamento
1	<i>Canis lupus familiaris</i> (Cachorro doméstico)	Suabe otológico
2	<i>Canis lupus familiaris</i> (Cachorro doméstico)	Suabe otológico
3	<i>Canis lupus familiaris</i> (Cachorro doméstico)	Suabe otológico
4	<i>Canis lupus familiaris</i> (Cachorro doméstico)	Suabe otológico
5	<i>Canis lupus familiaris</i> (Cachorro doméstico)	Urina
6	<i>Canis lupus familiaris</i> (Cachorro doméstico)	Urina
7	<i>Canis lupus familiaris</i> (Cachorro doméstico)	Urina
8	<i>Canis lupus familiaris</i> (Cachorro doméstico)	Urina
9	<i>Canis lupus familiaris</i> (Cachorro doméstico)	Urina
10	<i>Canis lupus familiaris</i> (Cachorro doméstico)	Urina
11	<i>Canis lupus familiaris</i> (Cachorro doméstico)	Urina
12	<i>Canis lupus familiaris</i> (Cachorro doméstico)	Pele (secreção interdigital)
13	<i>Canis lupus familiaris</i> (Cachorro doméstico)	Suabe ocular
14	<i>Canis lupus familiaris</i> (Cachorro doméstico)	Suabe ocular
15	<i>Canis lupus familiaris</i> (Cachorro doméstico)	Líquido torácico
16	<i>Canis lupus familiaris</i> (Cachorro doméstico)	Fezes
17	<i>Felis catus</i> (Gato doméstico)	Urina
18	<i>Felis catus</i> (Gato doméstico)	Urina
19	<i>Felis catus</i> (Gato doméstico)	Suabe otológico
20	<i>Felis catus</i> (Gato doméstico)	Líquido da cavidade abdominal
21	<i>Felis catus</i> (Gato doméstico)	Fezes
22	<i>Suis scrofa domesticus</i> (porco doméstico)	Pulmão
23	<i>Suis scrofa domesticus</i> (porco doméstico)	Pulmão
24	<i>Bos taurus</i> (Boi)	Leite
25	<i>Bos taurus</i> (Boi)	Líquido articular
26	<i>Bos taurus</i> (Boi)	Fezes
27	<i>Bos taurus</i> (Boi)	Suabe ocular
28	<i>Bos taurus</i> (Boi)	Suabe ocular

Isolados	Espécie	Sítios de isolamento
29	<i>Bos taurus</i> (Boi)	Fígado
30	<i>Bos taurus</i> (Boi)	Pulmão
31	<i>Equus caballus</i> (Cavalo)	Lavado traqueobrônquico
32	<i>Equus caballus</i> (Cavalo)	Lavado traqueobrônquico
33	<i>Equus caballus</i> (Cavalo)	Intestino
34	<i>Equus caballus</i> (Cavalo)	Intestino
35	<i>Equus caballus</i> (Cavalo)	Fígado
36	<i>Equus caballus</i> (Cavalo)	Pulmão
37	<i>Equus caballus</i> (Cavalo)	Urina
38	<i>Equus caballus</i> (Cavalo)	Placenta
39	<i>Rattus norvegicus</i> (Rato)	Pele
40	<i>Ramphastos toco</i> (Tucano-toco)	Cavidade oral
41	<i>Ramphastos toco</i> (Tucano-toco)	Pulmão (abscesso)
42	<i>Buteogallus meridionalis</i> (Gavião-caboclo)	Saco aéreo
43	<i>Ara ararauna</i> (Arara-canindé)	Inglúvio
44	<i>Ara ararauna</i> (Arara-canindé)	Pulmão
45	<i>Ara ararauna</i> (Arara-canindé)	Saco aéreo
46	<i>Platycercus euimius</i> (roselha do leste)	Pulmão
47	<i>Anodorhynchus hyacinthinus</i> (Arara azul)	Cavidade oral (caseum)
48	<i>Anodorhynchus hyacinthinus</i> (Arara azul)	Encéfalo
49	<i>Anodorhynchus hyacinthinus</i> (Arara azul)	Fígado
50	<i>Anodorhynchus hyacinthinus</i> (Arara azul)	Lesão membro posterior
51	<i>Anodorhynchus hyacinthinus</i> (Arara azul)	Lesão membro posterior
52	<i>Anodorhynchus hyacinthinus</i> (Arara azul)	Lesão membro posterior
53	<i>Nyctibius griseus</i> (urutau)	Saco aéreo
54	<i>Nyctibius griseus</i> (urutau)	Pulmão
55	<i>Cairina moschata</i> (pato do mato)	Cavidade oral
56	<i>Amazona aestiva</i> (papagaio verdadeiro)	Pulmão
57	<i>Tigrisoma lineatum</i> (Socó)	Suabe cloacal
58	<i>Boa constrictor</i> (Jibóia-constritora)	Pele
59	<i>Caiman yacare</i> (Jacaré)	Coração
60	<i>Puma concolor</i> (Onça parda)	Urina
61	<i>Sapajus apella</i> (Macaco prego)	Fezes
62	<i>Cerdocyon thous</i> (cachorro do mato)	Fezes
63	<i>Cerdocyon thous</i> (cachorro do mato)	Cavidade oral
64	<i>Nasua nasua</i> (Quati)	Fezes
65	<i>Nasua nasua</i> (Quati)	Fezes
66	<i>Myrmecophaga tridactyla</i> (Tamanduá bandeira)	Suabe nasal
67	<i>Tapirus terrestres</i> (Anta)	Fezes

APÊNDICE B – Artigo submetido para Revista Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia

Title: Antimicrobial susceptibility profile of *Klebsiella pneumoniae* isolated from domestic and wild animals

Título: Perfil de susceptibilidade antimicrobiana de *Klebsiella pneumoniae* isoladas de animais domésticos e silvestres

Autores e afiliação: Ito, A. T. H.¹, Makino, H.¹, Bruno, V. C. M.¹, Candido, S. L. Nakazato, L.¹, Dutra V.¹.

INSTITUTION: ¹UFMT-Universidade Federal de Mato Grosso (Av. Fernando Corrêa da Costa, nº 2367 - Bairro Boa Esperança. Cuiabá - MT - 78060-900 Fone/PABX: +55 (65) 3615- 8000 / FAX: +55 (65) 3628-1219).

ABSTRACT

Klebsiella pneumoniae (*K. pneumoniae*) is an opportunistic pathogen responsible for several types of nosocomial infections and is considered a multiresistant microorganism. As they are rich in domestic and wild animals with antimicrobial susceptibility profile of *K. pneumoniae*, the objective of this work was to evaluate the profile of their increase of antimicrobial resistance within Veterinary Medicine. A total of 67 *K. pneumoniae* isolates from different lesion sites of domestic (39/67) and wild (28/67) animals, confirmed by sequencing of the 16S rRNA gene. The highest percentage of *K. pneumoniae* isolation was from urine isolates with 16% (11/67), lung 13% (09/67) and faeces 12% (08/67). There is no susceptibility profile with tested 11 categories of antibiotics, being a higher resistance rate to metronidazole 97% (65/67), ampicillin 94% (63/67), amoxicillin 93% (62/67), sulfonamides 93% (62/67), colistin 93% (62/67) and nitrofurantoin 88% (59/67). Those with the lowest resistance taxa: meropenem 3% (2/67), imipenem 6% (4/67) and amikacin 16% (11/67). All isolates demonstrated a multidrug resistance phenotype, being considered multiresistant bacteria (MDR). The result of this study reinforces that the animals are reservoirs of multiresistant *K. pneumoniae*.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, multiresistance, susceptibility profile, MDR.

RESUMO

Klebsiella pneumoniae (*K. pneumoniae*) é um patógeno oportunista responsável por diversos tipos de infecções nosocomiais e é considerado um microrganismo multirresistente. Como possuem poucos relatos em animais domésticos e silvestres de perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de *K. pneumoniae*, o objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil e o seu aumento das resistências a antimicrobianos dentro da Medicina Veterinária. Um total de 67 isolados de *K. pneumoniae* provenientes de diferentes sítios de lesão de animais domésticos (39/67) e silvestres (28/67), foram confirmados por sequenciamento do gene 16S rRNA. O maior percentual de isolamento de *K. pneumoniae* foi de isolados de urina com 16% (11/67), pulmão 13% (09/67) e fezes 12% (08/67). No perfil de susceptibilidade foram testados 11 categorias de antibióticos, sendo a maior taxa de resistência ao metronidazol 97% (65/67), ampicilina 94% (63/67), amoxicilina 93% (62/67), sulfonamidas 93% (62/67), colistina 93%(62/67) e nitrofurantoína 88% (59/67). Os que apresentaram menor taxa de resistência foram: meropenem 3% (2/67), imipenem 6% (4/67) e amicacina 16% (11/67). Todos os isolados demonstraram um fenótipo de multirresistência, sendo 100% (67/67) consideradas bactérias multirresistentes (MDR). O resultado deste estudo reforça que os animais são reservatórios de *K. pneumoniae* multirresistentes.

Palavras-chave: *Klebsiella pneumoniae*, multirresistência, perfil de susceptibilidade, MDR.

INTRODUÇÃO

As infecções clínicas causadas por bactérias multirresistentes tem causado grande preocupação mundial, sendo considerado um grave problema médico-social. Estão comumente associadas às falhas em terapias, aumento dos custos dos tratamentos e na morbidade e mortalidade de pacientes (PEREIRA *et al.*, 2015).

Uma diversidade de patógenos pode estar relacionada à etiologia dessas infecções. Dentre as bactérias Gram-negativas, responsáveis por grande parte das infecções nosocomiais resistentes, a *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*), pertencente à família *Enterobacteriaceae*, destaca-se pela habilidade de desenvolver mecanismos de resistência enzimáticos e são consideradas grandes responsáveis por diferentes doenças infecciosas (KOLPA *et al.*, 2018).

As doenças causadas por *K. pneumoniae* geralmente estão relacionadas com o estado imunológico do hospedeiro e sua gravidade muitas vezes é potencializada devido a

capacidade patogênica da cepa capaz de criar um fenótipo de multirresistência ao uso exacerbado de antimicrobianos (PEREIRA *et al.*, 2015).

Estudos de resistência de isolados de origem animal são escassos no Brasil, desta forma, o objetivo deste estudo foi investigar o perfil de susceptibilidade à antimicrobiana da *K. pneumoniae* isolados em animais domésticos e silvestres.

MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos adotados neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais - Universidade Federal de Mato Grosso (CEUA-UFMT), sob o número de protocolo 23108.236834/2017-13.

Os isolados foram oriundos de materiais recebidos e processados no Laboratório de Microbiologia do Hospital Veterinário da UFMT de diferentes sítios de lesões de animais domésticos e silvestres, sendo no total 67 isolados de amostras coletadas em 2016 e 2017.

Os materiais foram semeados em Ágar sangue ovino 8% (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemanha) Ágar MacConkey (Neogen Corporation, São Paulo, Brasil), em aerobiose, incubadas a 37°C por até 72 horas, sendo feito a leitura das placas em 24, 48 e 72 horas. A identificação das colônias foi realizada de acordo com Quinn *et al.* (1994), através de morfologia, coloração de Gram, prova da catalase, teste de oxidase e série bioquímica (Triplo Sugar Iron- TSI, Sulfeto Indol Motilidade- SIM, Teste OF- GOF, Citrato, Manitol, Inusitol e Uréia).

Após o isolamento, DNA genômico dos isolados foi extraído através da inoculação de uma colônia em Caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI - Himedia Labs. Mumbai, Índia) e incubado sob agitação a 37°C *overnight*, realizado pelo método fenol-clorofórmio de acordo com Sambrook e Russel (2001).

Os DNAs extraídos foram submetidos à PCR do gene 16S rRNA. A sequência de oligonucleotídeos utilizada foi 27F: AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG (LANE, 1991) e 1492R: GGT TAC CTT GTT ACG ACT T (TURNER *et al.*, 1999) que amplifica um fragmento de 1512 pares de base (pb).

Cada reação foi composta de 10ng de DNA, 0,4 pmol de cada oligonucleotídeo, 0,2mM de *deoxynucleoside triphosphates* (dNTPs, Sigma-Aldrich), 3mM de MgCl₂, 1x PCR *buffer*, 1U de taq DNA polimerase (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, Califórnia, EUA) e água ultrapura q.s.p. para volume final de 25 µL. As reações foram amplificadas em um termociclador My CyclerTM (Biorad, Califórnia, EUA) com desnaturação

inicial de 5 minutos a 95°C, sucedido de 35 ciclos de desnaturação por 45 segundos a 95°C, hibridização por 1 minuto a 52°C e 1 minuto e 30 segundos a 72°C de extensão, sendo concluída com um ciclo de extensão final a 72°C por 7 minutos. Os produtos de PCR foram fracionados em gel de agarose 1,0%, corado com Gel Red™ (Biotium®, UK) a 10 V/cm e visualizados em fotodocumentador.

Posteriormente, o produto obtido pela PCR foi purificado e sequenciado, no sequenciador automático ABI 3500 *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems Foster, CA, USA), de acordo com as recomendações do fabricante. As sequências foram comparadas com o banco de dados do GenBank usando o BLAST no servidor NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), sendo selecionados os isolados que tiveram identidade de no mínimo 97% com a *K. pneumoniae* para a realização do teste de susceptibilidade.

O teste de susceptibilidade aos antimicrobianos foi realizado pelo método de difusão em disco como descrito pelo Bauer e Kirb (1966), sendo testadas 11 categorias de antibióticos como os β-lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos), aminoglicosídeo, quinolonas, fenicol, tetracíclicos, polimixina, nitroimidazol, nitrofuranos e sulfonamidas. Os discos testados foram: ampicilina(10µg), amoxicilina(10µg), amoxicilina com ácido clavulanato(30µg), amicacina(30µg), gentamicina(10µg), neomicina(30µg), cefalexina(30µg), ceftiofur(30µg), enrofloxacina(5µg), ciprofloxacina(5µg), marbofloxacina(5µg), imipinem(10µg), meropenem(10µg), cloranfenicol(30µg), doxiciclina(30µg), colistina(10µg), metronidazol(50µg), nitrofurantoína(300µg), sulfonamidas(300µg) e sulfonamidas com trimetoprim(25µg). Foram classificados de acordo com os critérios do *Clinical and Laboratory Standards Institute* – CLSI (2016) sendo que os que apresentaram como parcialmente sensíveis e resistentes foram agrupados como resistentes.

Os isolados foram classificadas quanto ao perfil de resistência como descrito pelo Magiorakos *et al.* (2012), na qual é definida como bactéria multirresistente a drogas (MDR) quando possui resistência a um ou mais agente em três ou mais categorias de antimicrobianos.

RESULTADOS

Foram confirmadas 67 amostras como *K. pneumoniae* pelo sequenciamento, sendo 58% (39/67) de isolados de animais domésticos e 42% (28/67) de animais silvestres (Tab. 1). A distribuição entre as espécies animais foram caninos 41% (16/39), equinos 21% (8/39), bovinos 18% (7/39) felinos 13% (5/39), suínos 5% (2/39) e roedor 2% (1/39); o restante 42% (28/67) (Tabela 1).

Tabela 1. Relação de animais domésticos e silvestres diagnosticados – Cuiabá- 2017

	Hospedeiro (Nome popular)	Hospedeiro (Nome científico)	Total
Domésticos (n=39)	Canina	<i>Canis lupus familiaris</i>	16
	Equina	<i>Equus caballus</i>	8
	Bovina	<i>Bos taurus</i>	7
	Felina	<i>Felis catus</i>	5
	Suína	<i>Suis scrofa domesticus</i>	2
	Roedor	<i>Rattus norvegicus</i>	1
Silvestres (n=28)	Tucano-toco	<i>Ramphastos toco</i>	2
	Gavião-caboclo	<i>Buteogallus meridionalis</i>	1
	Arara-canindé	<i>Ara ararauna</i>	3
	Roselha do leste	<i>Platycercus euimius</i>	1
	Arara azul	<i>Anodorhynchus hyacinthinus</i>	6
	Urutau	<i>Nyctibius griséus</i>	2
	Pato do mato	<i>Cairina moschata</i>	1
	Papagaio verdadeiro	<i>Amazona aestiva</i>	1
	Socó	<i>Tigrisoma lineatum</i>	1
	Jibóia-constrictora	<i>Boa constrictor</i>	1
	Jacaré	<i>Caiman yacare</i>	1
	Onça parda	<i>Puma concolor</i>	1
	Macaco prego	<i>Sapajus apela</i>	1
	Cachorro do mato	<i>Cerdocyon thous</i>	2
	Quati	<i>Nasua nasua</i>	2
	Tamanduá bandeira	<i>Myrmecophaga tridactyla</i>	1
	Anta	<i>Tapirus terrestres</i>	1

Os isolados foram obtidos de diferentes sítios de isolamento, sendo 22 locais diferentes: urina 16% (11/67), pulmão 13% (09/67), fezes 12% (08/67), suabe otológico 7% (05/67), cavidade oral 6% (04/67), suabe ocular 6% (04/67), fígado 4% (03/67), lesão de membro 4% (03/67), saco aéreo 4% (03/67), pele 4% (03/67), lavado traqueobrônquico 3% (02/67), intestino 3% (02/67), coração 1% (01/67), encéfalo 1% (01/67), ingluvío 1% (01/67), leite 1% (01/67), líquido articular 1% (01/67), líquido torácico 1% (01/67), líquido abdominal 1% (01/67), placenta 1% (01/67), suabe de cloaca 1% (01/67) e suabe nasal 1% (01/67). O material que houve mais isolamento de *K. pneumoniae* foram amostras de urina 16% (11/67), pulmão 13% (09/67) e fezes 12% (08/67).

No teste de difusão em disco, foram observados altos percentuais de susceptibilidade aos antimicrobianos testados de acordo com os critérios do CLSI 2016 (Tab. 2).

Tabela 2. Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos dos isolados de *K. pneumoniae* através de difusão em ágar.

Antimicrobianos Categorias	Resistência* (%)			
	Agente	Domésticos (n=39)	Silvestres (n=28)	Total (n= 67)
Penicilinas β- lactâmicos	Amoxicilina	92% (36/39)	93% (26/28)	93% (62/67)
	AMC	44% (17/39)	50% (14/28)	46% (31/67)
	Ampicilina	92% (36/39)	96% (27/28)	94% (63/67)
Cefalosporinas β- lactâmicos	Cefalexina	44% (17/39)	64% (18/28)	51% (34/67)
	Ceftiofur	49% (19/39)	61% (17/28)	51% (34/67)
Carbapenêmicos β- lactâmicos	Meropenem	5% (2/39)	0% (0/28)	3% (2/67)
	Imipenem	3% (1/39)	11% (3/28)	6% (4/67)
Aminoglicosídeos	Amicacina	20% (7/39)	14% (4/28)	16% (11/67)
	Gentamicina	38% (15/39)	36% (10/28)	37% (25/67)
	Neomicina	69% (27/39)	75% (21/28)	72% (48/67)
Quinolonas	Enrofloxacina	62% (24/39)	75% (21/28)	67% (45/67)
	Ciprofloxacina	49% (19/39)	46% (13/28)	48% (32/67)
	Marbofloxacina	54% (21/39)	61% (17/28)	57% (38/67)
Fenicol	Cloranfenicol	51% (20/39)	68% (19/28)	58% (39/67)
Polimixina	Colistina	87% (34/39)	93% (26/28)	93% (62/67)
Tetracíclicos	Doxiciclina	44% (17/39)	79% (22/28)	43% (29/67)
Nitroimidazol	Metronidazol	95% (37/39)	100% (28/28)	97% (65/67)
Nitrofuranos	Nitrofurantoína	82% (32/39)	96% (27/28)	88% (59/67)
Sulfonamidas	Sulfonamidas	97% (38/39)	96% (27/28)	93% (62/67)
	SUT	44% (17/39)	36% (10/28)	40% (27/67)

Legenda: AMC: Amoxicilina + Acido clavulânico; SUT: Sulfonamida+Trimetoprima

Colistina: Polimixina E

*Classificamos como resistentes às amostras classificadas como intermediária e resistente nos testes.

Em relação ao perfil de susceptibilidade dos isolados do estudo, tanto em animais domésticos como silvestres foi observada alta resistência a metronidazol 97% (65/67), ampicilina 94% (63/67), amoxicilina 93% (62/67), sulfonamidas 93% (62/67), colistina 93% (62/67) e nitrofurantoína 88% (59/67). Os que apresentaram menor taxa de resistência foram: meropenem 3% (2/67), imipenem 6% (4/67) e amicacina 16% (11/67) (Tab. 2).

Todos os isolados foram multirresistentes, sendo observado o tipo de resistência MDR.

DISCUSSÃO

Um dos maiores problemas na saúde pública é o aumento de cepas multirresistentes a antimicrobianos e dentre as bactérias pertencentes a este grupo, está a *K. pneumoniae* que pode pertencer à microbiota do trato intestinal de animais e humanos.

A ocorrência de *K. pneumoniae* neste estudo foi maior em animais domésticos, principalmente cães e equinos, provavelmente devido ao maior número de amostras recebidas,

no entanto, foi observado alta frequência de isolados de aves silvestres. Existe relato de estudo envolvendo gaviões carijós, onde foi coletado suabe cloacal de nove animais saudáveis para estudo de microbiota e foi identificada *K. pneumoniae* (DE ARAÚJO SILVA *et al.*, 2016). Em aves esta bactéria está envolvida em processos mórbidos, e são identificadas como causadora de enterites, podendo levar a óbitos (MELVILLE *et al.*, 2004).

As principais infecções que a *K. pneumoniae* causam em humanos são urinárias, pulmonares e enterites, principalmente em hospedeiros imunocomprometidos (PEREIRA *et al.*, 2015), como foi observado nos isolados deste estudo.

Observamos em animais domésticos e silvestres o aumento de resistência antimicrobiana em isolados de *K. pneumoniae*, principalmente aos β - lactâmicos como a amoxicilina e ampicilina por terem capacidade de produzir enzimas hidrolíticas, que inativam os antimicrobianos da classe, sendo o mecanismo de resistência bacteriana mais importante (OGALO *et al.*, 2016). No entanto, dentro deste mesmo grupo quando se utilizou a associação de penicilina com inibidor da β -lactamase encontramos um aumento de sensibilidade.

Os isolados apresentaram altas taxas de resistência para o metronidazol, o que divergiu comparado com isolados de humanos (NAKANO *et al.*, 2011). O metronidazol é muito utilizado na Medicina Veterinária em animais de companhia em razão de sua excelente atividade contra microrganismos anaeróbicos e protozoários, e isso pode ter levado a aquisição de mecanismos de resistência a esse antibiótico (DECHAN, 1997).

A resistência a sulfonamidas encontra-se amplamente disseminada em bactérias isoladas de animais, refletindo o uso indiscriminado destas drogas ao longo de anos como melhoradores de desempenho animal, controle de infecções e tratamento. Isso limitou muito a eficácia deste fármaco no tratamento de doenças bacterianas de animais, assim são poucas as indicações para uso primário (BEZERRA *et al.*, 2017).

Atualmente na medicina humana a polimixina B e E são utilizadas como opção terapêutica causada por bactérias multirresistentes, principalmente as Gram negativas. Apesar de as taxas de resistência às polimixinas serem consideradas baixas na medicina humana, já existem relatos de resistência a esses antibióticos, principalmente a colistina em isolados de *K. pneumoniae* (JEANNOT *et al.*, 2017; HERNANDEZ *et al.*, 2018). Em isolados de animais já apresenta altas taxas de resistência por ser ter sido muito utilizada como melhoradores de desempenho em animais de produção, como aditivo da composição na ração para aves, bovino e suíno, tendo hoje seu uso proibido para animais de produção (MAPA, 2017).

Em isolados de animais silvestres (96%) e domésticos (82%) foram observadas altas taxas de resistência em nitrofurantoína, isso também se deve ao uso indiscriminado deste

antibiótico como aditivos melhoradores de desempenho em animais de produção, o que pode ter levado a contaminação ambiental e aquisição de resistência pelas bactérias a esse fármaco (BEZERRA *et al.*, 2017). Em contrapartida, na medicina humana, esse antimicrobiano voltou a ser utilizado, por ser bactericida de amplo espectro. Com o aumento contínuo da resistência aos antibióticos em bactérias Gram negativas produtoras de β -lactamases de espectro estendido (ESBL) e a disponibilidade limitada de novos antibióticos, o uso da nitrofurantoína, têm sido reavaliado, principalmente para o tratamento de infecções do trato urinário, e tem apresentado eficiência contra a maioria dos isolados de *K. pneumoniae* (SEIFU e GEBISSA, 2018).

Dentro dos aminoglicosídeos, a amicacina apresentou maior perfil de sensibilidade, e é o que tem menor potencial para induzir a resistência bacteriana, pois a *K. pneumoniae* possui pouca detecção do gene metilase que é o principal mecanismo de resistência a esse fármaco, por isso são muito utilizados para o tratamento de infecções nosocomiais (JAJIĆ *et al.*, 2017; ZHENG *et al.*, 2018).

Os carbapenêmicos apresentaram baixa taxa de resistência, pois esta classe ainda é pouco utilizada na Medicina Veterinária. São utilizados em animais de companhia, em infecções graves (MONTEANI-FERREIRA *et al.*, 1999). Já os isolados de humanos tem apresentado alta taxa de resistência pela presença enzima carbapenemase (KPC) como descrito pelos autores (PEREIRA *et al.*, 2015; JAJIĆ *et al.*, 2017).

De acordo com os estudos de Jeannot *et al.* (2017); Wang *et al.* (2018); Hernández *et al.* (2018), observamos uma alta resistência a maioria dos antimicrobianos, neste estudo todos os isolados foram classificados como MDR. Em um estudo realizado por Kolpa e colaboradores (2018) foi analisado o perfil de susceptibilidade a antimicrobianos em uma Unidade de Tratamento Intensivo (UTI) humana no sul da Polônia, onde foram estudados 510 isolados de pacientes de diversos quadros clínicos, como pneumonia, infecção sanguínea, infecção do trato urinário, enterites, infecção no local cirúrgico, infecção da pele e tecidos moles, e outras infecções. Dos 120 isolados de *Acinetobacter baumannii*, 99% dos isolados foram classificadas como MDR, dos 35 isolados de *K. pneumoniae*, 42% foram classificados como MDR. Portanto deve ocorrer o monitoramento da resistência aos medicamentos das cepas multirresistentes.

Existem muitos estudos descrevendo que o uso de antibióticos na Medicina Veterinária proporciona uma transferência de resistência para as bactérias emergentes humanas, pois muitas classes destes fármacos que são usadas em animais também são empregadas em seres humanos. Vários questionamentos têm sido feitos em relação ao risco

para a saúde pública pelo uso exacerbado de fármacos na produção animal e na agricultura (ARIAS e DE MAIO CARRILHO, 2012).

De acordo com Gandolfi-Decristophorus *et al.* (2013) existe esta associação e já foi relatada a transferência de material genético entre espécies, sendo que isolados de humanos e animais apresentam similaridades genéticas. Porém, Phillips *et al.* (2004) afirmam que maior causa de resistência em medicina humana advém de tratamento mal conduzido, que a influência de terapias em animais são mínimas e as bactérias isoladas de animais não persistem em seres humanos. Mesmo com a eliminação do uso de antimicrobianos em animais, não reduzirá a multirresistência das bactérias na medicina humana se o uso de forma imprudente nas terapias continuar.

Foi realizado um estudo em vários países da União Europeia relacionado à susceptibilidade antimicrobiana de isolados intestinais de *Escherichia coli*, *Salmonella* spp, *Campylobacter* spp e *Enterococcus* spp de frangos, suínos e bovinos e constatou-se uma variação na resistência entre antimicrobianos, bactérias, hospedeiros e países. Observou-se uma baixa ou ausência de resistência em isolados de *Escherichia coli*, *Campylobacter* spp, *Enterococcus* spp e *Salmonella* spp a novos antimicrobianos usados em humanos, restritos a uso hospitalar, enquanto que resistência aos antimicrobianos mais utilizados na Medicina Veterinária e mais antigos como ampicilina, tetraciclina e sulfametoxazol-trimetoprima apresentou-se alta. Concluiu-se que os antimicrobianos utilizados somente na Medicina Humana apresentaram baixa ou nula taxa de resistência (DE JONG *et al.*, 2009) como foi observada no nosso estudo.

Um dos problemas na atualidade é o uso e a prevalência ambiental de produtos farmacêuticos ativos, que são detectados em todo meio ambiente como água, solo, sedimentos, esgotos e lamas (LEES *et al.*, 2016). A presença de antibióticos no meio ambiente é uma preocupação séria por poder levar ao surgimento de resistência. De acordo com o Martinez (2004), as atividades comerciais e o transporte entre países podem levar a presença de bactérias resistentes em populações humanas e animais, incluindo espécies silvestres e aves que não receberam antimicrobianos. Neste estudo foram observadas altas taxas de resistência mesmo em animais silvestres de vida livre que não haviam sido medicados, que provavelmente adquiriram estas bactérias multirresistentes pela contaminação ambiental (JECHALKE *et al.*, 2014).

Os resultados do presente estudo reforçam a importância do antibiograma como parâmetro para tratamento eficiente, visto que o tratamento empírico pode levar a resistência antimicrobiana.

CONCLUSÕES

A *K. pneumoniae* se torna cada vez mais uma ameaça à saúde pública, pela alta taxa de resistência a antimicrobianos observada nos isolados de animais domésticos e silvestres. Neste estudo se evidenciou a ocorrência de isolados MDR com alta resistência a metronidazol, ampicilina, amoxicilina, sulfonamidas, colistina e nitrofurantoína em isolados de animais domésticos e silvestres. Estes animais podem ser uma fonte de isolados resistentes aos principais antimicrobianos utilizados em medicina humana.

São necessárias medidas de controle da disseminação de resistência a sendo uma das formas para diminuir o uso indiscriminado dos antibióticos, a realização de cultura e antibiograma para tratamento mais eficaz, com administração em doses corretas por tempo adequado.

REFERÊNCIAS

ARIAS, M. V. B.; DE MAIO CARRILHO, C. M. D. Antimicrobial resistance in animals and in human being. There is reason for concern?. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 33, n. 2, p. 775-790, 2012.

BAUER, A. W.; KIRBY, W. M. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American journal of clinical pathology*, v. 45, n. 4, p. 493, 1966.

BEZERRA, W. G. A.; HORN, R. H.; SILVA, I. N. G.; TEIXEIRA, R. S. C.; LOPES, E. S.; ALBUQUERQUE, Á. H.; CARDOSO, W. C. Antibióticos no setor avícola: uma revisão sobre a resistência microbiana. *Archivos de Zootecnia*, v. 66, n. 254, p. 301-307, 2017.

CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Wayne, PA: *Clinical and Laboratory Standards Institute*, 26th informational supplement, 2016. (CLSI document M100-S26).

DE ARAÚJO SILVA, E. F.; DE BARROS, J. F. S.; FRAGA, K. B.; MAGALHÃES, C. P.; GARCIA, J. E.; CAVALCANTI, I. M. F. Enterobacterias isoladas da cloaca de Gaviões-

carijós (*Rupornis magnirostris*, GMELIN, 1788) cativos e seu perfil de susceptibilidade a antimicrobianos. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 53, n. 2, p. 207-213, 2016.

DE JONG, A.; BYWATER, R.; BUTTY, P.; DEROVER, E.; GODINHO, K.; KLEIN, U.; MARION, H.; SIMJEE, S.; SMETS, K.; THOMAS, V.; VALLÉ, M.; WHEADON, A. A pan-European survey of antimicrobial susceptibility towards human-use antimicrobial drugs among zoonotic and commensal enteric bacteria isolated from healthy food-producing animals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, London, v. 63, n. 4, p. 733-744, 2009.

DECHAN, J. Combination of medical and surgical therapy for pleuropneumonia in a horse. *The Canadian Veterinary Journal*, v. 38, n. 8, p. 499, 1997.

GANDOLFI-DECRISTOPHORIS, P.; PETRINI, O.; RUGGERI-BERNARDI, N.; SCHELLING, E. Extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in healthy companion animals living in nursing homes and in the community. *American journal of infection control*, v. 41, n. 9, p. 831-835, 2013.

HERNÁNDEZ, M.; QUIJADA, N. M.; LORENTE, L. L. U.; DE FRUTOS, M.; RODRÍGUEZ-LÁZARO, D.; EIROS, J. M. Infrequent isolation of extensively drug-resistant (XDR) *Klebsiella pneumoniae* resistant to colistin in Spain. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2018.

JAJIĆ, I.; BENČIĆ, A.; SIROGLAVIĆ, M.; ZARFEL, G. RUŽIĆ, B., PEZELJ, I.; BEDENIĆ, B. *Klebsiella pneumoniae* oxa-48 in a urology patient: case report. *Acta clinica Croatica*, v. 56, n. 1., p. 166-171, 2017.

JEANNOT, K.; BOLARD, A.; PLÉSIAT, P. Resistance to polymyxins in Gram-negative organisms. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 49, n. 5, p. 526-535, 2017.

JECHALKE, S.; HEUER, H.; SIEMENS, J.; AMELUNG, W.; SMALLA, K. Fate and effects of veterinary antibiotics in soil. *Trends in microbiology*, v. 22, n. 9, p. 536-545, 2014.

KOŁPA, M.; WAŁASZEK, M.; GNIADK, A. WOLAK, Z.; DOBROŚ, W. Incidence, Microbiological Profile and Risk Factors of Healthcare-Associated Infections in Intensive Care Units: A 10 Year Observation in a Provincial Hospital in Southern Poland. *International journal of environmental research and public health*, v. 15, n. 1, p. 112, 2018.

LANE, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. Nucleic acid techniques in bacterial systematics, *New York: John Wiley & Sons*, p. 125-175, 1991.

LEES, K.; FITZSIMONS, M.; SNAPE, J.; TAPPIN, A.; COMBER, S. Pharmaceuticals in soils of lower income countries: physico-chemical fate and risks from wastewater irrigation. *Environment international*, v. 94, p. 712-723, 2016.

MAGIORAKOS, A. P.; SRINIVASAN, A.; CAREY, R. B.; CARMELI, Y.; FALAGAS, M. E.; GISKE, C. G.; PATERSON, D. L. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical microbiology and infection*, v. 18, n. 3, p. 268-281, 2012.

MAPA. 2017. Substâncias proibidas na alimentação animal com a finalidade de aditivos e legislação correspondente. <http://www.agricultura.gov.br/noticias/ministerio-da-agricultura-cria-programa-de-prevencao-e-controle-de-antimicrobianos>. Acessado no dia 20/01/2017.

MARTÍNEZ, J.; MARTÍNEZ, L. How are gene sequence analyses modifying bacterial taxonomy? The case of Klebsiella. *International Microbiology*, Barcelona, v. 7, p. 261-268, 2004.

MELVILLE, P. A.; COGLIATI, B.; MANGIATERRA, M. B. B. C. D.; PERES, M. R.; ALVES MOURA, S. C. A.; MATSUDA, L.; KIM, A.; BENITES, N. R. Determinação da microbiota presente na cloaca e orofaringe de avestruzes (*Struthio camelus*) clinicamente saudáveis. *Ciência Rural*, v. 34, n. 6, 2004.

MONTEANI-FERREIRA, F.; WARTH, J. F.; PACHALY, J. R.; REIFUR, L.; DOTTI, C. F. Contribuição ao estudo da ação da meropenem, in vitro e in vivo, em infecções diagnosticadas em pequenos animais. *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR*, v. 2, n. 2, 1999.

NAKANO, V.; SILVA, A. N.; MERINO, V. R. C.; WEXLER, H. M.; CAMPOS, M. J. A. Antimicrobial resistance and prevalence of resistance genes in intestinal Bacteroidales strains. *Clinics*, v. 66, p. 543-547, 2011.

OGALO, E. A.; OWUOR, C. O.; BOOR, K. G.; MUTAI, K. K. High prevalence of multi-drug resistant *Klebsiella pneumoniae* in a tertiary teaching hospital in western Kenya. *African journal of infectious diseases*, v. 10, n. 2, p. 89-95, 2016.

PEREIRA, P. S.; BORGHI, M.; de ARAÚJO, C. F.; AIRES, C.A.; OLIVEIRA, J.C.; ASENSI, M.D.; ASSEF, A.P. Clonal dissemination of OXA-370-producing *Klebsiella pneumoniae* in Rio de Janeiro, Brazil. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 59, n. 8, p. 4453-4456, 2015.

PHILLIPS, I.; CASEWELL, M.; COX, T.; DE GROOT, B.; FRIIS, C.; JONES, R.; NIGHTINGALE, C.; PRESTON, R.; WADDELL, J. Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 53, n. 1, p. 28-52, 2004.

QUINN, P.J.; CARTER, M.E.; MARKEY, B.K.; CARTER, G.R. General procedures in microbiology. *Clinical Veterinary Microbiology*. London, Wolfe Publishing, p. 648, 1994.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. Molecular cloning: a laboratory manual. 3 ed. *New York; Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 2004. p.5.65 – 5.67.

SEIFU, W. D.; GEBISSA, A. D. Prevalence and antibiotic susceptibility of Uropathogens from cases of urinary tract infections (UTI) in Shashemene referral hospital, Ethiopia. *BMC infectious diseases*, v. 18, n. 1, p. 30, 2018.

TURNER, S.; PRYER, K.M.; MIAO, V.P.W. & AMP; PALMER, J.D. Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, v. 46, n. 4, p. 327-338, 1999.

WANG, Z.; QIN, R. R.; HUANG, L.; SUN, L. Y. Risk Factors for Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* Infection and Mortality of *Klebsiella pneumoniae* Infection. *Chinese medical journal*, v. 131, n. 1, p. 56, 2018.

ZHENG, S. H.; CAO, S. J.; XU, H., FENG, D.; WAN, L. P.; WANG, G. J.; XIAO, X. G. Risk factors, outcomes and genotypes of carbapenem-nonsusceptible *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infection: a three-year retrospective study in a large tertiary hospital in Northern China. *Infectious Diseases*, p. 1-9, 2018

ANEXO

ANEXO A - Autorização do Comitê de Ética Animal (CEUA).

 UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS 

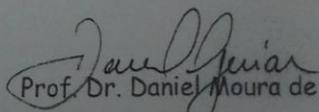
DECLARAÇÃO

Declaramos para os devidos fins e efeitos legais que a pesquisadora Dra. VALERIA DUTRA, submeteu o processo nº 23108.236834/2017-13, intitulado "Detecção de fatores de virulência, genes de resistência e tipagem da Sequência Multi-locus (MLST) de isolados de *Klebsiella pneumoniae* humanos e animais", a análise no Comitê no dia 31/08/2017. Em reunião ordinária realizada em 24/02/2017, ficou definido que segundo a Lei 11.794 de 08/10/2008, Capítulo I, Artigo 2º, item III, não emitiremos o Certificado de Aprovação do referido estudo, uma vez que os pesquisadores utilizarão banco de isolados do referido agente em estudos *in vitro*. O presente comitê entende não se tratar de experimentação animal.

DECLARATION

We declare with legal effect that VALERIA DUTRA PhD submitted the project number 23108.236834/2017-13, entitled "Detection of virulence factors, resistance genes and Multilocus Sequence Typing (MLST) of human and animal *Klebsiella pneumoniae* isolates" for analysis in this committee at August, 31st 2017. During the regular meeting at 24/02/2017, it was established according to the Law no. 11,794 at 08/October/2008, Chapter I, Article 2, and item III, that the present project will not be evaluated by this committee, since researchers will use isolates of *Klebsiella pneumoniae* for *in vitro* studies. The present committee understands that it is not animal testing.

Cuiabá-MT, 01 de setembro de 2017


Prof. Dr. Daniel Moura de Aguiar
Presidente do CEUA

Universidade Federal de Mato Grosso – UFMT
Av. Fernando Costa, s/nº, CEP: 78064-900, Cuiabá, MT

Telefone: (65) 3615 86

ANEXO B – Avaliação Capes da Revista Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia

Qualis Periódicos

***Evento de Classificação:**
 CLASSIFICAÇÕES DE PERIÓDICOS QUADRIÊNIO 2013-2016 ▾

Área de Avaliação:
 MEDICINA VETERINÁRIA ▾ +

ISSN:
 1678-4162

Título:
 Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia

Classificação:
 A2 ▾

[Consultar](#) [Cancelar](#)

Periódicos

ISSN	Título	Área de Avaliação	Classificação
1678-4162	ARQUIVO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA (ONLINE)	MEDICINA VETERINÁRIA	A2

ANEXO C – PÁGINA SUBMISSÃO DO ARTIGO

Submission Confirmation



Thank you for your submission

Submitted to

Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia

Manuscript ID

ABMVZ-2018-10599

Title

Antimicrobial susceptibility profile of *Klebsiella pneumoniae* isolated from domestic and wild animals

Authors

Ito, Alessandra
Makino, Herica
Bruno, Vanessa
Candido, Stefhano
Nogueira, Beatriz
Nakazato, Luciano
Dutra, valeria

Date Submitted

20-Feb-2018
