YAMÊ MINIERO DAVIES

**Virulência e Resistência aos Antimicrobianos de *Klebsiella* spp.
Isoladas de Psitacídeos com Doença Respiratória**

São Paulo

2017

YAMÊ MINIERO DAVIES

**Virulência e Resistência aos Antimicrobianos de *Klebsiella* spp.
Isoladas de Psitacídeos com Doença Respiratória**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Patologia

Área de concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientadora:

Profa. Dra. Terezinha Knöbl

São Paulo

2017

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3594
FMVZ

Davies, Yamê Miniero
Virulência e resistência aos antimicrobianos de *Klebsiella* spp isoladas de psitacídeos com doença respiratória / Yamê Miniero Davies. – 2017.
113 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2018.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientadora: Profa. Dra. Terezinha Knöbl.

1. Psitacídeos. 2. *Klebsiella* spp. 3. Microbiologia. 4. Resistência bacteriana. 5. ESBL.
I. Título.

ERRATA

DAVIES, Y. M. **Virulência e resistência aos antimicrobianos de *Klebsiella* spp. isoladas de psitacídeos com doença respiratória.** 2017. 107 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Página	Onde se lê	Leia-se
Ficha Catalográfica	113 f.	107 f.
RESUMO	113 f.	107 f..
ABSTRACT	113 f.	107 f.

São Paulo, 06 de dezembro de 2017

CEUA N 5174111215

Ilmo(a). Sr(a).

Responsável: Terezinha Knöbl

Área: Ornitopatologia

Profa. Dra. Terezinha Knöbl (orientador)

Título da proposta: "RESISTÊNCIA E VIRULÊNCIA DE ENTEROBACTÉRIAS ISOLADAS DE PSITACÍDEOS COM DOENÇA RESPIRATÓRIA".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais FMVZ/USP

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** o Relatório Final (versão de 28/novembro/2017) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "1. Os objetivos propostos foram todos cumpridos? Resp: Sim. Os resultados obtidos propiciaram a criação de novos projetos? Resp: Sim. 2. O N amostral proposto inicialmente foi suficiente? Qual o N amostral total alocado? Resp: Sim. Foram coletadas 46 aves. 3. Houve perdas? se sim, quantas? Resp: Não. 4. Ocorreu algum evento adverso durante a condução do estudo? Resp: Não. 5. Resultados já apresentados em congresso? Resp: Sim. 6. Resultados já publicados? Resp: Não.".

Comentário da CEUA: "Foi apresentado relatório final com os resultados da dissertação de mestrado com a devida identificação do orientador e orientado.".

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes

Secretária Executiva

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: DAVIES, Yamê Miniero

Título: **Virulência e Resistência aos antimicrobianos de *Klebsiella* spp. Isoladas de Psitacídeos com Doença Respiratória**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho às aves, que me inspiram e me dão forças para estar continuamente perseguindo meus sonhos, e com isso, alcançando crescimento profissional, pessoal e espiritual.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora, Profa. Dra. Terezinha Knöbl, pelo apoio, atenção, preocupação, ensinamentos, disponibilidade, confiança e liberdade que me foram dados ao longo deste projeto.

À Profa. Dra. Andrea Micke Moreno pela contribuição e colaboração, além de ceder seu laboratório para a realização de parte deste trabalho, entre muitos outros. E à equipe do Laboratório de Sanidade Suína e Virologia, em especial aos doutorandos Vasco Túlio de Moura Gomes e Carlos Cabrera, e à Dra. Luiza Zanolli Moreno, que o auxílio foi indispensável na identificação das bactérias deste projeto.

Ao meu amigo e colaborador de tantos trabalhos, doutorando Marcos Paulo Cunha Vieira, sua atenção e conhecimento foram fundamentais para elaboração de projetos de qualidade.

À Profa. Dra. Lilian Marques de Sá, pela colaboração e parceria e auxílio em diversos trabalhos, além do carinho, disponibilidade e atenção concedidos.

Aos meus amigos do Laboratório de Medicina Aviária, Gabriela, Letícia, Mirela, Márcia e Rosely, pelo auxílio no projeto e pela convivência muito agradável, com muita harmonia e risadas.

Ao Prof. Dr. Antonio José Piantino Ferreira e à toda a equipe do Laboratório de Ornitopatologia, pelo acolhimento, ensinamentos e práticas de laboratório que me permitiram conduzir este estudo.

Ao Prof. Dr. Fernando José Benesi do Departamento de Clínica Médica da FMVZ-USP pela doação de sangue de carneiro.

Ao Ambulatório de Aves do HOVET FMVZ USP, pela colaboração com a coleta de grande parte das amostras avaliadas neste estudo. E, em especial, agradeço à minha amiga, professora e pessoa essencial na minha formação profissional, Dra. Marta Brito Guimarães.

À Ana Paula G. Christ, Maria Inês Z. Sato e Mikaela Roberta Funada Barbosa, pela identificação das amostras isoladas neste projeto, através do MALDI TOF.

Agradeço a todas as parcerias de médicos veterinários que colaboram com o envio de amostras coletadas em diversas clínicas veterinárias de São Paulo, em especial, Soraya Málaga, Carla Cabral, Verônica Pardini, Erica Couto, Rafaela Cassaniga e Marcello Schiavo Nardi.

Às minhas amigas queridas que estiveram ao meu lado durante todo este processo, me apoiando tanto nos momentos bons quanto ruins, Natalia Azevedo, Luciana Alegretti Frazão, Gislaine Dalazen e Sandy Lorena Pulecio.

Aos meus pais, Adriano e Amelia, que sempre me deram apoio incondicional, amor e carinho. Sou eternamente grata, vocês acreditaram em mim quando eu mesma não acreditava.

Ao meu marido e tio que sempre estiveram presentes nessa jornada, me dando forças e amor para seguir em frente, Maurício Landi e Augusto Miniero, muito obrigada.

Aos meus animais, que são fiéis, amam incondicionalmente e são muito companheiros. Me inspiram cada dia mais e me fazem lembrar porque escolhi esta profissão.

Agradeço a FAPESP, pelo apoio financeiro e a CNPq pela bolsa de mestrado.

RESUMO

DAVIES, Y. M. **Virulência e Resistência aos Antimicrobianos de *Klebsiella* spp. Isoladas de Psitacídeos com Doença Respiratória.** [Virulence and Antimicrobial Resistance of *Klebsiella* spp. Isolated from Psittacine birds with Respiratory Disease]. 2017. 113 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Os psitacídeos estão entre as espécies de aves mais apreendidas e encaminhadas aos centros de triagem animal em São Paulo. Também são comumente mantidos em ambiente doméstico como aves de estimação. A manutenção destas aves em cativeiro pode representar um risco zoonótico e contribuir para a propagação das estirpes de enterobactérias multirresistentes, como *Klebsiella* spp. produtora de beta-lactamase de espectro estendido (ESBLs), que podem interferir no tratamento de infecções nosocomiais em humanos. O objetivo deste estudo foi identificar e caracterizar estirpes de *Klebsiella* spp. isoladas de secreções respiratórias de 46 psitacídeos doentes, determinando a virulência e o perfil de resistência a 15 antimicrobianos. Dentre as 19 estirpes de *Klebsiella* spp. isoladas, 16 (16/19) foram identificadas como *Klebsiella pneumoniae*, e três (3/19) foram identificadas como *Klebsiella oxytoca*. O perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos demonstrou alta resistência para ampicilina (89,5%), e o perfil de virulência demonstrou uma alta prevalência dos genes *fimH* (94,7%), *kpn* (89,4%), *uge* (84,2%) e *irp-2* (78,9%). Três estirpes de *K. pneumoniae* foram positivas para produção de beta-lactamase de espectro estendido. Estas estirpes foram classificadas nos *sequence types* (STs) ST15, ST147 e ST307. Esses três grupos clonais representam os principais responsáveis por surtos de infecções hospitalares por *K. pneumoniae* no mundo. No entanto, esse é o primeiro relato desses clones como causadores de doença em aves. Esses dados indicam a ocorrência de *K. pneumoniae* produtora de CTX-M-15 e CTX-M-8 em psitacídeos cativos e confirmam o potencial zoonótico e antropozoonótico do agente, destacando a relevância clínica para humanos e animais.

Palavras-chave: Psitacídeos. *Klebsiella* spp. Microbiologia. Resistência bacteriana. ESBL.

ABSTRACT

DAVIES, Y. M. **Virulence and Antimicrobial Resistance of *Klebsiella* spp. Isolated from Psittacines birds with Respiratory Disease.** [Virulência e Resistência aos Antimicrobianos de *Klebsiella* spp. Isoladas de Psitacídeos com Doença Respiratória]. 2017. 113 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Psittacine birds are among the most seized bird species that are sent to animal sorting centers in São Paulo. They are also commonly kept in the domestic environment like pet birds. The maintenance of these birds in captivity may represent a zoonotic risk and contribute to the propagation of strains of multiresistant enterobacteria, such as *Klebsiella* spp. beta-lactamase extended-spectrum (ESBLs), which may interfere in the treatment of nosocomial infections in humans. The objective of this study was to identify and characterize strains of *Klebsiella* spp. isolated from respiratory secretions of 46 diseased psittacines, determining virulence and resistance profile to 15 antimicrobials. Among the 19 strains of *Klebsiella* spp. isolated, 16 (16/19) were identified as *Klebsiella pneumoniae*, and three (3/19) were identified as *Klebsiella oxytoca*. The antimicrobial susceptibility profile demonstrated high resistance to ampicillin (89.5%), and the virulence profile demonstrated a high prevalence of *fimH* (94.7%), *kpn* (89.4%), *uge* (84.2% %) and *irp-2* (78.9%). Three strains of *K. pneumoniae* were positive for extended-spectrum beta-lactamase production. These strains were classified in sequence types (STs) ST15, ST147 and ST307. These three clonal groups represent the main responders for outbreaks of *K. pneumoniae* nosocomial infections worldwide. However, this is the first account of these clones as causing disease in birds. These data indicate the occurrence of *K. pneumoniae* producing CTX-M-15 and CTX-M-8 in captive parrots and confirm the zoonotic and anthroozoonotic potential of the agent, highlighting the clinical relevance for humans and animals.

Keywords: Psittacines. *Klebsiella* spp. Microbiology. Bacterial resistance. ESBL.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição geográfica mundial de KPC.	35
Figura 2 - Secreção nasal em narinas de papagaio verdadeiro (<i>Amazona aestiva</i>).....	48
Figura 3 - Dispneia em papagaio verdadeiro (<i>Amazona aestiva</i>).	49
Figura 4 - Formação caseosa em narinas de papagaio verdadeiro (<i>Amazona aestiva</i>).....	49
Figura 5 - Teste de produção fenotípica de ESBL (beta-lactamases de espectro estendido), pelo método de aproximação de discos.....	51
Figura 6 - Teste positivo para hipermucoviscosidade	51
Figura 7 - Perfis genotípicos (SE-AFLP) de <i>Klebsiella</i> spp. isoladas de psitacídeos cativos com doença respiratória.....	55
Figura 8 - Representação da distribuição das regiões codificadoras no genoma da cepa Kp41 em relação à função dos genes (ST147).	73
Figura 9 - Representação da distribuição das regiões codificadoras no genoma da cepa Kp58 em relação à função dos genes (ST15)	74
Figura 10 - Representação da distribuição das regiões codificadoras no genoma da cepa Kp137 em relação à função dos genes (ST307)	74
Figura 11 - Representação do alinhamento dos genomas das três cepas de <i>K. pneumoniae</i> isoladas de psitacídeos utilizando como referência de comparação o genoma da cepa GH 78578 (ATCC 700721)	75
Figura 12 - Representação linear do alinhamento do genoma das cepas Kp41 e Kp58 com genomas de isolados clínicos de <i>K. pneumoniae</i>	76
Figura 13 - Géis de PFGE após digestão com S1 nuclease. Mk = Lambda PFG Marker.....	77

Figura 14 - Representação do ambiente genético de CTX-M-15, CTX-M-8 e região de multirresistência em cepas de <i>K. pneumoniae</i> isoladas de psitacídeos.....	79
Figura 15 - Mapa circular da sequência de DNA completa de pKp41M.....	80
Figura 16 - Mapa genético linear do plasmídeo pKp41M I e comparação com pKp145-11b e Tn1331.....	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Perfil de virulência de <i>Klebsiella spp.</i> isoladas de psitacídeos em cativeiro.....	52
Tabela 2 - Perfil de suscetibilidade de <i>Klebsiella spp.</i> aos antimicrobianos	53
Tabela 3 - Características genômicas de <i>Klebsiella pneumoniae</i> ST147, ST15 e ST307.....	54
Tabela 4 - <i>Primers</i> , direção e tamanho dos produtos em 3 painéis multiplex utilizados para tipagem dos <i>replicons</i> plasmidiais.....	68
Tabela 5 - Características do genoma dos três isolados de <i>K. pneumoniae</i>	72
Tabela 6 - Características dos plasmídeos nas cepas doadoras e transconjugantes.....	78

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Classificação dos antimicrobianos β -lactâmicos e enzimas β -lactamases.....	28
Quadro 2 - <i>Primers</i> , genes, temperatura de anelamento, tamanho dos fragmentos e referências utilizadas para identificação dos fatores de virulência de <i>Klebsiella</i> spp.....	44
Quadro 3 - Identificação das amostras, origem dos isolados e animais coletadas.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg- Micrograma

µL- Microlitro

AFLP – Polimorfismo do Comprimento dos Fragmentos Amplificados

ailS – Ativador da regulação da alantoína

AMC – Amoxicilina com ácido clavulânico

AMI - Amicacina

AMP - Ampicilina

ATCC - *American Type Culture Collection*

BHI - *Brain Heart Infusion*

bla - Gene codificador de β-lactamases

bp ou pb - pares de bases

cc258 – Complexo clonal ST258

CETAS – Centro de triagem de animais silvestres

CFO – Cefoxitina

CIM - Concentração inibitória mínima

CLO - Cloranfenicol

CLSI - *Clinical and Laboratory Standard Institute*

cps – Operon cromossomal que inclui genes envolvidos na produção da cápsula

CTX – Cefotaxima

DNA - Ácido desoxirribonucleico

dNTP - desoxirribonucleotídeo trifosfatado

EGM – Elementos genéticos móveis

ENO - Enrofloxacino

ESBL - Beta-lactamase de espectro estendido

Fe³⁺ - Férrico

fimH – Adesina tipo 1

FMVZ USP – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

FyuA – Proteína de membrana externa

galF, *gnd* – Gene envolvido na biossíntese de lipopolissacarídeos

GEN – Gentamicina

HV – Hipervirulenta

IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

Inc - Incompatibilidade

IPM – Imipenem

IR - Sequências repetidas invertidas

iroN – sideróforo salmochelina

irp2 - Gene envolvido na síntese de yersiniabactina

IS – Sequências de inserção

iucD – Gene envolvido na síntese de aerobactina

K1 – Sorotipo capsular

K2 – Sorotipo capsular

kb - kilobases

kfu – Gene envolvido na captação de ferro

KPC – *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase

kpn - Adesão fimH-like

Lcn2- Proteína lipocalina-2

LPS – Lipopolissacarídeo

LVX – Levofloxacina

magA – Gene associado a mucoviscosidade

MALDI-TOF MS - *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry*

MDR – Resistência múltipla a antibióticos

mg - Miligrama

MgCl₂ - Cloreto de Magnésio

Mili-Q - Millipore Corporation

ml – Mililitro

MLST - *Multilocus SequenceType*

mm - Milímetro

mM - Milimolar

mrkD – Adesina tipo 3

NAL - Ácido nalidíxico

O – Antígeno da cápsula

PCR- Reação em cadeia pela polimerase (“*Polymerase Chain Reaction*”)

pMLST - *plasmid multilocus sequence typing*

pmol - Peso molar

PMQR - Plasmídeos carreadores de genes de resistência às quinolonas

qnr – Gene de resistência às quinolonas

rmpA – Gene regulador do fenótipo mucoide A

ST – *Sequence Type*

SUL - Sulfonamidas

SUT - Sulfametoxazol-trimetoprim

TET – Tetraciclina

TLR4 – Receptor do tipo Toll 4

TOB – Tobramicina

Tris- Tris-hidroximetilaminometano (2-amino-2-(hidroximetil) propano-1,3-diol)

U - Unidade

uge – Uridina difosfato galacturonato 4-epimerase

UPEC - *E. coli* uropatogênica UTI

UTI – Infecção do trato urinário (“Urinary tract infection”)

wabG – Codifica o gene Gal-A-transferase

wca, rcsAB – Síntese da cápsula

wza, wzc, wzi, wzb – Montagem da superfície da cápsula

wzy/orf4 – Polimerização de polissacarídeos capsulares

μM- Micromolar

LISTA DE SÍMBOLOS

+ Positivo ou presente

- Negativo ou ausente

β Beta

$\leq$ Menos que ou igual a

® Marca registrada

> Mais que

% Porcentagem

US\$ Dólar

™ *Trade mark*

V Volts

°C Graus Celsius

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	15
2.	REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1	PSITACÍDEOS SILVESTRES E O TRÁFICO.....	17
2.1.1	Microbiota intestinal de aves.....	18
2.2	<i>Klebsiella</i> spp.....	19
2.2.1	<i>Klebsiella</i> spp. em aves.....	20
2.2.2	Fatores de virulência.....	21
2.2.2.1	Adesinas.....	21
2.2.2.2	Cápsula.....	22
2.2.2.3	LPS (lipopolissacarídeo).....	24
2.2.2.4	Sideróforos.....	25
2.2.3	Resistência aos antimicrobianos.....	26
2.2.3.1	<i>Klebsiella</i> spp. produtoras de β -lactamase de espectro estendido.....	27
2.2.3.2	<i>Klebsiella</i> spp. resistente às quinolonas.....	32
2.2.3.3	<i>Klebsiella</i> spp. resistente a carbapenêmicos.....	33
2.2.3.4	Elementos genéticos móveis associados a resistência antimicrobiana.....	36
3	PERFIL DE VIRULÊNCIA E RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS DE <i>Klebsiella</i> spp. ISOLADAS DE PSITACÍDEOS COM DOENÇA RESPIRATÓRIA.....	38
3.1	INTRODUÇÃO.....	39
3.2	OBJETIVOS.....	41
3.2.1	Objetivos gerais.....	41
3.2.2	Objetivos específicos.....	41
3.3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	42
3.3.1	Animais e amostras.....	42

3.3.2	Identificação por MALDI-TOF MS.....	42
3.3.3	Determinação da resistência aos antimicrobianos.....	43
3.3.4	Determinação do perfil de virulência.....	44
3.3.5	Teste de alça para mucoviscosidade.....	45
3.3.6	Análise filogenética (SE-AFLP).....	45
3.4	RESULTADOS.....	47
3.5	DISCUSSÃO.....	56
3.6	CONCLUSÕES.....	62
4	CARACTERIZAÇÃO DE <i>Klebsiella pneumoniae</i> PRODUTORAS DE BETA-LACTAMASES DE ESPECTRO ESTENDIDO ISOLADAS DE PSITACÍDEOS COM DOENÇA RESPIRATÓRIA.....	63
4.1	INTRODUÇÃO.....	64
4.2	OBJETIVOS.....	65
4.2.1	Objetivos gerais.....	65
4.2.2	Objetivos específicos.....	65
4.3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	66
4.3.1	Amostras bacterianas.....	66
4.3.2	Caracterização dos plasmídeos.....	66
4.3.2.1	Conjugação.....	66
4.3.2.2	Análise do peso molecular dos plasmídeos através de S1-PFGE.....	67
4.3.2.3	PBRT - Tipagem dos replicons plasmídeos (<i>PCR based replicon types</i>).....	67
4.3.3	Determinação da concentração inibitória mínima (CIM).....	69
4.3.4	Sequenciamento de genoma completo.....	69
4.3.5	Montagem <i>de novo</i> e análises <i>in silico</i>	69
4.3.6	Determinação da sequência completa de plasmídeo IncM1.....	70
4.4	RESULTADOS.....	71

4.4.1	Análise dos genomas.....	71
4.4.2	Plasmídeos e ambiente genético de <i>bla</i> _{CTX-M}	77
4.4.3	Análise da sequência completa do plasmídeo pKp41M.....	79
4.5	DISCUSSÃO.....	82
4.6	CONCLUSÕES.....	87
5	CONCLUSÃO GERAL.....	88
	REFERÊNCIAS.....	89

1 INTRODUÇÃO GERAL

No Brasil, as aves são representadas a classe mais afetada pelo tráfico de animais selvagens. Dados obtidos pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) entre o período de 2010 a 2014, indicam que os Centros de Triagem de Animais Silvestres (Cetas) receberam, em média, 52.218 animais por ano, sendo a maioria, aves (79,3%) das ordens Passeriformes e Psittaciformes (IBGE, 2010). Estas aves são mantidas em centros de triagem até serem destinadas a soltura ou remanejadas para zoológicos e instituições conservacionistas, e neste processo, muitas vêm a óbito.

Uma das principais causas de óbito de aves são os processos infecciosos causados por enterobactérias (SANCHES, 2008; GODOY; MATUSHIMA, 2010). As enterobactérias isoladas com maior frequência em psitacídeos, consideradas agentes zoonóticos, incluem *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *E. coli*, *Serratia* spp., *Citrobacter freundii*, *Salmonella* spp. e *Yersinia* spp. (DORRESTEIN et al., 1985; SAIDENBERG et al., 2012). Já foi relatada a presença de *Klebsiella* spp. em amostras de fezes de psitacídeos clinicamente saudáveis, mas vale ressaltar que este gênero bacteriano é também um dos mais importantes patógenos oportunistas, particularmente entre aves imunossuprimidas e estressadas (EL FERTAS-AISSANI et al., 2013).

É provável que a manutenção de aves em cativeiro possa modificar a microbiota intestinal e de trato respiratório, favorecendo a colonização por bactérias Gram negativas (MATTES et al., 2005). As infecções sistêmicas são mais comuns em aves, porém infecções locais envolvendo trato respiratório superior podem ocorrer, especialmente em psitacídeos (GERLACH, 1994).

A patogenicidade do agente é atribuída a diversos fatores de virulência que lhe permitem transpassar a imunidade inata do hospedeiro. Dentre os mecanismos de virulência destacam-se a presença de cápsula, exopolissacarídeos, lipopolissacarídeos, adesinas e sistemas de aquisição de ferro. Embora a resistência antimicrobiana não seja conceitualmente um fator de virulência, a resistência múltipla a antibióticos (MDR) pode ser considerada um agravante nas infecções por *Klebsiella* spp. (EL FERTAS-AISSANI et al., 2013).

Sob o ponto de vista de saúde pública, *Klebsiella* spp é considerada um importante patógeno Gram-negativo associado às infecções nosocomiais em humanos, sendo responsável por infecções de trato urinário, pneumonias, peritonites e sepse (PATERSON, 2006). A emergência de estirpes de *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemases (KPC) tem provocado diversos surtos de infecções hospitalares humanas com elevada taxa de mortalidade (LIAO et al., 2017). No entanto, a existência de estirpes com fenótipo MDR, β -lactamases de espectro estendido (ESBL) ou KPC é subestimada em animais, principalmente nas espécies aviárias.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PSITACÍDEOS SILVESTRES E O TRÁFICO

A forma do bico e dos pés permite a identificação rápida de um representante da ordem Psitaciformes. A família psittacidae é encontrada em todas as regiões tropicais do planeta, com algumas espécies chegando a ocorrer até mesmo em regiões temperadas. Os representantes desta ordem alimentam-se de brotos, folhas, frutos e sementes, e algumas espécies podem incluir alimentos de origem animal na sua dieta. Os psitacídeos nidificam em cavidades, e os filhotes são nidícolas (GERLACH, 1994). O Brasil é considerado o país com maior diversidade de psitacídeos do mundo, das 389 espécies reconhecidas mundialmente, 87 estão presentes no território brasileiro. Destas espécies, 25 estão criticamente ameaçados, sob ameaça de extinção ou vulneráveis (BIRDLIFE INTERNATIONAL, 2017).

Por possuírem uma plumagem colorida e por terem a capacidade de imitar sons, os representantes desta ordem são muito procurados como aves de estimação. A manutenção e a criação de psitacídeos em cativeiro continua em expansão e, devido a destruição e fragmentação do *habitat* desta espécie no mundo todo, a reprodução em cativeiro tornou-se uma ferramenta de extrema importância para assegurar a sobrevivência destas aves, além de promover a qualidade de vida das espécies cativas (LIGHTFOOT; NACEWICZ, 2009).

O tráfico de animais silvestres é causa importante de redução da biodiversidade no Brasil, contribuindo com retirada anual de cerca de 38 milhões de espécimes da natureza. O índice de mortalidade de tais espécimes capturados chega a 90% devido às más condições de captura e transporte; estima-se que esta atividade ilegal movimente aproximadamente US\$ 10 bilhões/ano em todo o mundo (PAGANO et al., 2010).

No Brasil, as aves são as mais acometidas pelo tráfico de animais silvestres. Dados obtidos pelo IBAMA entre o período de 2010 a 2014, indicam que os Centros de Triagem de Animais Silvestres receberam, em média, 52.218 por ano, sendo a

maioria, aves (79,3%) destacando-se as ordens Passeriformes, Columbiformes e Psittaciformes (PAGANO et al., 2010; IBAMA, 2016).

2.1.1 Microbiota intestinal de aves

Acredita-se que 99% da microbiota seja composta por bactérias facultativas, ou seja, aeróbicas e anaeróbicas, e produtoras de ácido láctico. O restante (1%) é constituído de bactérias consideradas nocivas ao hospedeiro (GERLACH, 1994). A maioria dos autores considera que a microbiota normal de aves é predominantemente Gram-positiva, incluindo *Bacillus* spp., *Corynebacterium* spp., *Streptococcus* spp. e *Staphylococcus* spp. Os microrganismos Gram-negativos mais frequentemente identificados são *Enterobacter* spp., *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Citrobacter* sp. e *Aeromonas* spp. (RUPLEY, 1999).

Glünder (1981) examinou as fezes de 98 passeriformes granívoros sem sinais clínicos de doenças, para bactérias da família *Enterobacteriaceae* e não houve isolamento de nenhum agente em 82,6% das aves, sugerindo que as enterobactérias não são parte da microbiota intestinal dessas aves (SAIDENBERG et al., 2012, 2017). Porém, estudos com isolamento de *E. coli* de diferentes sítios (cloaca, orofaringe e fezes), envolvendo diversas espécies de aves, sejam elas de vida livre ou cativeiro, sintomáticas ou assintomáticas, resultaram na identificação de diferentes enterobactérias presentes no sistema digestório (MATTES et al., 2005; XENOULIS et al., 2010; DAVIES et al., 2016), sugerindo que, mantidos em cativeiro com manejo sanitário adequado (MATTES et al., 2005), os mesmos poderiam atuar como portadores assintomáticos (LOIKO et al., 2007; SANCHES et al., 2017).

Em aves assintomáticas, bactérias Gram-negativas não devem ser entendidas como patógenos alarmantes, mas sim um indício de necessidade de melhorias de manejo sanitário, para assim minimizar o risco de desenvolvimento de doenças, mesmo se a bactéria possa simplesmente atuar como um patógeno oportunista no futuro (MATTES et al., 2005).

2.2 *Klebsiella* spp.

As enterobactérias são microrganismos Gram negativos, aeróbicos, em forma de bastonetes, e apresentam pleomorfismo. Podem ser móveis por possuírem flagelos, ou imóveis, com ou sem cápsula e fermentadores de açúcares (CARTER; WISE, 2004). No ágar MacConkey, produz colônias brilhantes, com aspecto elevado e de consistência mucóide. As colônias formadas são grandes devido à cápsula mucóide polissacarídica (Antígeno K) que protege contra a fagocitose por granulócitos, contra a ação de fatores bactericidas do soro e ainda tem função de auxiliar na aderência (CHUNG, 1999). Normalmente são contaminantes ambientais que ocasionalmente estão associados infecções oportunistas (GERLACH, 1994).

Klebsiella spp. foi primeiramente isolada no final do século 19 e era conhecida como bactéria de Friedlander. Possui todas as características de uma enterobactéria, e rapidamente coloniza superfícies mucosas de humanos, incluindo trato gastrointestinal e orofaringe (FRIEDLANDER, 1882). Destes sítios, podem migrar para outros tecidos e causar infecções graves em humanos. É um patógeno extremamente resiliente e seu mecanismo de ataque é a sobrevivência no hospedeiro, ao invés de agir ativamente no organismo (PACZOSA; MECSAS, 2016).

Estudos de biologia molecular permitiram a identificação de novas espécies e a reclassificação das já existentes, alterando a taxonomia deste gênero. O gênero *Klebsiella* foi definido por sequenciamento do ácido desoxirribonucléico (DNA) e permitiu a identificação de cinco espécies: *K. oxytoca*; *K. planticola*; *K. terrigena*, *K. mobilis* e *K. pneumoniae*. Esta última é subclassificada em três subespécies: *Klebsiella pneumoniae* subespécie *pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* subespécie *ozaenae* e *Klebsiella pneumoniae* subespécie *rhinoscleromatis*. Entre as três subespécies de *Klebsiella*, *K. pneumoniae* é a mais frequentemente isolada em casos clínicos e no meio ambiente (PODSCHUN; ULLMANN, 1998; MARTÍNEZ et al., 2004).

Recentemente ganhou notoriedade como agente infeccioso devido ao aumento do número de infecções graves e escassez de tratamentos eficazes para o agente. Essas circunstâncias preocupantes surgiram devido à emergência de estirpes de *Klebsiella pneumoniae* que adquiriram características genéticas

adicionais, e se tornaram tanto hipervirulentas quanto resistentes a antibióticos (AHER; ROY; KUMAR, 2012; SHON; BAJWA; RUSSO, 2013; LI et al., 2014).

2.2.1 *Klebsiella* spp. em aves

O isolamento de enterobactérias do trato respiratório e reprodutivo é anormal, este grupo de bactérias pode colonizar a maioria dos tecidos de aves, e é frequentemente considerado um patógeno secundário, ou seja, apenas causará infecções em situações adversas, como imunossupressão ou tratamento prévio com uso de antibióticos (GERLACH, 1994). Mas, em alguns casos podem atuar como patógenos primários, uma vez que existem diferenças substanciais na virulência das enterobactérias e na resposta imune do hospedeiro (RENNIE et al., 1990; GERLACH, 1994; FANG; SANDLER; LIBBY, 2005; KIM et al., 2005; HÖGENAUER et al., 2006; GUERRA et al., 2016).

A patogenicidade da *Klebsiella* spp. pode ser atribuída à produção de enterotoxina estável ao calor; à habilidade de metabolizar a lactose; à presença de cápsula ou lipopolissacarídeo; à presença de adesinas com ou sem fímbrias que favorece sua adesão às mucosas, às células epiteliais do trato urogenital, respiratório e intestinal para produzir o processo infeccioso e proteger a bactéria dos fatores bactericidas do soro, acompanhado pela inibição da ativação dos componentes do complemento (FABÍOLA; SANTOS, 2007).

K. pneumoniae e *K. oxytoca* são frequentemente isolados de aves, sua cápsula mucoide oferece proteção contra variações do meio ambiente, e vários desinfetantes. São sensíveis ao calor e a secagem. Informações específicas quanto à transmissão, patogênese e período de incubação do agente não estão disponíveis na medicina aviária (GERLACH, 1994). Sabe-se que sua cápsula age como uma barreira de proteção contra a imunidade celular da ave hospedeira, no entanto esta cápsula é altamente antigênica e estimula a resposta imune humoral protetora (ARAKAWA et al., 1991; SHON; BAJWA; RUSSO, 2013).

Klebsiella spp. pode causar infecções sistêmica em aves, mas infecções locais envolvendo trato respiratório superior, pele, e cavidade oral também podem ocorrer, especialmente em psitacídeos (GERLACH, 1994).

2.2.2 Fatores de virulência

Existem quatro grandes classes de fatores de virulência que são bem caracterizados nas *Klebsiellas*, e consistem em cápsula, incluindo a produção de hipercápsula nas estirpes hipervirulentas (HV), lipopolissacarídeo (LPS), sideróforos e fimbrias (BROBERG; PALACIOS; MILLER, 2014).

2.2.2.1 Adesinas

Os fatores de colonização chamados de adesinas são moléculas de natureza proteica que cobrem a superfície bacteriana e são capazes de reconhecer receptores nas células eucarióticas. Quando foram observadas pela primeira vez em microscopia eletrônica, as adesinas foram chamadas de “fios”, “filamentos” e “fibras”, sendo mais tarde denominadas de fimbrias (do latim: linhas, fibras; ou no coletivo: franja) e também pili (do latim: pelos, cabelos) (KLEMM, 1994). As fimbrias fazem parte dos fatores de virulência de *K. pneumoniae* e são importantes mediadores de adesão da bactéria, sendo as do tipo 1 e 3 as principais estruturas de adesão que contribuem para sua patogenicidade (EL FERTAS-AISSANI et al., 2013; BROBERG; PALACIOS; MILLER, 2014; PACZOSA; MECSAS, 2016)

Para estabelecer a infecção, *Klebsiella* deve primeiro colonizar o hospedeiro, mediante a hipótese de que as fimbrias, particularmente o tipo 1 e o tipo 3, ajudem nas infecções urinárias e possivelmente nas vias respiratórias superiores, permitindo a ligação da bactéria à superfície de dispositivos residenciais e células hospedeiras, evitando sua depuração (XENOULIS et al., 2010; BROBERG; PALACIOS; MILLER, 2014).

As fimbrias do tipo 1 são protusões finas, em forma de rosca presente na superfície celular da bactéria, são expressas em 90% dos isolados clínicos e ambientais de *K. pneumoniae*, bem como quase todos os membros das *Enterobacteriaceae*. O gene *fimA* codifica a maior parte da estrutura da fimbria tipo 1, enquanto a propriedade adesiva é codificada por *fimH*. Esta fimbria possui um papel importante nas infecções do trato urinário (UTI) e respiratório causadas por *K. pneumoniae*, e está envolvida na formação de biofilme. A aderência da bactéria nas células do trato respiratório leva ao comprometimento da resistência de colonização nas vias aéreas superiores, com uma subsequente proliferação de bactérias patogênicas facultativas, resultando no desenvolvimento de pneumonia (PODSCHUN; ULLMANN, 1998; EL FERTAS-AISSANI et al., 2013).

As fimbrias do tipo 3 são compostas por filamentos helicoidais, e em *K. pneumoniae* são codificadas pelo grupo de genes *mrkABCD*, sendo a adesina codificada por *mrkD* (PACZOSA; MECSAS, 2016). Esta fimbria é encontrada e expressa por quase todos os isolados de *K. pneumoniae*, e permite a adesão da bactéria a vários tecidos humanos (rins, pulmões e vesícula urinária), além de ser um potente promotor de formação de biofilme (EL FERTAS-AISSANI et al., 2013).

No entanto, o principal papel clinicamente significativo das fimbrias parece ser a formação de biofilme e sua ligação em superfícies abióticas, e dessa forma predispõe infecções associadas a biofilme, principalmente em pacientes imunocomprometidos, cateterizados ou em ventilação assistida (PODSCHUN; ULLMANN, 1998; PACZOSA; MECSAS, 2016).

2.2.2.2 Cápsula

A cápsula, uma matriz de polissacarídeo que envolve a célula, é necessária para a virulência de *K. pneumoniae* e, sem dúvida, é o fator de virulência mais bem estudado desta bactéria (PODSCHUN; ULLMANN, 1998). As estirpes de *K. pneumoniae* que não possuem cápsula, são menos virulentas do que as estirpes encapsuladas. Além disso, as estirpes de *K. pneumoniae* hipervirulentas (HV) produzem uma hipercápsula, que consiste em um revestimento bacteriano de

exopolissacarídeos mucoviscosos, mais robusto do que a cápsula típica. Esta hipercápsula pode contribuir significativamente para a patogenicidade de HV *K. pneumoniae* (SHON; BAJWA; RUSSO, 2013; PACZOSA; MECSAS, 2016).

Tanto a cápsula clássica como a hipercápsula de HV são constituídas por polissacarídeos capsulares específicos de estirpe, denominados antígenos K (K1 a K78). Os genes necessários para produção da cápsula estão localizados em um operon cromossomal, chamado *cluster* (grupo) *cps*, onde estão incluídos diversos genes envolvidos na produção da cápsula, incluindo *wzi*, *wza*, *wzb*, *wzc*, *gnd*, *wca*, *cpsB*, *cpsG*, *galF*, e a tipagem do antígeno K é frequentemente realizada pelo sequenciamento do *locus wzi* (BRISSE et al., 2013; LI et al., 2014).

O gene *wzy*, também conhecido como *orf4*, está envolvido na polimerização de polissacarídeos capsulares, enquanto *wza*, *wzc*, *orf5* e *orf6* estão envolvidos na sua montagem de superfície. Outros genes, particularmente aqueles no *cluster* de genes *cps*, estão envolvidos na produção do polímero de cápsula, como *cpsB* e *cpsG* (ARAKAWA et al., 1991). Em relação a *K. pneumoniae* HV, a produção de cápsulas pode ser aprimorada por meio da expressão de dois reguladores transcricionais transmitidos por plasmídeos, o regulador do fenótipo mucóide A (*rmpA*) e *rmpA2*; a expressão da cópia cromossomal de *rmpA*; e a regulação dos genes A e B da síntese de cápsula (*rcaA* e *rcaB*) (PACZOSA; MECSAS, 2016).

Estima-se que 55% a 100% das estirpes de *K. pneumoniae* HV expressam pelo menos uma cópia de *rmpA* ou *rmpA2*, comparadas a 7% a 20% das estirpes que não são hipervirulentas. A produção de hipercápsula pode acontecer mesmo na ausência destes genes, por meio do gene cromossomal A associado à mucoviscosidade (*magA*), específico de estirpes K1, uma polimerase *wzy*-K1 necessária para produção da cápsula (FANG; SANDLER; LIBBY, 2005; YEH et al., 2007).

Os sorotipos mais isolados de pacientes são K1 e K2 e geralmente são estirpes mais virulentas do que as de outros sorotipos. Estirpes K2 são as mais prevalentes em *K. pneumoniae* de isolados de amostras clínicas, seguido de estirpes K1. No geral, o fenótipo da hipercápsula aumenta a resistência a uma variedade de defesas humorais, incluindo sistema complemento, peptídeos

antimicrobianos, e aumento da resistência a fagocitose por neutrófilos e macrófagos (PACZOSA; MECSAS, 2016).

2.2.2.3 LPS (lipopolissacarídeo)

O LPS, também conhecido como endotoxina, é um componente importante e necessário da porção externa da membrana celular de todas as bactérias Gram-negativas. Embora exista uma variação considerável nas estruturas LPS entre as espécies bacterianas, é tipicamente constituído por um antígeno O, um oligossacarídeo central e o lipídeo A. Esses componentes são codificados por genes dos grupos *wb*, *waa* e *lpx*, respectivamente (MAJUMDAR et al., 2015).

Ao contrário dos 77 antígenos diferentes que foram documentados para a cápsula de *K. pneumoniae*, apenas 9 diferentes tipos de antígenos de O foram identificados em isolados de *K. pneumoniae*, sendo O1 o mais comum (HANSEN et al., 1999). O LPS é um importante fator de virulência de *K. pneumoniae* que protege contra defesas humorais, mas também pode ser um forte ativador imunológico. A porção lipídica do LPS bacteriano, o lipídeo A, é um potente ligante do receptor do tipo Toll 4 (TLR4). A estimulação de TLR4 leva à produção de citocinas e quimiocinas que ajudam a recrutar e a ativar respostas celulares, incluindo neutrófilos e macrófagos, que eliminam a infecção e controlam a proliferação da bactéria em outros tecidos (PODSCHUN; ULLMANN, 1998; PACZOSA; MECSAS, 2016).

A falta de antígeno O, ou seja, de LPS pode tornar a *K. pneumoniae* sensível à eliminação mediada pelo sistema complemento na corrente sanguínea, tornando a estirpe menos virulenta (ALBERTI et al., 1993). Corroborando com este papel de virulência do LPS, é relatado que os genes *uge*, que codifica uma uridina difosfato galacturonato 4-epimerase, e *wabG*, que codifica um gene Gal-A-transferase, estão envolvidos na produção adequada de LPS (PACZOSA; MECSAS, 2016). O gene *uge* está presente na maioria dos isolados de *K. pneumoniae*, tanto em estirpes causadores de doenças, quanto em comensais, e na ausência deste gene, o LPS de

K. pneumoniae se torna menos capaz de causar UTI, pneumonia e sepse (REGUÉ et al., 2004; AHER; ROY; KUMAR, 2012).

2.2.2.4 Sideróforos

A habilidade dos patógenos de se multiplicar nos tecidos do hospedeiro é afetada pela disponibilidade de ferro, essencial para o crescimento bacteriano (SUSSMAN, 1997). Em resposta à deficiência de ferro, que é escasso em sua forma livre no organismo dos animais, muitas bactérias sintetizam e secretam sideróforos, pequenas moléculas com alta afinidade por ferro. Embora exista um grande número de diferentes sideróforos, todos eles pertencem a algumas classes estruturais, incluindo catecolato, carboxilato, hidroxamato e sideróforos ligantes mistos (ADLER et al., 2012).

Os sideróforos são quelantes férricos extracelulares de alta afinidade, que são segregados por células bacterianas para remover Fe^{3+} de proteínas de ligação de ferro do hospedeiro; Eles têm um papel crítico na virulência bacteriana (PODSCHUN; ULLMANN, 1998). *Klebsiella* é um agente patogênico extracelular e, portanto, não tem acesso imediato ao ferro no organismo e para superar a restrição de ferro *in vivo*, produz sideróforos (EL FERTAS-AISSANI et al., 2013).

Vários sideróforos são expressos em *K. pneumoniae*, incluindo enterobactina, yersiniabactina, salmochelina e aerobactina. A produção de yersiniabactina diz respeito principalmente aos isolados do sangue (81,8%) e do pulmão (75%), comparados aos da urina (30,8%) e das feridas supurantes (36,4%). Esses achados são consistentes com o papel da yersiniabactina na sepse e infecções pulmonares (JOHNSON; STELL, 2000; EL FERTAS-AISSANI et al., 2013). No trato respiratório, a proteína lipocalina-2 (Lcn2) segregada pela mucosa é capaz de seqüestrar a enterobactina e torná-la ineficaz, no entanto, isso não ocorre com a yersiniabactina, que permite a evasão de Lcn2, levando a infecções do trato respiratório (PACZOSA; MECSAS, 2016).

Além disso, a yersiniabactina promove a formação de biofilmes sob condições de esgotamento de ferro através da ativação da proteína da membrana

externa *FyuA*. Paauw et al. (2009) também relataram que a yersiniabactina e a aerobactina causam uma redução indireta da capacidade de morte de células imunes inatas, bloqueando a produção de espécies de oxigênio reativo.

Salmochelina é uma forma c-glicosilada de enterobactina. Esta modificação é realizada por genes encontrados no cromossomo ou no plasmídeo dentro do grupo de genes *iroA*, *iroBCDE*. O transporte da forma carregada de ferro é mediado por *iroN*. Esta modificação evita a ligação do salmochelina pela lipocalina-2, impedindo sua neutralização, tornando mais eficiente a colonização de *K. pneumoniae*, principalmente em nasofaringe. Mesmo com a presença de lipocalina-2, é possível a colonização e infecção de tecidos, indicando que as estirpes produtoras de salmochelina são mais virulentas do que as não produtoras. Este sideróforo é prevalente em estirpes de *K. pneumoniae* HV (PACZOSA; MECSAS, 2016).

2.2.3 Resistência aos antimicrobianos

Como resultado da exposição de bactérias a agentes antimicrobianos, houve uma seleção e aquisição de um grande número genes de resistência. Portanto, a ocorrência de resistência antimicrobiana emergente se dá a exposição repetida da bactéria a antibióticos, e acesso deste patógeno a genes de resistência no ambiente (SCHWARZ; CHASLUS-DANCLA, 2001). A aquisição de resistência antimicrobiana representa uma propriedade específica da estirpe bacteriana, baseada em mutações cromossômicas, que age como alvo para antimicrobianos. Tais mutações ocorrem devido a pequenas mudanças na sequência de aminoácidos do produto genético correspondente, mas os torna insensíveis às atividades inibitórias dos respectivos agentes antimicrobianos (PATERSON, 2006).

A resistência adquirida a antimicrobianos está mais comumente associada à aquisição de elementos genéticos móveis, que possuem um ou mais genes de resistência. Existem três grandes mecanismos na qual a bactéria se torna resistente aos antimicrobianos: inativação enzimática, redução do acúmulo intracelular de

antimicrobianos, e proteção, alteração ou substituição dos sítios alvo das células (SCHWARZ; CHASLUS-DANCLA, 2001).

Mudanças na distribuição de diferentes plasmídeos existentes nas estirpes de *K. pneumoniae* contribuiriam para as diferenças observadas nas prevalências de resistências a antibióticos em diferentes partes do mundo (O'BRIEN, 2002). Dois tipos principais de resistência a antibióticos foram observados em *Klebsiella* spp., a expressão de β -lactamases de espectro estendido (ESBLs), que tornam as bactérias resistentes a cefalosporinas e monobactâmicos, e a expressão de carbapenemases, que torna as bactérias resistentes a quase todos os β -lactâmicos disponíveis, incluindo os carbapenêmicos. Devido à falta de tratamentos eficazes disponíveis, infecções *K. pneumoniae* causadas por bactérias produtoras de ESBL e resistentes aos carbapenêmicos possuem maiores taxas de mortalidade e morbidade quando comparadas às bactérias não resistentes (PACZOSA; MECSAS, 2016).

Estirpes de *Klebsiella* produtoras de ESBL causaram 23% das infecções nosocomiais que resultaram em 1.100 mortes. Estirpes resistentes a carbapenêmicos causaram 11% das infecções nosocomiais, que resultaram em 520 mortes em hospitais dos Estados Unidos em 2011. *K. pneumoniae* capazes de causar infecções graves com alto grau de invasividade em indivíduos saudáveis e imunocomprometidos são consideradas HV (hipervirulenta) na comparação com estirpes de *K. pneumoniae* clássicas (PACZOSA; MECSAS, 2016).

2.2.3.1 *Klebsiella* spp. produtoras de β -lactamases de espectro estendido (ESBLs)

As ESBLs são enzimas capazes de hidrolisar penicilinas, cefalosporinas de primeira, segunda, terceira e quarta geração, e aztreonam, e podem ser inibidas por ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam (EL SALABI; WALSH; COUCHANI, 2013). A resistência bacteriana aos β -lactâmicos está relacionada à síntese da parede celular ou à degradação da droga. Os mecanismos de resistência aos β -lactâmicos envolvem a alteração da permeabilidade da membrana externa bacteriana e a inativação ou destruição da droga pela hidrólise do anel β -lactâmico (SHLAES et al., 1997; RICE, 2001; SOUSA JR; FERREIRA; CONCEIÇÃO, 2004).

As principais enzimas representativas pertencem às famílias TEM, SHV e CTX-M e, geralmente, são codificadas por genes localizados em grandes plasmídeos (EL SALABI; WALSH; COUCHANI, 2013). Estas têm sido isoladas com mais frequência de estirpes de *E. coli* e *K. pneumoniae* mas já foram encontradas entre outros gêneros como *Citrobacter* spp., *Serratia* spp., *Salmonella* spp. e na espécie *P. aeruginosa* (SOUSA, 2006). O Quadro 1 mostra a classificação dos antimicrobianos β -lactâmicos e das enzimas β -lactamases.

As ESBLs das famílias TEM e SHV são derivadas das enzimas TEM-1 e TEM-2, e SHV-1, respectivamente. Essas enzimas se originaram a partir de mutações de ponto na região do sítio ativo, como resposta a pressão seletiva exercida pelo uso de cefalosporinas de espectro estendido (PATERSON; BONOMO, 2005). E a enzima TEM-3, se diferenciava de sua precursora, TEM-2, por duas substituições de aminoácidos (BRADFORD, 2001). Entre as bactérias Gram-negativas a TEM-1, que confere resistência às penicilinas e as cefalosporinas de primeira geração, é a β -lactamase mais frequentemente encontrada, sendo mais de 90% das resistências. Apesar da maior frequência de β -lactamases TEM se verificar em estirpes de *E. coli* e *K. pneumoniae*, também são encontradas, cada vez com maior frequência, em outras espécies de bactérias Gram-negativas (SOUSA JR; FERREIRA; CONCEIÇÃO, 2004; PATERSON; BONOMO, 2005).

Quadro 1 – Classificação dos antimicrobianos β -lactâmicos e enzimas β -lactamases.

Classe Molecular	Grupo funcional	Substrato	Atividade ESBL	Sensibilidade ao ácido clavulânico	Enzimas representativas	
					Comuns	Raras
C	1	Cefalosporinas	Não	Não	AmpC ACT-1	FOX-1
	1e ESBL	Cefalosporinas	Sim	Não	CMY-37 GC1	
A	2 ^a	Penicilinas	Não	Sim	PC1	
	2b	Penicilinas e primeiras cefalosporinas	Não	Sim	TEM-1 SHV-1	

	2be ESBL	Cefalosporinas de espectro estendido e monobactâmicos	Sim	Sim	CTX-M-14 CTX-M-15	
	2br	Penicilinas	Não	Não	TEM-30 SHV-10	
	2ber ESBL	Cefalosporinas de amplo espectro e monobactâmicos	Sim	Variável	TEM-50 TEM-121	
	2c	Carbenicilina	Não	Sim	PSE-4 CARB-3	
	2ce	Carbenicilina/Cefepime	Não	Sim	RTG-4	
	2e ESBL	Cefalosporinas de espectro estendido	Sim	Sim	SFO-1 FEC-1 L2	
	2f	Cefalosporinas de espectro estendido	Sim	Sim	KPC-2 SME-1	
B	3 ^a	Carbapenêmicos	Sim	Não	VIM NDM L1	IMP
	3b	Carbapenêmicos	Não	Não	CphA	
D	2d	Cloxacilina	Não	Não	OXA-1 OXA-10	
	2de	Cefalosporinas de espectro estendido	Variável	Variável	OXA-11 OXA-15	
	2df	Carbapenêmicos	Sim	Variável	OXA-23 OXA-48	

Fonte: Adaptado de (BUSH, 2010, 2013a).

As ESBLs do tipo SHV são frequentemente isoladas de estirpes de *K. pneumoniae* sendo responsável, nestas espécies, por mais de 20% das resistências à ampicilina. Em várias estirpes de *K. pneumoniae*, o gene *blaSHV-1*, encontra-se integrado no cromossoma bacteriano (BRADFORD, 2001; PATERSON; BONOMO, 2005). De acordo com Guzmán-Blanco et al (2014), SHV-5 e SHV-12 foram prevalentes em um estudo feito com isolados clínicos de humanos na América Latina, sendo encontradas, principalmente no México, Colômbia, Venezuela e Brasil.

As ESBLs do tipo OXA conferem resistência a ampicilina e cefalotina, e são caracterizadas pela sua alta atividade hidrolítica contra oxacilina e cloxacilina, e pelo fato de serem fracamente inibidas pelo ácido clavulânico. Enquanto a maioria das ESBLs são encontradas em *E. coli*, *K. pneumoniae*, e outras *Enterobacteriaceae*, as do tipo OXA são encontradas principalmente em *P. aeruginosa*. A maior parte dos novos membros desta família foram isolados em bactérias na Turquia (BRADFORD, 2001).

As β -lactamases do tipo AmpC são enzimas capazes de hidrolisar penicilinas cefalosporinas de até terceira-geração, cefamicinas (como cefoxitina) e monobactâmicos, mas não são inibidas por ácido clavulânico ou tazobactam. A hidrólise de cefalosporinas de quarta-geração e de carbapenêmicos também pode ser observada, mas em níveis baixos, em caso de superprodução da enzima (JACOBY; JACOBY, 2009; BUSH, 2010). São amplamente distribuídas entre diversos gêneros bacterianos e podem ser mediadas por cromossomo ou plasmídeos, sendo este último dividido em grupos nomeados de acordo com o agente proveniente. A enzima CMY-2, proveniente de *Citrobacter freundii*, é a AmpC mediada por plasmídeo mais prevalente em todo o mundo (JACOBY; JACOBY, 2009).

A enzima GES-5 é uma carbapenemase, geralmente mediada por plasmídeos, com capacidade de hidrolisar penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e aztreonam (EL SALABI; WALSH; COUCHANI, 2013). É descrita em isolados clínicos e ambientais de *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *K. pneumoniae* e outras enterobactérias, em diversas regiões do mundo (ZHANG; LÜ; ZONG, 2012; WHITE et al., 2016; BONNIN et al., 2017).

Uma nova família de ESBLs mediada por plasmídeos, chamada CTX-M, foi descrita no final da década de 90 em estirpes de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium e *E. coli*. Atualmente estas enzimas são encontradas em diversas espécies de *Enterobacteriaceae* (ROCHA; PINTO; BARBOSA, 2016). Essas enzimas apresentam somente 40% de similaridade com as β -lactamases TEM e SHV, e hidrolisam preferencialmente cefotaxima (PATERSON; BONOMO, 2005). Previamente, as cefalosporinases de classe A cromossômicas eram as enzimas mais relacionadas com esta família (73 a 77% de homologia), e encontravam-se

entre estirpes de *K. oxytoca*, *C. diversus*, *Proteus vulgaris* e *Serratia fonticola* (BRADFORD, 2001). No entanto, segundo estudos realizados, existe um alto grau de homologia entre a enzima cromossômica AmpC de *Kluyvera ascorbata* (klu-1 e klu-2) e as enzimas CTX-M, sugerindo que a última deva ter surgido desta espécie (BONNET, 2004).

As variantes da família CTX-M são divididas em cinco grupos: CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 e CTX-M-25. As divisões são baseadas em similaridades das sequências de aminoácidos, onde enzimas pertencentes ao mesmo grupo compartilham >94% de identidade e enzimas pertencentes a grupos diferentes podem compartilhar ≤90% de identidade (BONNET, 2004).

As variantes de CTX-M estão mundialmente disseminadas, e ultrapassa barreiras de ambientes hospitalares, atingindo comunidades, animais de companhia, animais de produção e animais silvestres (HIROI et al., 2012; EWERS et al., 2014; ROCHA et al., 2014; HARADA et al., 2016). Em todo mundo, dentre as variantes de CTX-M, CTX-M-15 e CTX-M-14 são as mais importantes, e isoladas com maior frequência de humanos, animais e meio ambiente (CANTÓN et al., 2008; CANTÓN; GONZÁLEZ-ALBA; GALÁN, 2012; EWERS et al., 2014). Existem relatos de genes *bla*CTX-M-1, *bla*CTX-M-15 e *bla*CTX-M-32 em isolados fecais de aves de rapina e gaivotas, provenientes de centros de triagem na Bélgica (ROUFFAER; HAESBROUCK; MARTEL, 2014).

Essa disseminação global de enzimas CTX-M foi atribuída à presença de elementos móveis nas estirpes produtoras de ESBL, que facilitam a aquisição e mobilização dos genes *bla*ESBL. A maioria desses mecanismos estão relacionados a sequências de inserção, transposons e integrons de classe 1, além de elementos conjugativos, como plasmídeos e ICEs, que possibilitam sua transferência para outras cepas. Os genes codificadores de resistência podem estar localizados no DNA cromossômico ou plasmidial das bactérias Gram-negativas, e isto está diretamente relacionado ao seu potencial de disseminação entre os isolados. Uma vez localizados em elementos móveis como bacteriófagos, plasmídios conjugativos e mobilizáveis, transposons ou integrons, esses genes podem ser transferidos até para estirpes de gêneros e reinos diferentes (CANTÓN; GONZÁLEZ-ALBA; GALÁN, 2012).

A associação dessas plataformas com genótipos de *E. coli* demonstram a disseminação clonal, e frequente co-existência de *bla*CTX-M com outros genes que conferem resistência a outras classes de antibióticos como fluorquinolonas e aminoglicosídeos, levando a altas taxas de co-seleção (CANTÓN; GONZÁLEZ-ALBA; GALÁN, 2012; CUNHA et al., 2017).

No Brasil, os micro-organismos mais comumente associados com a presença do gene *bla*CTX-M foram *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*, isolados da comunidade, ambientes hospitalares e meio ambiente. As variantes mais detectadas foram CTX-M-2 e CTX-M-15, principalmente na região sudeste do país (ROCHA; PINTO; BARBOSA, 2016).

2.2.3.2 *Klebsiella* spp. resistente às quinolonas

Fluoroquinolonas são potentes antimicrobianos usados para o tratamento de uma variedade de infecções da comunidade, além de infecções nosocomiais. No entanto, a resistência de *Enterobacteriaceae* a estas drogas é cada vez mais relatada (DRAGO et al., 2010).

A aquisição de resistência a quinolonas se dá a mutações cromossomais nos genes que codificam as proteínas alvo, ou mutações causando a redução do acúmulo de drogas, seja pela diminuição da captação ou aumento do efluxo, e genes localizados em plasmídeos associados à resistência a quinolonas (ACAR; GOLDSTEIN, 1997; SCHWARZ; CHASLUS-DANCLA, 2001; GARBATI; GODHAIR, 2013). Os mecanismos de resistência mediados por plasmídeos conferem níveis baixos de resistência, mas promovem um cenário favorável onde a seleção de mecanismos adicionais de resistência a quinolonas codificados cromossomicamente podem ocorrer (CARATTOLI; CARATTOLI, 2009; FÀBREGA et al., 2009).

O gene de resistência a quinolonas mediado por plasmídeos foi descrito em 1998, isolado de uma *Klebsiella pneumoniae* urinária multi-resistente, que poderia transferir resistência de baixo nível a ácido nalidíxico, ciprofloxacina e outras quinolonas para uma variedade de agentes Gram-negativos. O gene responsável foi

chamado de *qnr*, e depois alterado para *qnrA* conforme o descobrimento de alelos (ROCHA et al., 2014).

Diferentes genes de resistência a quinolonas mediado por plasmídeos (PMQR) foram descritos em diferentes locais do mundo, inclusive o Brasil, como causadores de doença (PAIVA et al., 2012; ROCHA et al., 2014). Durante a caracterização de resistência antimicrobiana de isolados de *Klebsiella* spp. provenientes de animais de companhia no Japão, Harada et al (2016), identificaram que as estirpes PMQRs eram mais prevalentes em isolados ESBL de *Klebsiella pneumoniae*, quando comparado às não produtoras de ESBL. Isto implica numa ligação epidemiológica entres os genes PMQRs e ESBLs (CANTÓN et al., 2008). E esta interação pode explicar as taxas mais altas de resistência a fluorquinolonas em amostras clínicas de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de ESBL (HARADA et al., 2016).

2.2.3.3 *Klebsiella* spp. resistente a carbapenêmicos

Os carbapenêmicos apresentam um amplo espectro de atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, incluindo enterobactérias ESBL. Antimicrobianos como imipenem, meropenem e ertapenem são recomendados como terapia de primeira linha para infecções severas causadas por *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBL. A emergência de enterobactérias resistentes a carbapenêmicos é preocupante, uma vez que, conseqüentemente as opções de tratamento são muito restritas (PATERSON, 2006).

A resistência a carbapenêmicos envolve diversos mecanismos combinados, como a modificação da permeabilidade da membrana externa e aumento da regulação dos sistemas de efluxo, associado com a hiperprodução de cefalosporinases ou ainda, produção de carbapenemases (NORDMANN; CUZON; NAAS, 2009).

As carbapenemases são β -lactamases que hidrolizam a maioria dos β -lactâmicos, incluindo os carbapenem. São classificadas em quatro classes moleculares; os pertencentes à classe A são o IMI inibido por cromossomo e o

inibidor de ácido clavulânico, NMC-A e SME, identificados em *Enterobacter cloacae* e *Serratia marcescens*; as enzimas KPC codificadas por plasmídeo identificadas em *Enterobacteriaceae*; e as enzimas do tipo GES identificadas em *Enterobacteriaceae* e *P. aeruginosa*. As enzimas da classe B são as carbapenemases mais clinicamente significativas, e são metalo- β -lactamases, principalmente da IMP e da série VIM. Já foram relatados em todo o mundo e seus genes estão localizados em plasmídeos e integrons. Uma única AmpC β -lactamase mediada por plasmídeo, CMY-10, identificada em um isolado de *Enterobacter aerogenes*, mostrou ser uma cefalosporinase com algumas propriedades da carbapenemase (POIREL; PITOUT; NORDMANN, 2007).

As carbapenemases da classe D estão sendo cada vez mais relatadas, principalmente em *Acinetobacter baumannii*, e comprometem a eficácia do imipenem e do meropenem significativamente. A classe D, OXA-48 β -lactamase tem sido descrita principalmente em *Klebsiella pneumoniae* na Turquia, Líbano e Bélgica. As carbapenemases mais frequentes da classe A são enzimas KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase), predominantemente envolvidas em infecções nosocomiais e sistêmicas. A maioria das β -lactamases KPC é codificada por plasmídeos de *K pneumoniae*. Sua atual disseminação mundial faz com que sejam uma potencial ameaça aos tratamentos com antibióticos atualmente disponíveis (NORDMANN; CUZON; NAAS, 2009).

Alguns fatores de risco associados com a aquisição de bactéria produtora de KPC incluem hospitalização prolongada, permanência em unidade de tratamento intensivo, uso de dispositivos invasivos, imunossupressão, e tratamento com múltiplos antibióticos anterior a cultura primária. Alguns estudos demonstram que aproximadamente 20% dos pacientes com infecção por *K. pneumoniae* resistente a carbapenêmicos foram tratados previamente com o mesmo antimicrobiano, enquanto os outros pacientes receberam outros β -lactâmicos ou quinolonas (NORDMANN; CUZON; NAAS, 2009; GUERRA; FISCHER; HELMUTH, 2014).

Nos Estados Unidos, resistência a carbapenêmicos tem sido observada em estirpes de *K pneumoniae* produtoras de carbapenemases classe A, KPC-1, KPC-2, e KPC-3. As estirpes produtoras de KPC têm demonstrado resistência múltipla a antimicrobianos, incluindo piperacilina/tazobactam, cefalosporinas de terceira e

quarta geração, fluoroquinolonas, e aminoglicosídeos, assim como carbapenêmicos. Além da resistência, há questionamentos que sugerem que estes isolados não estão apenas sendo selecionados por uso de antibióticos, mas sim sendo passados de pessoas para pessoas como resultado de falhas no controle da infecção (PATERSON, 2006).

No Brasil, já são descritos casos de *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase (KPC) isoladas de amostras de sangue e urina de pacientes internados em unidades de terapia intensiva (UTI), inclusive com co-produção de ESBL CTX-M-2 (MONTEIRO et al., 2009; PEIRANO et al., 2009; CUNHA et al., 2017).

Figura 1. Distribuição geográfica mundial de KPC.

Figure 2: Geographic distribution of KPC worldwide

Fonte: (NORDMANN; CUZON; NAAS, 2009).

2.2.3.4 Elementos genéticos móveis associados à resistência antimicrobiana

A disseminação à resistência antimicrobiana está estreitamente relacionada com a aquisição de genes de resistência. Este tipo de transferência de genes de uma bactéria para outras, seja da mesma espécie ou espécies diferentes, é denominado transferência horizontal e se dá através de plataformas que carregam os genes de uma célula bacteriana para outra e são denominados elemento genéticos móveis (EGM) (TOLEMAN; BENNETT; WALSH, 2006; TOLEMAN; WALSH, 2011a). Os EGM associados a transferência de genes de resistência são plasmídeos, integrons e transposons (TOLEMAN; WALSH, 2011b; GILLINGS, 2014).

Plasmídeos são moléculas de DNA extra cromossômicas capazes de replicação autônoma e podem carrear genes de resistência, virulência, dentre outras vantagens à célula bacteriana, no entanto, não carregam genes essenciais para a sobrevivência das bactérias (CARATTOLI, 2009, 2011). A resistência em gram-negativos, principalmente em enterobactérias, é atribuída a presença de plasmídeos, considerados elementos genéticos chave na transmissão e disseminação da resistência (CARATTOLI, 2011).

Plasmídeos que tem a habilidade de serem transferidos de uma célula a outra pelo mecanismo de conjugação podem ser classificados em famílias denominadas grupos de incompatibilidade (CARATTOLI et al., 2005; CARATTOLI, 2009). Essa característica se dá devido a incapacidade de uma célula bacteriana albergar dois plasmídeos de uma mesma família, sendo que se isso ocorrer, um deles será eliminado (CARATTOLI et al., 2005; CARATTOLI, 2009).

Os grupos de incompatibilidade são definidos conforme o tipo de genes responsáveis pela replicação do plasmídeo, denominados *replicon* (CARATTOLI et al., 2005). Conforme o *replicon* apresentado, os plasmídeos podem ser agrupados em diferentes famílias denominadas Inc (abreviatura de incompatibilidade). Em *Klebsiella* spp. os plasmídeos que portam genes codificadores de ESBL mais prevalentes são dos grupos IncF e IncN (CARATTOLI, 2011).

Outros dois EGM responsáveis pela propagação de genes de resistência são os integrons e transposons. Integrons são EGM que podem capturar, trocar e

expressar genes de resistência e podem estar presentes em plasmídeos ou no cromossomo (GILLINGS, 2014). Integrans podem ser classificados em várias classes, no entanto apenas cinco tem um papel na expressão e disseminação de genes de resistência a antibióticos (CAMBRAY; GUEROUT; MAZEL, 2010; GILLINGS, 2014). Os integrans comumente associados a resistência são os de classe 1, classe 2 e classe 3 (CAMBRAY; GUEROUT; MAZEL, 2010).

Já os transposons são capazes de se movimentar de uma região para outra de um genoma através do mecanismo de transposição (TOLEMAN; WALSH, 2011b). Esses elementos sempre apresentam um gene que codifica uma transposase (*tnpA*), a enzima que catalisa sua excisão e inserção de uma parte do genoma para outra; e pequenas sequências em suas extremidades que são reconhecidas como substrato para a transposase, denominadas sequências repetidas invertidas (IRs) (TOLEMAN; WALSH, 2011a).

O tipo mais simples de transposon são as sequências de inserção (IS), que geralmente são compostas por no máximo 2500 pares de bases, nos quais estão presentes o gene que codifica a transposase e as duas IRs (TOLEMAN; WALSH, 2011a). Em enterobactérias produtoras de ESBL as sequências de inserção responsáveis pela mobilização de genes *bla*CTX-M mais comuns são *ISEcp1*, *IS26* e *ISCR1* (CANTÓN; GONZÁLEZ-ALBA; GALÁN, 2012; ZHAO; HU, 2013).

3 VIRULÊNCIA E RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS DE *Klebsiella* spp. ISOLADAS DE PSITACÍDEOS COM DOENÇA RESPIRATÓRIA

3.1 INTRODUÇÃO

As enterobactérias são onipresentes e consideradas parte da microbiota De mamíferos e algumas espécies de aves, mas em determinadas ordens, como a dos Psitaciformes e Falconiformes, as enterobactérias não são descritas como um componente normal da microbiota entérica. Elas estão associadas principalmente às infecções secundárias, mas em alguns casos são implicadas como patógenos primários (GERLACH, 1994).

Em função do caráter oportunista do agente, o simples isolamento de *Klebsiella* spp. de amostras clínicas provenientes de aves, pode não ser o suficiente para determinar a ocorrência da doença (HIDASI et al., 2013). A doença clínica está relacionada à presença de fatores de virulência que conferem capacidade de aderir, colonizar, capturar e ferro e resistir aos mecanismos de defesa do hospedeiro (BROBERG; PALACIOS; MILLER, 2014).

Existem quatro grandes classes de fatores de virulência que são bem caracterizados nas *Klebsiellas*, e consistem em cápsula, incluindo a produção de hipercápsula nas estirpes hipervirulentas (HV), lipopolissacarídeo (LPS), sideróforos e fimbrias (BROBERG; PALACIOS; MILLER, 2014). Diversos outros fatores de virulência foram recentemente identificados e são relevantes para a virulência de *Klebsiella* spp., como porinas, bombas de efluxo, sistemas de transporte de ferro e genes envolvendo o metabolismo da alantoina (PACZOSA; MECSAS, 2016).

Os genes de virulência mais prevalentes entre os isolados de aves silvestres são relacionados a fimbrias de adesão, como adesinas (DAVIES et al., 2016). As fimbrias de adesão tipo 1 e tipo 3 estão presentes em diversas espécies de enterobactérias e possuem um papel importante na aderência em mucosas, colonização de tecidos e formação de biofilmes (EL FERTAS-AISSANI et al., 2013). Estes atributos fornecem ao agente um maior potencial de invasividade e estabelecimento de infecção.

O gene *uge* é pouco descrito em *Klebsiella pneumoniae* (DAVIES et al., 2016), mas alguns estudos revelam sua presença em isolados de secreções respiratórias coletados de ruminantes (AHER; ROY; KUMAR, 2012; OSMAN et al.,

2014). Este gene é importante para a integridade da camada de LPS e da cápsula nos isolados de *Klebsiella* spp. (REGUÉ et al., 2004). As proteínas codificadas estão envolvidas na degradação de amônia e carbamato em ácido carbônico, colaborando para diminuição do pH e permitindo a sobrevivência em meio ácido, como a acidose metabólica em hospedeiros com sepse (KAKINUMA et al., 2007).

Outros genes menos frequentes em isolados de *Klebsiella* spp. de origem animal são yeriniabactina, *rmpA*, *magA*, além dos genes codificadores de cápsula, *K1* e *K2*. Estes possuem um papel importante em doenças respiratórias e sepse, frequentemente associadas a infecções nosocomiais em humanos (EL FERTAS-AISSANI et al., 2013).

A urgência em compreender melhor as interações entre *Klebsiella* e o hospedeiro se deve às mudanças nos padrões de resistência aos antimicrobianos de isolados clínicos. Os beta-lactâmicos sempre foram as drogas de escolha no tratamento de infecções por *Klebsiella*, por causa de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos, macrolídeos esterases e sistemas de efluxo que tornam muitas outras classes de medicamentos ineficazes. No entanto, o uso de beta lactâmicos está se tornando limitado, pois várias classes de beta lactamases já foram identificadas em isolados clínicos de *Klebsiella*. A incidência de resistência aos carbapenêmicos também é considerada emergente, o que torna a *Klebsiella* uma ameaça à saúde pública (BROBERG; PALACIOS; MILLER, 2014).

A presença destes fatores de virulência em amostras de *K. pneumoniae* coletadas de animais, associada a resistência a antimicrobianos pode afetar as populações de aves silvestres e de cativeiro e representar uma ameaça potencial para outras aves e seres humanos. Neste sentido fundamenta-se a importância do estudo de *Klebsiella* spp. causadora de doenças respiratórias em psitacídeos mantidos em cativeiro, possibilitando o estabelecimento de medidas de controle e prevenção de epizootias que possam afetar animais e a população humana.

3.2 OBJETIVOS

3.2.1 Objetivos gerais

Avaliar o perfil de resistência e virulência de estirpes *Klebsiella* spp. isoladas de psitacídeos com doença respiratória mantidos em cativeiro.

3.2.2 Objetivos específicos

- Investigar a ocorrência de *Klebsiella* spp. em suabe de fezes, cloaca, e secreções respiratórias de psitacídeos com doença respiratória.
- Determinar a frequência dos genes *iroN*, *iucD*, *irp-2*, *rmpA*, *magA*, *kfu*, *uge*, *K2*, *kpn*, *mrkD*, *fimH*, *cc258*, e *allS* nas estirpes de *Klebsiella* spp.
- Avaliar a suscetibilidade antimicrobiana dos isolados.
- Realizar uma análise filogenética por meio da técnica de AFLP.

3.3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.3.1 Animais e amostras

Este estudo foi realizado com estirpes de *Klebsiella* spp. isoladas de psitacídeos cativos com doença respiratória (Licença SISBIO: 46561-2).

Durante o período de abril de 2015 a outubro 2017, foram coletadas amostras provenientes de fezes, cloaca, secreções nasais, oculares e de seio infraorbitário de 46 psitacídeos mantidos em cativeiro. A coleta de secreções respiratórias era feita de acordo com o quadro clínico apresentado pela ave. Dentre os animais coletados neste período estão papagaios verdadeiros (*Amazona aestiva*) (n=30), papagaio do mangue (*Amazona amazonica*) (n=3), papagaio galego (*Amazona xanthops*) (n=1), arara azul (*Anodorhynchus hyacinthinus*) (n=3), Red Rumped (*Psephotus haematonotus*) (n=1), Agapornis (*Agapornis* spp.) (n=1), e periquitão maracanã (*Psittacara leucophthalmus*) (n=2), calopsita (*Nymphicus hollandicus*) (n=5).

O material foi coletado com suabes estéreis com meio de transporte (Meio de Stuart) mantidos sob refrigeração até o momento do processamento e encaminhado para o Laboratório de Medicina Aviária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a realização de cultura e isolamento microbiológico. As amostras coletadas foram semeadas em caldo BHI (Infusão de cérebro e coração, Difco™), e isoladas em ágar MacConkey, com incubação a 37°C por 24 horas.

3.3.2 Identificação por MALDI-TOF MS

A identificação das colônias foi realizada por meio da técnica de MALDI-TOF MS (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry*). A preparação, análise e processamento de dados foi feito de acordo com as instruções do fabricante (KUHNERT et al., 2015).

As colônias de bactérias recém cultivadas foram suspensas em etanol a 70%. Após centrifugação, o sedimento foi suspenso em 50 µL de ácido fórmico a 70% e com o mesmo volume de acetonitrila. A suspensão foi centrifugada e 1 µL do sobrenadante foi transferido para uma placa de alvo MALDI de aço polido (Bruker Daltonik) e deixou-se secar à temperatura ambiente. A amostra foi sobreposta com 1 µL de matriz (10 mg de ácido a-ciano-4-hidroxi-cinâmico ml⁻¹ em acetonitrilo a 50% / ácido trifluoroacético a 2,5%).

Os espectros de massa foram adquiridos pelo espectrômetro de massa Microflex™ (Bruker Daltonik), com uma faixa de massa de 2-20 kDa, utilizando o software FlexControl™ 3.0 (Bruker Daltonik). Os espectros foram carregados no MALDI BioTyper™ 3.0, usando as configurações padrão e comparados com a biblioteca do fabricante resultando no valor do log (score). Os critérios interpretativos Bruker padrão foram aplicados. Foram aceitos escores $\geq 2,0$ para atribuição de espécies e pontuações de $\geq 1,7$, mas $\leq 2,0$ para identificação do gênero.

3.3.3 Determinação da resistência aos antimicrobianos

O perfil de resistência dos isolados foi determinado utilizando o teste de difusão em disco, de acordo com o protocolo descrito no documento M31-A3 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (CLSI, 2008). Os agentes antimicrobianos testados foram: ácido nalidíxico, amicacina, gentamicina, tobramicina, ampicilina, cefotaxima, cefoxitina, amoxicilina com ácido clavulânico, levofloxacina, cloranfenicol, sulfonamida, cotrimoxazol, tetraciclina, imipenem e enrofloxacin.

As estirpes que apresentavam resistência às cefalosporinas de 3ª e 4ª geração foram analisadas quanto à produção fenotípica de ESBL (beta-lactamases de espectro estendido), pelo método de aproximação de discos (BRADFORD, 2001; CLSI, 2008, CLSI, 2013).

3.3.4 Determinação do perfil de virulência

Os fatores de virulência foram identificados pela reação em cadeia da polimerase (PCR). A extração de DNA foi realizada segundo a metodologia descrita por Boom et al. (1990). A mistura para a amplificação foi constituída por Tris-HCl buffer (pH 8.3) 1.5 mM, MgCl₂, trifosfatos de desoxinucleotídeos 0.2 mM, pares de *primers*, Taq DNA polimerase 0.5U, e água ultrapura autoclavada em um volume final de 25 µL.

Os ciclos de amplificação consistiam de um ciclo de desnaturação inicial de 95°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de 95°C por 60 segundos de desnaturação, ciclo de anelamento variável para cada par de *primer* (descritos no quadro 2) por 60 segundos, 72°C de extensão por 60 segundos e um ciclo final de extensão de 72°C por 10 minutos.

Os produtos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5% (100V por 2 horas) corados com SyBR Safe® DNA gel stain (Invitrogen, São Paulo, Brasil). Como marcador de peso molecular foi utilizado 100 bp DNA *ladder* (LGC, São Paulo, Brasil).

As cepas padrão utilizadas como controle positivo foram UPEC sorogrupo O6, *K. pneumoniae* ATCC13883. Os *primers*, os genes, temperatura de anelamento e referências estão descritos no quadro 2.

Quadro 2. *Primers*, genes, temperatura de anelamento, tamanho dos fragmentos e referências utilizadas para identificação dos fatores de virulência de *Klebsiella* spp.

Descrição	Gene	Sequência dos <i>primer</i> (5'-3')	T°C anel.	<i>Amplicon</i> (pb)	Referências
Sideróforo salmochelina	<i>iroN</i>	AAGTCAAAGCAGGGGTTGCCCG GACGCCGACATTAAGACGCAG	60°C	667	(JOHNSON et al., 2006)
Síntese de sideróforos de aerobactina	<i>iucD</i>	ACAAAAAGTTCTATCGCTTCC CCTGATCCAGATGATGCTC	63°C	602	(JANBEN et al., 2001)
Biossíntese de yersiniabactina	<i>irp2</i>	AAGGATTCGCTGTTACCGGAC TCGTCTG GGCAGCGTTTCTTCT	61°C	280	(SCHUBERT et al., 1998)
Regulador do fenótipo A mucóide	<i>rmpA</i>	ACTGGGCTACCTCTGCTTCA CTTGCATGAG CCATCTTTCA	50°C	535	(YEH et al., 2007)

Gene A associado a mucoviscosidade	<i>magA</i>	GGTGCTCTTTACATCATTGC GCAATGGCCATTGCGTTAG	59,7°C	1283	(TURTON et al., 2008)
Sistema de captação de ferro	<i>kfu</i>	GAAGTGACGCTGTTTCTGGC TTTCGTGTGGCCAGTGACTC	54°C	797	(AHER; ROY; KUMAR, 2012)
Uridina difosfato galacturonato 4-epimerase	<i>uge</i>	TCTTCACGCCTTCCTTCACT GATCATCCGGTCTCCCTGTA	54°C	534	(AHER; ROY; KUMAR, 2012)
Sorotipo capsular	<i>K2</i>	GACCCGATATTCATACTTGACAGAG CCTGAAGTAAATCGTAAATAGATGGC	63,5°C	641	(TURTON et al., 2008)
Adesão fimH-like	<i>kpn</i>	GTATGACTCGGGGAAGATTA CAGAAGCAGCCACCACACG	55°C	626	(EL FERTAS-AISSANI et al., 2013)
Adesina tipo 3	<i>mrkD</i>	CCACCAACTATTCCCTCGAA ATGGAACCCACATCGACATT	52°C	240	(EL FERTAS-AISSANI et al., 2013)
Adesina tipo 1	<i>fimH</i>	ATGAACGCCTGGTCCTTTGC GCTGAACGCCTATCCCCTGC	55°C	688	(EL FERTAS-AISSANI et al., 2013)
ST258	<i>cc258</i>	TGATGCTGATGGCAGACTGA TGTAATCACACCCTGCCCA	58°C	320	(GOMEZ et al., 2016)
Ativador da regulação da alantoína	<i>allS</i>	CCGTTAGGCAATCCAGAC TCTGATTTA(A/T)CCCACATT	49°C	1090	(BRISSE et al., 2009)

3.3.5 Teste de alça para mucoviscosidade

As amostras foram semeadas em ágar sangue de carneiro 5% e incubadas por 24 horas a 37°C. Uma alça bacteriológica padrão foi usada para esticar o fio mucoviscoso da colônia. A hipermucoviscosidade foi definida pela formação de fios viscosos maiores do que 5 mm, quando a alça usada esticava a colônia da placa de ágar (teste de mucoviscosidade positivo) (FANG et al., 2004).

3.3.6 Análise filogenética por Polimorfismo do Comprimento dos Fragmentos Amplificados (SE-AFLP)

O SE-AFLP (Polimorfismo do Comprimento dos Fragmentos Amplificados) foi realizado segundo protocolo descrito por MClachlin et al. (2000) utilizando a endonuclease de restrição *Hind* III (sítio de restrição 5' AAGCTT 3' 3' TTCGAA 5'). Para clivagem do DNA bacteriano, 4 µg de DNA foram adicionados a um microtubo

contendo 24U de *Hind* III, tampão da enzima (1X) e água até o volume final de 20 µL. O tubo foi incubado a 37°C por 4 horas.

Após este período, uma alíquota de 5 µL do DNA clivado foi adicionado a um microtubo contendo 0,2 µg dos adaptadores ADH1 e ADH2 (ADH1 5'ACG GTA TGC GAC AG3' e ADH2 5'GAG TGC CAT ACG CTG TCT CGA3'), 1U de T4 DNA ligase, tampão ligase e água até o volume final de 20 µL. Esta reação foi incubada à temperatura ambiente por 3 horas. O DNA ligado foi aquecido a 80°C por 10 minutos para realização da PCR.

A PCR foi realizada utilizando-se 2 µL do DNA ligado diluído, 2,5 mM de MgCl₂, 300 ng do primer (HI-X), 1U de *Taq*DNA polimerase, 1 X tampão de PCR e água até o volume final de 50 µL. Submeteu-se as amostras à desnaturação a 94°C por 4 minutos seguido por 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 60°C e 2,5 minutos a 72°C. Realizou-se a detecção dos produtos de amplificação (20 µL produto e 5 µL de tampão de corrida 6X) através da eletroforese em gel de agarose 2%, utilizando-se tampão TAE (0,04 M tris-acetato [pH 8,5], 0,002 M de EDTA).

Os fragmentos amplificados foram visualizados no sistema de foto documentação ImageMaster (Amershan Biosciences), sendo os mesmos corados com BlueGreen® (LGC Biotecnologia) e comparados ao marcador 100 pb DNA *ladder* (LGC Biotecnologia).

Para análise estatística dos fragmentos gerados foi utilizado o programa Bionumerics (AppliedMaths, Sint-Martens-Latem, Belgica). A similaridade das amostras foi estimada por meio do coeficiente de Dice. Com a matriz de similaridade gerada foi possível determinar os grupos pelo método de "Unweighthed Pair-Group Method Using Arithmetic Average" (UPGMA).

Foi utilizado o ponto de corte de 90% de similaridade genética para definição os perfis genotípicos (VAN BELKUN et al., 2007). Os resultados obtidos através da caracterização genotípica foram analisados segundo o método numérico descrito por Hunter; Gaston (1988), para determinação do índice discriminatório.

3.4 RESULTADOS

Em 19 (19/46) das amostras avaliadas foi possível isolar *Klebsiella* spp., sete (16/19) eram originárias de secreções respiratórias, duas (2/19) foram isoladas de fezes e suabes de cloaca e fezes, e uma (1/19) amostra de fígado foi obtida por meio de necrópsia. Dentre as 19 estirpes de *Klebsiella* spp. isoladas, 16 foram identificadas como *Klebsiella pneumoniae*, e três (3/18) foram identificadas como *Klebsiella oxytoca*. A identificação das amostras, origem dos isolados e aves coletadas são demonstrados no quadro 3.

Quadro 3. Identificação das amostras, origem dos isolados e animais coletadas.

ID	AMOSTRA	ESPÉCIE	ORIGEM DA AMOSTRA	ANIMAIS
1	63.1 B KO	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Narina	<i>Amazona aestiva</i>
2	45 KP	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Traqueia	<i>Amazona aestiva</i>
3	41 KP	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Secreção nasal	<i>Amazona aestiva</i>
4	42 KP	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Secreção nasal	<i>Amazona aestiva</i>
5	51 KP	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Secreção nasal	<i>Amazona aestiva</i>
6	55.2 KP	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Orofaringe	<i>Amazona aestiva</i>
7	58.3 KP	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Traqueia/ Orofaringe	<i>Psittacara leucopthalmus</i>
8	72 KP	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Traqueia	<i>Amazona aestiva</i>
9	74 KO	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Coana	<i>Amazona aestiva</i>
10	75.1 B KP	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Traqueia	<i>Amazona aestiva</i>
11	70 C KO	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Cloaca	<i>Amazona aestiva</i>
12	88.1 A=C KP	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Traqueia	<i>Amazona aestiva</i>
13	108.2 A KP	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Narina	<i>Amazona aestiva</i>
14	111 C e D KP	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Traqueia e Coana	<i>Amazona aestiva</i>
15	96 TRAQ A KP	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Traqueia	<i>Amazona aestiva</i>
16	80.1 C KP	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Traqueia	<i>Amazona aestiva</i>
17	112 A KP	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Fezes	<i>Anodorhynchus Hyacinthinus</i>

18	112 D KP	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Orofaringe	<i>Anodorhynchus Hyacinthinus</i>
19	137 KP A	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Fígado	<i>Amazona aestiva</i>

As principais manifestações clínicas relatadas eram sinusite e pneumonia, e os sinais clínicos encontrados eram: secreção nasal (Figura 2), presença de edema em região periocular, dispneia (Figura 3) e formação de cáseo em narina e/ou seio nasal (Figura 4).

Figura 2. Secreção nasal em narinas de papagaio verdadeiro (*Amazona aestiva*).

Fonte: Ambulatório de Aves FMVZ-USP, 2016.

Figura 3. Dispneia em papagaio Verdadeiro (*Amazona aestiva*).

Fonte: Ambulatório de Aves FMVZ-USP, 2016.

Figura 4. Formação caseosa em narinas de papagaio verdadeiro (*Amazona aestiva*).

Fonte: Ambulatório de Aves FMVZ-USP, 2016.

O perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos demonstrou alta resistência para ampicilina (89,5%). Resistência múltipla (a três ou mais categorias de antimicrobianos) foi detectada em 31,6% (6/19) das estirpes, e o padrão de resistência a ampicilina, sulfonamida, e gentamicina foi o mais prevalente (50%, 3/6).

O perfil de virulência demonstrou uma alta prevalência dos genes *fimH* (94,7%), *kpn* (89,4%), *uge* (84,2%) e *irp-2* (78,9%). Três estirpes de *K. pneumoniae* foram positivas para produção de beta-lactamase de espectro estendido (Figura 5). O perfil de virulência e resistência são demonstrados nas tabelas 1 e 2, respectivamente, e as combinações de genótipos são demonstradas na tabela 3.

Não foram identificadas amostras sem fatores de virulência. Os isolados de aves estudados revelaram estirpes com diversas combinações de virulência, agrupando de 3 a 6 genes pesquisados. Nos isolados de secreções respiratórias de papagaios verdadeiro foram detectados de 3 a 6 genes de virulência, com predomínio dos genótipos G2 e G3, que juntos somaram 65% (11/19) das estirpes isoladas.

O fenótipo de hiper mucoviscosidade foi identificado em 5,2% (1/19) das amostras, em uma estirpe de *Klebsiella oxytoca* isolada de suabe de cloaca de papagaio verdadeiro (Figura 6).

Figura 5. Teste de produção fenotípica de ESBL (beta-lactamases de espectro estendido), pelo método de aproximação de discos.

Fonte: (DAVIES, 2017).

Figura 6. Teste positivo para hipermucoviscosidade.

Fonte: (DAVIES, 2015).

Tabela 1. Perfil de virulência de *Klebsiella spp.* isoladas de psitacídeos em cativeiro.

Nº	ID	ORIGEM DA AMOSTRA	ANIMAIS	<i>iucD</i>	<i>iroN</i>	<i>irp-2</i>	<i>K2</i>	<i>rmpA</i>	<i>magA</i>	<i>uge</i>	<i>kfu</i>	<i>allS</i>	<i>cc258</i>	<i>kpn</i>	<i>mrkD</i>	<i>FimH</i>
1.	63.1 KO	Narina	Papagaio Verdadeiro	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+
2.	45 KP	Traqueia	Papagaio Verdadeiro	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+
3.	41 KP	Secreção nasal	Papagaio Verdadeiro	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
4.	42 KP	Secreção nasal	Papagaio Verdadeiro	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+
5.	51 KP	Secreção nasal	Papagaio Verdadeiro	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+
6.	55.2 KP	Orofaringe	Papagaio Verdadeiro	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+
7.	58.3 KP	Traqueia/Orofaringe	Periquitão Maracanã	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+
8.	72 KP	Traqueia	Papagaio Verdadeiro	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+
9.	70 C KO	Cloaca	Papagaio Verdadeiro	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+
10.	88.1 A KP	Traqueia	Papagaio Verdadeiro	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+
11.	74 KO	Coana	Papagaio Verdadeiro	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+
12.	75.1 B KP	Traqueia	Papagaio Verdadeiro	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+
13.	96 TRAQ A KP	Traqueia	Papagaio Verdadeiro	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+
14.	80.1 C KP	Traqueia	Papagaio Verdadeiro	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+
15.	108.2 A KP	Narina	Papagaio Verdadeiro	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+
16.	111 C e D KP	Traqueia e Coana	Papagaio Verdadeiro	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+
17.	112 A KP	Fezes	Arara Azul	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+
18.	112 D KP	Orofaringe	Arara Azul	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+
19.	137 A KP	Fígado	Papagaio Verdadeiro	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+
TOTAL (%)				-	10,5	78,9	-	-	-	84,2	52,6	-	-	89,4	57,9	94,7
TOTAL (n)				0	2	15	0	0	0	16	10	0	0	17	11	18

Tabela 2. Perfil de suscetibilidade de *Klebsiella spp.* aos antimicrobianos.

Nº	ID	ORIGEM	ANIMAIS	NAL	AMP	AMI	GEN	CTX	CFO	AMC	LVX	CLO	TOB	SUL	SUT	TET	ENO	IPM
1	63.1 KO	Narina	Papagaio Verdadeiro	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
2	45 KP	Traqueia	Papagaio Verdadeiro	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
3	41 KP	Secreção nasal	Papagaio Verdadeiro	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	S
4	42 KP	Secreção nasal	Papagaio Verdadeiro	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S
5	51 KP	Secreção nasal	Papagaio Verdadeiro	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
6	55.2 KP	Traqueia	Papagaio Verdadeiro	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
7	58.3 KP	Traqueia/ Orofaringe	Periquitão Maracanã	R	R	S	S	R	S	I	R	R	R	R	R	S	R	S
8	72 KP	Traqueia	Papagaio Verdadeiro	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
9	70 C KO	Cloaca	Papagaio Verdadeiro	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S
10	88.1 A KP	Traqueia	Papagaio Verdadeiro	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S
11	74 KO	Coana	Papagaio Verdadeiro	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
12	75.1 B KP	Traqueia	Papagaio Verdadeiro	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S
13	96 Traq A KP	Traqueia	Papagaio Verdadeiro	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
14	80.1 C KP	Traqueia	Papagaio Verdadeiro	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S
15	108.2 A KP	Narina	Papagaio Verdadeiro	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
16	111 C e D KP	Traqueia e Coana	Papagaio Verdadeiro	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S
17	112 A KP	Fezes	Arara Azul	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
18	112 D KP	Orofaringe	Arara Azul	S	R	S	S	S	S	S	S	S	I	R	S	S	S	S
19	137 A KP	Fígado	Papagaio Verdadeiro	R	R	S	R	R	S	I	R	S	R	R	R	S	R	S
TOTAL INTERMEDIÁRIAS (%)				-	5,3	-	-	-	-	10,5	-	-	5,3	5,3	-	-	5,3	-
TOTAL RESISTENTES (%)				15,8	89,5	5,3	26,3	15,8	-	5,3	15,8	5,3	15,8	42,1	15,8	5,3	15,8	-

NAL: ácido nalidíxico, AMP: ampicilina, AMI: amicacina, GEN: gentamicina, CTX: cefotaxima, CFO: cefoxitina, AMC: amoxicilina com ácido clavulânico, LVX: levofloxacina, CLO: cloranfenicol, TOB: tobramicina, SUL: sulfonamida, SUT: clotrimoxazol, TET: tetraciclina, ENR: enrofloxacin, IPM: imipenema. S: sensível, I: intermediário, R: resistente.

Tabela 3. Combinações de genótipos de acordo com amostras clínicas e aves investigadas no estudo.

Origem dos Isolados	N total	Virulência	Genótipo
Papagaio Verdadeiro – Fezes	1/19	<i>iroN, irp2, fimH, uge, kfu</i>	G1
Papagaio Verdadeiro – Secreções respiratórias	5/19	<i>irp2, fimH, kpn, uge, kfu</i>	G2
	6/19	<i>irp2, fimH, mrkD, kpn, uge</i>	G3
	1/19	<i>fimH, mrkD, kpn</i>	G4
	1/19	<i>irp2, fimH, mrkD, kpn, uge, kfu</i>	G5
	1/19	<i>iroN, fimH, kpn, kfu</i>	G6
Periquitão Maracanã – Secreções respiratórias	1/19	<i>fimH, mrkD, kfu</i>	G7
Arara Azul – Secreção respiratória	1/19	<i>irp2, fimH, mrkD, kpn, uge</i>	G3
Arara Azul – Fezes	1/19	<i>irp2, fimH, mrkD, kpn, uge</i>	G3
Papagaio Verdadeiro – Fígado	1/19	<i>fimH, mrkD, kpn, uge</i>	G8

As 19 estirpes foram submetidas à análise filogenética pela técnica de Polimorfismo do Comprimento dos Fragmentos Amplificados (SE-AFLP) (Figura 7), com um índice discriminatório de 0.96. Foram descritos no dendograma a resistência das amostras, identificação das estirpes (amostras), espécie de *Klebsiella* isolada, sítio de isolamento (origem da amostra), aves coletadas (animais), e virulência das amostras.

Figura 7. Perfis genotípicos (SE-AFLP) de *Klebsiella* spp. isoladas de psitacídeos cativos com doença respiratória.

Os quadrados coloridos demarcam os isolados de acordo com os genótipos de virulência encontrados.

Fonte: (DAVIES, 2017).

Quando analisado o perfil genotípico dos isolados de *Klebsiella*, obtido por SE-AFLP, observa-se uma heterogenicidade entre as estirpes, com o agrupamento de 16 perfis genotípicos. Um dos grupos (A8) foi representado por 2/19 estirpes, e um segundo grupo (A13) apresentou uma representação de 3/19. As estirpes eram provenientes de aves distintas e não tiveram contato direto.

3.5 DISCUSSÃO

A manutenção de aves em cativeiro causa modificação na microbiota intestinal e do trato respiratório, favorecendo a colonização por bactérias Gram negativas (MATTES et al., 2005). Em situações adversas, a *Klebsiella* spp. pode causar infecções locais envolvendo trato respiratório superior, e infecções sistêmicas, especialmente em psitacídeos (GERLACH, 1994).

Neste estudo, foram coletadas amostras de 46 psitacídeos clinicamente sintomáticos. Observa-se uma maior prevalência de espécies do gênero *Amazona* spp. (34/46), e este fato pode ser justificado por serem as aves populares e procuradas como animal de estimação, devido a habilidade de imitar a voz humana, combinada com a inteligência, beleza e docilidade (RENTAS, 2001). Esta popularidade associada ao fato de um manejo alimentar inadequado, levando ao desenvolvimento de hipovitaminose A, pode predispor o sistema respiratório a infecções oportunistas (GERLACH, 1994).

As principais doenças respiratórias relatadas por veterinários foram sinusite e pneumonia, e os sinais clínicos encontrados foram: secreções nasais, presença de edema em região periocular, dispneia, e formação de cáseo em narina e/ou seio nasal. Em 19 das 46 amostras avaliadas foi possível isolar *Klebsiella* spp., sendo 17 (17/19) originárias de secreções respiratórias.

Em muitas espécies aviárias, como pombos, gansos e psitacídeos, a infecção somente é detectada quando se iniciam os sinais respiratórios. As infecções locais afetam os seios da face, cavidade oral, ingluvie e pele. Quando o caso se torna crônico, é possível observar acometimento dos pulmões. Nas infecções sistêmicas, pode-se observar colonização de órgãos vitais, levando a falência renal e encefalomielite, principalmente (GERLACH, 1994).

Dentre as 19 estirpes de *Klebsiella* spp. isoladas, 16 foram identificadas como *Klebsiella pneumoniae*, e três (3/18) foram identificadas como *Klebsiella oxytoca*. Este resultado pode ser associado ao fato da *Klebsiella oxytoca* ser mais descrita em infecções intestinais e sepse (HÖGENAUER et al., 2006). E a maior prevalência de *Klebsiella pneumoniae* em isolados de aves já foi relatada anteriormente em

estudos com enterobactérias (DORRESTEIN et al., 1985; STEELE; BROWN; BOTZLER, 2005; STENKAT et al., 2014; SUN et al., 2014).

O mesmo ocorre em humanos, sendo *K. pneumoniae* considerada a espécie clinicamente mais importante do gênero, causando 75% a 86% das infecções, seguida por *K. oxytoca*, responsável por 13% a 25% das infecções (BROBERG; PALACIOS; MILLER, 2014). Além disso, *K. pneumoniae* é um dos isolados mais comuns encontrados em situações de pós-admissão em hospitais, e isto sugere transmissão nosocomial do agente (YU et al., 2007).

A patogênese das infecções por *K. pneumoniae* varia em função da presença de fatores de virulência (BROBERG; PALACIOS; MILLER, 2014), e pode ser agravada devido à resistência aos antibióticos (EL FERTAS-AISSANI et al., 2013).

O perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos observado neste estudo, demonstrou alta resistência à ampicilina (89,5%, 17/19), seguido por sulfonamidas (42,1%, 8/19), e gentamicina (28,8%, 5/19). O mesmo resultado foi obtido por Davies et al. (2016), ao avaliarem passeriformes e psitacídeos assintomáticos e sintomáticos, mantidos em centros de triagem. Assim como em fezes, água, alimentos e produtos de origem animal proveniente de frangos e perus (KIM et al., 2005), e isolados clínicos coletados de cães e gatos no Japão, a ampicilina demonstrou ser o antibiótico mais resistente nas estirpes de *K. pneumoniae* estudadas (HARADA et al., 2016).

Corroborando com este fato, estudos realizados em humanos com amostras de lavados traqueais e endotraqueais de pacientes com manifestações clínicas de pneumonia, causados por *K. pneumoniae*, demonstraram que o antimicrobiano que apresentou maior resistência foi a ampicilina (96,9%), e o que apresentou maior sensibilidade foi imipenem (15%) (JUAYANG et al., 2015).

Os resultados mostraram que 31,6% (6/19) das estirpes apresentaram resistência múltipla (a três ou mais categorias de antimicrobianos). Três das seis estirpes apresentaram resistência a cinco categorias de antimicrobianos (quinolonas, penicilinas, cefalosporinas, aminoglicosídeos e sulfonamidas), enquanto o restante (3/19) apresentou resistência para três (penicilinas, sulfonamidas e aminoglicosídeos). O padrão de resistência a ampicilina, sulfonamidas e gentamicina foi o mais prevalente (60%, 3/5). Estes dados corroboram com o estudo de Kim et al.

(2005), Wu et al. (2012), Sun et al. (2014), e Davies et al. (2016), nos quais foram observados altos níveis de resistência aos beta lactâmicos.

Sabe-se que o uso de agentes antimicrobianos exerce pressão seletiva e seleciona linhagens bacterianas com expressão de um gene de resistência para aquele agente e também de plasmídeos. Mudanças na distribuição de diferentes plasmídeos existentes nas cepas de *K. pneumoniae* contribuiriam para as diferenças observadas nas prevalências de resistências a antibióticos em diferentes partes do mundo (O'BRIEN, 2002).

Os β -lactâmicos têm falhado no tratamento de infecções por *Klebsiella* devido à presença de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos, esterases de macrólidos e sistemas de efluxo que tornam estes fármacos ineficazes (PODSCHUN; ULLMANN, 1998; BROBERG; PALACIOS; MILLER, 2014).

Recentemente dois tipos principais de resistência a antibióticos foram observados em *K. pneumoniae*, a expressão de beta-lactamases de amplo espectro (ESBLs), que tornam as bactérias resistentes a cefalosporinas e monobactâmicos, e a expressão de carbapenemases, que torna as bactérias resistentes a quase todos os beta-lactâmicos disponíveis, incluindo os carbapenêmicos. Devido à falta de tratamentos eficazes disponíveis, infecções *K. pneumoniae* causadas por bactérias produtoras de ESBL e resistentes aos carbapenêmicos possuem maiores taxas de mortalidade e morbidade quando comparadas às bactérias não resistentes (PACZOSA; MECSAS, 2016).

De acordo com os resultados deste estudo, três estirpes (3/19) de *K. pneumoniae* foram positivas para produção de beta-lactamase de espectro estendido, representando 15,7% das estirpes isoladas. Dados similares foram obtidos no trabalho de Davies et al. (2016), com 17,9% (7/39) das estirpes de *K. pneumoniae* com fenótipo ESBL. Este fato se torna relevante quando os hospedeiros deste agente são aves silvestres mantidas em cativeiro como animais de companhia, e estão em constante contato direto com seres humanos.

Estirpes de *K. pneumoniae* ESBL não apresentaram somente resistência a cefalosporinas, e frequentemente observa-se co-resistência a outras classes de antimicrobianos, como aminoglicosídeos, sulfonamidas e quinolonas. Este achado

indica uma semelhança com as estirpes multi-resistentes de *K. pneumoniae* isoladas de humanos, e pode contribuir para seleção e persistência de ESBLs (HARADA et al., 2016).

No estudo de Harada et al. (2016), foi possível identificar clones de *K. pneumoniae* ESBL isolados de amostras clínicas de cães e gatos, semelhantes aos descritos em humanos, como causadores de infecções nosocomiais em hospitais veterinários. O mesmo ocorreu no estudo de Ewers et al. (2014), ao avaliar amostras clínicas de animais de companhia e cavalos. Este fato sugere a disseminação desses clones entre ambas populações ressaltando o potencial zoonótico (EWERS et al., 2014).

Estirpes de *K. pneumoniae* que podem causar infecções graves com alto grau de invasividade em indivíduos saudáveis e imunocomprometidos são consideradas HV (hipervirulenta) em comparação com estirpes de *K. pneumoniae* clássicas (PACZOSA; MECSAS, 2016). Esta virulência adicional está relacionada a aquisição de um plasmídeo contendo genes que aumentam a produção de cápsula. Além deste, existem outros fatores de virulência que contribuem para patogenicidade da *Klebsiella*, o lipopolissacarídeo (LPS), sideróforos e fimbrias (PODSCHUN; ULLMANN, 1998; BROBERG; PALACIOS; MILLER, 2014).

O perfil de virulência evidenciado neste estudo demonstrou uma alta prevalência dos genes *fimH* (94,7%), *kpn* (89,4%), *uge* (84,2%) e *irp-2* (78,9%). Os genes de virulência mais prevalentes entre os isolados são relacionados a fimbrias de adesão, como adesinas. As fimbrias de adesão tipo 1 e tipo 3 estão presentes em diversas espécies de *Enterobacteriaceae* e possuem um papel importante na aderência de mucosas, colonização de tecidos e formação de biofilmes. Estes atributos fornecem ao agente um maior potencial de invasividade e estabelecimento de infecção (EL FERTAS-AISSANI et al., 2013; DE CÁSSIA ANDRADE MELO et al., 2014; DAVIES et al., 2016).

O gene *uge* já foi descrito em aves (DAVIES et al., 2016). Alguns estudos revelam sua presença em isolados de secreções respiratórias coletados de ruminantes (AHER; ROY; KUMAR, 2012; OSMAN et al., 2014), além de estar presente em amostras clínicas coletadas de humanos (YU et al., 2007, 2008;

PACZOSA; MECSAS, 2016). O gene *uge* codifica uma 4-epimerase de galacturonato de UDP e está envolvido na produção adequada de LPS (PACZOSA; MECSAS, 2016) na maioria dos isolados de *K. pneumoniae* comensais ou associados à doenças. Na ausência deste gene, *K. pneumoniae* se torna menos capaz de causar UTI, pneumonia e sepse (REGUÉ et al., 2004; AHER; ROY; KUMAR, 2012). Ademais, as proteínas codificadas pelo gene *uge* estão envolvidas na degradação de amônia e carbamato em ácido carbônico, colaborando para diminuição do pH e permitindo a sobrevivência em meio ácido, como a acidose metabólica em hospedeiros com sepse (KAKINUMA et al., 2007).

O sideróforo salmochelina, codificada pelo gene *ironN*, torna mais eficiente a colonização de *K. pneumoniae*, principalmente em nasofaringe. Mesmo com a presença de lipocalina-2, que neutraliza a infecção, é possível a colonização e infecção de tecidos, indicando que as estirpes produtoras de salmochelina são mais virulentas do que as não produtoras. Este sideróforo é prevalente em estirpes de *K. pneumoniae* HV (PACZOSA; MECSAS, 2016).

Já o gene *irp-2* foi detectado em 78,9% das estirpes isoladas neste estudo. Levando-se em conta que a expressão de adesinas é importante durante a colonização, a yersiniabactina pode potencializar infecções causadas por *Klebsiella* spp. Dessa forma, fimbrias do tipo 1 e 3 em conjunto com yersiniabactina constituem uma ameaça a populações vulneráveis, ademais se associadas com resistência a antibióticos, levando a graves infecções respiratórias e sepse (EL FERTAS-AISSANI et al., 2013).

A ausência de genes *rmpA* e *magA* (relacionados a polissacarídeos extracapsulares e mucoviscosidade) foi um achado inesperado porque uma estirpe apresentou fenótipo mucóide. Esses genes possuem um papel importante na patogênese da *K. pneumoniae* em relação ao poder de invasão e resistência, e são predominantes em isolados clínicos de pacientes humanos (FANG et al., 2004).

Um estudo prévio mostrou que o fenótipo mucóide pode ser devido a um gene designado *rmpA* que freqüentemente coexiste com a produção de aerobactina. Este fato sugere que as duas características de virulência podem ser geneticamente acopladas em um plasmídeo de grande virulência (YU et al., 2007). Considerando

que neste estudo não foram encontradas amostras positivas para os genes do fenótipo mucóide e aerobactina, as estirpes isoladas podem ser menos virulentas. Porém, Osman et al. (2014) também mostram que *magA*, *uge*, *kfu*, *rmpA* e aerobactina em vez da cápsula K1 e K2 per se são importantes genes de virulência em cepas invasivas de *K. pneumoniae* causando infecções em animais.

A análise dos dendogramas obtidos no AFLP demonstrou que não existe relação clonal entre as estirpes. Este dado sugere que as aves foram infectadas em diferentes situações que não a transmissão horizontal de ave para ave, fazendo com que várias aves apresentem a infecção. Este fato pode levantar suspeitas de transmissão por outras aves silvestres ou sinantrópicas, animais domésticos, ou até mesmo uma possível transmissão antropozoonótica não investigada neste estudo.

3.6 CONCLUSÕES

Diante dos dados obtidos é possível concluir que:

Klebsiella spp. foi isolada de aves com sinais clínicos de infecções respiratórias. As estirpes foram predominantemente identificadas como *Klebsiella pneumoniae*.

Foram identificadas estirpes de *Klebsiella* spp. multirresistentes, e três estirpes de *K. pneumoniae* produtoras de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL).

Todas as estirpes apresentaram fatores de virulência, com predomínio de genes que codificam adesinas e sistemas de captação de ferro. As características genéticas das estirpes de *Klebsiella* spp. revelam uma preocupante coexistência de fatores de virulência e resistência antimicrobiana.

A análise filogenética (SE AFLP) demonstrou alto grau de heterogenicidade entre as estirpes de *Klebsiella* spp.

Novos trabalhos na área de aves silvestres mantidas em cativeiro são necessários para investigar dados epidemiológicos, e identificar a origem da infecção destas aves por estirpes de *Klebsiella* spp. multirresistentes e multivirulentas.

4 CARACTERIZAÇÃO DE *Klebsiella pneumoniae* PRODUTORAS DE BETA-LACTAMASES DE ESPECTRO ESTENDIDO ISOLADAS DE PSITACÍDEOS COM DOENÇA RESPIRATÓRIA

4.1 INTRODUÇÃO

Klebsiella pneumoniae é um agente comumente isolado de infecções nosocomiais e urinárias em humanos (LI et al., 2014). Dentre os vários mecanismos encontrados em *K. pneumoniae* para resistir a antibióticos, a produção de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) é um problema de saúde pública (PACZOSA; MECSAS, 2016; PADMINI et al., 2017).

Na última década, o surgimento de *K. pneumoniae* produtoras de ESBL alterou a epidemiologia desse agente no mundo todo (LI et al., 2014; PACZOSA; MECSAS, 2016; PADMINI et al., 2017).

As ESBLs hidrolisam eficientemente cefalosporinas 3^a e 4^a geração, antibióticos que são a primeira escolha para o tratamento de infecções por patógenos gram-negativos multirresistentes (BUSH, 2013b). E dentre centenas de variantes de ESBLs, as enzimas mais disseminadas em enterobactérias são as do grupo CTX-M (NASEER; SUNDSEFJORD, 2011; ZHAO; HU, 2013; PADMINI et al., 2017).

No Brasil, assim como no mundo todo, a variante genética mais encontrada em cepas de *K. pneumoniae* em infecções hospitalares é CTX-M-15 (ROCHA; PINTO; BARBOSA, 2016). Além disso, linhagens pandêmicas produtoras de CTX-M-15 são relatadas em todos continentes (PADMINI et al., 2017). No entanto, em medicina veterinária, os relatos e caracterizações desse agente são escassos.

As aves de companhia são consideradas importantes fontes de infecção de agentes oportunistas, uma vez que, a manutenção de aves em cativeiro modifica a microbiota intestinal e de trato respiratório, favorecendo a colonização por bactérias Gram negativas, dentre elas a *Klebsiella* spp. (MATTE et al., 2005; EL FERTAS-AISSANI et al., 2013). E este fato se torna relevante devido a crescente pressão seletiva de antibióticos e emergência de resistência antimicrobiana.

4.2 OBJETIVOS

4.2.1 Objetivos gerais

Caracterizar três cepas produtoras de beta-lactamases de espectro estendido isoladas de psitacídeos com doença respiratória, utilizando uma abordagem molecular e o sequenciamento do genoma.

4.2.2 Objetivos específicos

- Determinar quais os genes envolvidos na produção de ESBL, assim como elucidar quais elementos genéticos moveis (EGM) estão associados a esses genes nas estirpes de *Klebsiella*.
- Caracterizar os plasmídeos portadores dos genes ESBL através de conjugação, S1-PFGE, fenótipo de resistência transferida, grupo de incompatibilidade plasmidial e pMLST (*plasmid multilocus sequence typing*).
- Caracterização genômica das estirpes selecionadas através de MLST e outras análises filogenéticas.
- Determinar a sequência de DNA completa de um plasmídeo carreador de *bla*_{CTX-M}.

4.3 MATERIAIS E MÉTODOS

4.3.1 Amostras bacterianas

Foram selecionadas três estirpes de *Klebsiella pneumoniae* positivas para produção de beta-lactamase de espectro estendido (ESBL) com base nos resultados apresentados no capítulo 3. Os isolados eram provenientes de secreções respiratórias, e fígado coletado durante exame de necropsia. E as aves coletadas foram dois papagaios verdadeiros (*Amazona aestiva*) e um periquitão maracanã (*Psittacara leucophthalmus*).

4.3.2 Caracterização dos plasmídeos

4.3.2.1 Conjugação

Para os experimentos de conjugação foi utilizada como receptora a cepa de *E. coli* resistente a estreptomicina C600^{STR} (ATCC 23724). As estirpes doadora e receptora foram inoculadas em 3 mL de meio Luria Bertani e incubadas a 37° C por 24 horas. 25 uL da estirpe doadora e 50 uL da estirpe receptora foram inoculadas em 3 mL de meio LB e incubadas a 37° C. Após 24 horas 50 uL da cultura mista foi inoculada em ágar MacConkey contendo 2 g/L de estreptomicina e 2 mg/L de cefotaxima para seleção de transconjugantes de CTX-M-15. Para seleção de transconjugantes de CTX-M-8, a cultura mista foi inoculada em ágar MacConkey contendo 2 g/L de estreptomicina, 2 mg/L de cefotaxima e 0,05 mg/L de ciprofloxacino, levando em conta que o plasmídeo que possuía o gene blaCTX-M-8 também possuía o gene de resistência às quinolonas *qnrE1*. Após a seleção dos transconjugantes os plasmídeos foram extraídos usando o kit QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN) e o DNA plasmidial foi analisado através de eletroforese em gel de agarose 0,7% em uma corrida de 3 horas a 120V.

4.3.2.2 Análise do peso molecular dos plasmídeos através de S1-PFGE

Para a realização do PFGE (*Pulsed-field gel electrophoresis*) após a digestão enzimática por S1 nuclease foi adotado o protocolo descrito por Dropa (2012).

Os *plugs* foram preparados utilizando cultivo bacteriano na concentração 1×10^9 UFC/mL em caldo TSB (Difco). Após a preparação dos plugs foi realizada a digestão dos com a enzima S1 nuclease (ThermoFisher Scientific,) 10U por *plug*, em 350µL de tampão da enzima. A digestão ocorreu a 37°C por 45 minutos, e a reação foi interrompida transferindo-se o *plug* para um novo microtubo com tampão TE I (Tris-EDTA).

Após a digestão com a enzima, os *plugs* contendo plasmídios linearizados foram submetidos à eletroforese em campo pulsado (Chef Mapper - Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Em um gel de agarose para Pulsed Field a 1% em solução tampão TBE 0,5X (Tris-borato 45 mM, EDTA dissódico 1 mM, pH 8,0), foram colocados os plugs das amostras e de marcadores de peso molecular (Lambda Ladder PFG Marker e MidRange PFG Marker I, New England Biolabs, USA). As condições utilizadas na eletroforese foram: voltagem de 6 V/cm, a 14°C, por 20h, com intervalo de pulsos de 1s a 40s. O gel foi corado em brometo de etídio 1µg/mL, durante 1h, e visualizado em luz ultravioleta (Epi Chemi II Darkroom, UVP Bioimaging Systems). O tamanho dos plasmídeos foi determinado pela comparação com as bandas dos marcadores de peso molecular.

4.3.2.3 PBRT - Tipagem dos replicons plasmídeos (PCR based replicon types)

Os plasmídeos das cepas doadoras e transconjugantes foram classificados pelo grupo de incompatibilidade (Inc) utilizando a Técnica de PBRT descrita por Carattoli et al. (2005) com base na amplificação por PCR de 18 alvos (grupos Inc): IncA/C, IncB/O, IncF, IncFII, IncFIA, IncFIB, IncFIC, IncI1, IncK, IncHI1, IncHI2, IncL/M, IncN, IncP, IncT, IncX, IncY e IncW. Os *primers* estão descritos na tabela 4.

Tabela 4. *Primers*, direção e tamanho dos produtos em 3 painéis multiplex utilizados para tipagem dos replicons plasmidiais

Replicon	Direção	Sequência (5'-->3')	Amplicon (bp)
Multiplex 1			
B/O	F	GCGGTCCGGAAAGCCAGAAAAC	159
	R	TCTGCGTTCCGCCAAGTTCTGA	
FIC	F	GTGAACTGGCAGATGAGGAAGG	262
	R	TTCTCCTCGTCGCCAAACTAGAT	
A/C	F	GAGAACCACAAAGACAAAGACCTGGA	465
	R	ACGACAAACCTGAATTGCCTCCTT	
P	F	CTATGGCCCTGCAAACGCGCCAGAAA	534
	R	TCACGCGCCAGGGCGCAGCC	
T	F	TTGGCCTGTTTGTGCCTAAACCAT	750
	R	CGTTGATTACACTTAGCTTTGGAC	
Multiplex 2			
K/B	F	GCGGTCCGGAAAGCCAGAAAAC	160
	R	TCTTTCACGAGCCCGCCAAA	
W	F	CCTAAGAACAACAAAGCCCCCG	242
	R	GGTGCGCGGCATAGAACCGT	
FIIA	F	CTGTCGTAAGCTGATGGC	270
	R	CTCTGCCACAACTTCAGC	
FIA	F	CCATGCTGGTTCTAGAGAAGGTG	462
	R	GTATATCCTTACTGGCTTCCGCAG	
FIB	F	GGAGTTCTGACACACGATTTTCTG	702
	R	CTCCCGTCGCTTCAGGGCATT	
Y	F	AATTCAAACAACACTGTGCAGCCTG	765
	R	GCGAGAATGGACGATTACAAAACCTT	
Multiplex 3			
I1	F	CGAAAGCCGGACGGCAGAA	139
	R	TCGTCGTTCCGCCAAGTTCTGT	
Frep	F	TGATCGTTTAAAGGAATTTTG	270
	R	GAAGATCAGTCACACCATCC	
X	F	AACCTTAGAGGGCTATTTAAGTTGCTGAT	376
	R	TGAGAGTCAATTTTTATCTCATGTTTTAGC	
HI1	F	GGAGCGATGGATTACTTCAGTAC	471
	R	TGCCGTTTCACCTCGTGAGTA	
N	F	GTCTAACGAGCTTACCGAAG	559
	R	GTTTCAACTCTGCCAAGTTC	
HI2	F	TTTCTCCTGAGTCACCTGTTAACAC	644
	R	GGCTCACTACCGTTGTCATCCT	
L/M	F	GGATGAAAACATATCAGCATCTGAAG	785
	R	CTGCAGGGGGCGATTCTTTAGG	

4.3.3 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

Para a determinação da concentração inibitória mínima das estirpes doadoras e transconjugantes foi utilizado protocolo descrito pelo Clinical Laboratories Standards Institute utilizando o método de microdiluição em placa (CLSI, 2013a; CLSI, 2013b). Os antibióticos para quais foram determinados a CIM foram ácido nalidíxico (diluições de 1mg/L - 528mg/L) (Sigma-Aldrich™), enrofloxacino (0,003mg/L - 16mg/L) (Sigma-Aldrich™), ciprofloxacino (0,003mg/L - 16mg/L) (Sigma-Aldrich™), marbofloxacino (0,003mg/L - 16mg/L) (Sigma-Aldrich™), Cefotaxima (0,125mg/L - 128mg/L), Ceftazidima (0,125mg/L - 128mg/L), Ceftazidima (0,125mg/L - 128mg/L), Cefepima (0,125mg/L - 128mg/L), Amicacina (0,125mg/L - 128mg/L) e Gentamicina (0,125mg/L - 128mg/L).

4.3.4 Sequenciamento de genoma completo

As cepas de *K. pneumoniae* produtoras de ESBL foram submetidas ao sequenciamento do genoma completo. O DNA genômico foi extraído utilizando o kit PureLink Genomic DNA (Life Technologies, CA, EUA) conforme as instruções do fabricante. A qualidade e quantificação do DNA foram avaliadas por eletroforese em gel de agarose a 1%, espectrofotometria pelo aparelho NanoDrop (ThermoFisher Scientific) e pelo fluorômetro Qubit dsDNA HS Assay (Life Technologies).

O DNA foi enviado para o Centro de Facilidades para a Pesquisa (CEFAP-ICB-USP) para preparação de bibliotecas do tipo paired-end com fragmentos de 150 pares de bases e sequenciamento pela plataforma Illumina™ NextSeq.

4.3.5 Montagem *de novo* e análises *in silico*

As *reads* geradas pelo sequenciamento foram avaliadas pelo valor do Phred utilizando o programa FastQC v. 0.11.5

(<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Após esse tratamento, as *reads* foram submetidas a montagem *de novo* utilizando os programas CLC Genomics Workbench v.10 (QIAGEN) e Velvet v.1.2.10 (ZERBINO; BIRNEY, 2008). Os *drafts* dos genomas gerados pela montagens foram submetidos a predição de regiões codificadoras (CDS) utilizando a ferramenta Glimmer v.3.02b (<http://ccb.jhu.edu/software/glimmer>) e à ferramenta de anotação automática RAST e SEED (OVERBEEK et al., 2014). Após esta etapa, foi realizada uma curadoria manual das anotações utilizando os programas Geneious v.9.1 (Biomatters) e Artemis (CARVER et al., 2012).

Para a determinação *in silico* do *sequence type* (ST), genes de resistência, plasmídeos e pMLST (*plasmid multilocus sequence type*) foram utilizadas as ferramentas MLST 1.8, ResFinder 2.1, PlasmidFinder 1.3 e pMLST 1.4 do *Center for Genomic Epidemiology* (<https://cge.cbs.dtu.dk>). A identificação do antígeno capsular foi realizada utilizando as sequências dos alelos *wzi* através do banco de dados do Bigsdb (<http://bigsdb.pasteur.fr/klebsiella>).

Comparações entre sequências e alinhamentos com genomas de referência foram realizados utilizando a ferramenta online BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST), CONTIGuator (GALARDINI et al., 2011), Geneious v.9.1 (Biomatters) e MAFFT (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/server>).

4.3.6 Determinação da Sequência completa de plasmídeo IncM1

Correlacionando os dados do S1-PFGE e do sequenciamento do genoma da cepa Kp41, foi realizada a determinação da sequência completa de um plasmídeo portador de *bla*_{CTX-M-8} pertencente ao grupo IncM1. As sequências geradas pela montagem *de novo* da cepa Kp41 foram mapeadas às sequências completas do plasmídeo R69 (Acesso Genbank KM406488), plasmídeo protótipo do grupo IncM; e ao plasmídeo pKp145-11b (Acesso Genbank KX118608), plasmídeo IncM pertencente a um isolado clínico de *Klebsiella pneumoniae* no Brasil. Os *gaps* do alinhamento foram identificados e *primers* foram desenhados a fim de amplificar a região não coberta pelo sequenciamento do plasmídeo em questão. Após a

amplificação, os produtos foram sequenciados utilizando o método de Sanger e as sequências geradas foram utilizadas para a determinação da sequência circularizada do plasmídeo. A sequência completa foi depositada no banco de dados Genbank sob número de acesso KY781949.

4.4 RESULTADOS

4.4.1 Análise dos genomas

As estirpes de *K. pneumoniae* positivas para produção de beta-lactamase de espectro estendido foram classificadas nos *sequence types* (STs) ST15, ST147 e ST307. O tamanho dos genomas variou de 5.540.827 pares de bases (pb) a 5.622.065, tamanhos compatíveis com dados de genomas completos da espécie *K. pneumoniae* depositados no Genbank. A cepa pertencente ao ST147 apresentou coprodução de duas variantes de ESBL, apresentando os genes *bla*_{CTX-M-15} e *bla*_{CTX-M-8}. Os outros isolados apresentaram o gene *bla*_{CTX-M-15}. Além dos genes codificadores de ESBL, os três isolados apresentaram vários outros genes de resistência a beta-lactâmicos. Esses dados estão apresentados na tabela 5.

Em relação ao número de regiões codificadoras (CDS), os genomas das cepas apresentaram entre 5230 e 5386 CDS, a distribuição desses genes em relação às funções está representada nas figuras 8 e 9.

Foi realizado um alinhamento das sequências das três cepas com o genoma de referência da cepa de *K. pneumoniae* MGH 78578 (ATCC 700721) (Acesso Genbank CP000647), um isolado clínico humano com fenótipo de multirresistência. Grande parte das proteínas codificadas pelas três cepas aqui investigadas apresentou alto grau de similaridade com o isolado humano (Figura 10). A maioria das regiões que apresentaram valor menor que 50% de identidade proteica foram regiões de genoma acessório, como profagos, transposons e sequências de inserção.

As sequências das cepas pertencentes aos ST15 e ST147 foram alinhadas com genomas completos de isolados clínicos da Ásia e Estados Unidos (Figura 11). O genoma da cepa ST147 apresentou 94% de similaridade com a sequência do cromossomo de um isolado clínico humano dos Estados Unidos.

Tabela 5. Características do genoma dos três isolados de *K. pneumoniae*.

Característica	Isolados		
	Kp41	Kp58	Kp137
Hospedeiro (infecção)	<i>Amazona aestiva</i> (secreção nasal)	<i>Psittacara leucophthalmus</i> (orofaringe)	<i>Amazona aestiva</i> (sepsis)
Tamanho genoma	5,622,065 pb	5,540,827 pb	5,557,301 pb
Regiões codificadoras (CDS)	5386	5230	5343
RNAs	69	59	47
Conteúdo GC	57.1%	57.2%	57.1%
Sequence type	ST147	ST15	ST307
Plasmídeos – grupo (tamanho)	FII(K) (~220kb) L/M (~70kb) ColRNAI (3kb)	FII(K)-FIA-FIB (~250kb)	FIB (K) (~145kb) NT (48kb) ColRNAI (4kb)
Cápsula	K64	K60	K173
Genes de resistência			
Aminoglicosídeos	<i>aac(3)-VIa</i> , <i>aph(3'')-Ib</i> , <i>aac(3)-IIa</i> , <i>aadA1</i> , <i>aph(6)-Id</i>	<i>aph(3'')-Ib</i> , <i>aac(6')Ib-cr</i> , <i>aph(6)-Id</i> , <i>aadA2</i>	<i>aac(3)-IIa</i> , <i>aph(3'')-Ib</i> , <i>aac(6')Ib-cr</i> , <i>aph(6)-Id</i>
Beta-lactâmicos	<i>blaSHV-11</i> , <i>blaCTX-M-8</i> , <i>blaCTX-M-15</i> , <i>blaTEM-1A</i> , <i>blaOXA-1</i> , <i>blaOXA-9</i>	<i>blaSHV-28</i> , <i>blaCTX-M-15</i> , <i>blaTEM-1B</i> , <i>blaOXA-1</i>	<i>blaSHV-28</i> , <i>blaCTX-M-15</i> , <i>blaTEM-1B</i> , <i>blaOXA-1</i>
Quinolonas	<i>qnrE</i> , <i>oqxAB</i>	<i>aac(6')Ib-cr</i> , <i>oqxAB</i>	<i>aac(6')Ib-cr</i> , <i>oqxAB</i> , <i>qnrB66</i>
Fosfomicina	<i>Fossa</i>	<i>fosA</i>	<i>Fossa</i>
Tetraciclina	<i>tet(A)</i>	-	
Sulfas	<i>sul1</i> , <i>sul2</i>	<i>sul1</i> , <i>sul2</i>	<i>sul2</i>
Trimetoprim	<i>dfrA14</i>	<i>dfrA14</i> , <i>dfrA12</i>	<i>dfrA14</i>
Fenicóis	<i>catB4</i>	<i>catA1</i> , <i>catB4</i>	<i>catB4</i>

Já o isolado pertencente ao ST15 apresentou 96% de identidade nucleotídica com um isolado clínico humano da Ásia. Em ambos os alinhamentos foi possível observar um alto grau de conservação e sintonia gênica entre os cromossomos (Figura 12). A cepa pertencente ao ST307 não foi alinhada com uma cepa de mesmo ST por não existirem depósitos de genoma completo dessa linhagem no Genbank.

Figura 8. Representação da distribuição das regiões codificadoras no genoma da cepa Kp41 em relação à função dos genes (ST147).

Fonte: (DAVIES, 2017).

Figura 9. Representação da distribuição das regiões codificadoras no genoma da cepa Kp58 em relação à função dos genes (ST15).

Fonte: (DAVIES, 2017).

Figura 10. Representação da distribuição das regiões codificadoras no genoma da cepa Kp137 em relação à função dos genes (ST307).

Fonte: (DAVIES, 2017).

Figura 11. Representação do alinhamento dos genomas das três cepas de *K. pneumoniae* isoladas de psitacídeos utilizando como referência de comparação o genoma da cepa GH 78578 (ATCC 700721). O círculo interno representa o cromossomo da cepa Kp137, o círculo do meio o cromossomo da cepa Kp41 e o círculo externo o da cepa Kp58.

Fonte: (DAVIES, 2017).

Figura 12. Representação linear do alinhamento do genoma das cepas Kp41 e Kp58 com genomas de isolados clínicos de *K. pneumoniae*. Regiões em vermelho intenso indicam 100% de similaridade. Em vermelho claro estão representadas regiões com similaridade de 95-85%. Ausência de identidade de nucleotídeos é representado em branco.

Fonte: (DAVIES, 2017).

4.4.2 Plasmídeos e ambiente genético de *bla*_{CTX-M}

Através da correlação das análises dos dados do sequenciamento, conjugação e S1-PFGE foi possível estabelecer a localização dos genes *bla*_{CTX-M} e o tamanho dos plasmídeos. Os três isolados apresentaram o gene *bla*_{CTX-M-15} em plasmídeos grandes do grupo IncF (FII, FIA e/ou FIB). Esses plasmídeos tinham o peso molecular entre 250 e 145 kb (Figura 13).

Figura 13. Géis de PFGE após digestão com S1 nuclease. Mk = Lambda PFG Marker.

Fonte: (DAVIES, 2017).

Nos ensaios de conjugação foi possível transferir todos os plasmídeos IncF e o plasmídeo L/M para a cepa receptora *E. coli* C600. A tipagem pelo esquema de pMLST dos plasmídeos IncF mostrou que os plasmídeos das cepas Kp41 e Kp58 possuíam plasmídeos classificados como K9:A-B- e K5:A10:B-. O plasmídeo IncFIB da cepa Kp137 não era tipável por esse método, assim como o *replicon* FIB do plasmídeo da cepa Kp58. Esses resultados estão demonstrados na tabela 6.

Tabela 6. Características dos plasmídeos nas cepas doadoras e transconjugantes.

Cepa	Plasmídeos	pMLST	Tamanhos	CIM (mg/L)									
				CTX	CAZ	CPM	TIO	AMI	GEN	ENR	MAR	NAL	CIP
Kp41	FII(K), L/M, ColRNAI	-	220kb 70kb 3kb	>128	128	>128	>128	8	>128	>16	>16	>528	>16
Tc-41a	FII(K)	K9:A-B-	220kb	>128	32	>128	>128	4	32	0,03	0,03	2	0,03
Tc-41b	L/M	IncM1	70Kb	>128	2	>128	>128	32	64	1	0,5	16	0,25
Kp58	FII(K)-FIA-FIB	-	250kb	>128	128	>128	>128	8	16	>16	>16	>528	>16
Tc-58a	FII(K)-FIA-FIB	K5:A10:B-	250kb	>128	64	>128	>128	8	8	0,03	0,03	2	0,03
Kp137	FIB(K)	-	145Kb 48kb 4kb	>128	128	>128	>128	128	>128	>16	>16	>528	>16
Tc-137a	FIB(K)	NT*	145Kb	>128	64	>128	>128	8	64	0,03	0,03	2	0,03
EC-C600	-	-	-	0,125	0,5	0,125	0,125	4	2	0,03	0,03	2	0,03

*NT= Não tipável.

NAL: ácido nalidíxico, CAZ: ceftazidima, AMI: amicacina, GEN: gentamicina, CTX: cefotaxima, ENR: enrofloxacina, CPM: cefepima, TIO: ceftiofur, MAR: marbofloxacina, CIP: ciprofloxacina.

Em relação ao ambiente genético dos genes *bla*_{CTX-M}, no plasmídeo IncM1 o gene *bla*_{CTX-M-8} estava inserido em um transposon composto com duas cópias de IS26 intactas e uma cópia de IS10 truncada em uma região acessória de 3,560 pares de base, denominada RR-2 (Figura 14B). Além desta beta-lactamase, este plasmídeo continha outra região acessória de 11,747 pares de base composta de

cinco genes de resistência a beta-lactâmicos (*bla*_{TEM-1A}, *bla*_{OXA-9}), aminoglicosídeos (*aac*(6')-Ib, *aadA1*) e quinolonas (*qnrE1*). Essa região foi denominada RR-1 (Figura 14A).

Em duas cepas o gene *bla*_{CTX-M-15} fazia parte de um região de 9,924 pb que com doze CDS e continha ainda os genes de resistência *bla*_{OXA-1}, *sul1* e *aph*(3') (Figura 14C). Na outra cepa positiva para *bla*_{CTX-M-15}, O gene estava entre uma cópia de *ISEcp1* e um ORF, como no final de região de *bla*_{CTX-M-15} dos outros dois isolados.

Figura 14. Representação do ambiente genético de CTX-M-15, CTX-M-8 e região de multirresistência em cepas de *K. pneumoniae* isoladas de psitacídeos.

Fonte: (DAVIES, 2017).

4.4.3 Análise da sequência completa do plasmídeo pKp41M

O plasmídeo do grupo IncM1, portador de *bla*_{CTX-M-8} e outros cinco genes de resistência foi circularizado utilizando as sequências do genoma da cepa Kp41 e posteriormente PCR e sequenciamento convencional de Sanger, sendo denominado pKp41M.

Este plasmídeo possui 70,354 pares de bases, conteúdo de GC de 51% e 91 regiões codificadoras (Fig. 15). O genoma principal de pKp41M consiste em 55.047 pb, com genes que codificam as funções de replicação, manutenção e transferência de plasmídeos e duas regiões de resistência que codificam elementos móveis e genes de resistência RR-1 (11,747 pb) e RR-2 (3,560), já descritas acima (Figura

14A e 14B). A região de RR-1 é constituída pelo transposon Tn1331, truncada por uma inserção de 4,108 pb de *ISEcp1-qnrE1-araJ-Δahp*. Tanto as inserções de Tn1331 como as inserções *ISEcp1-qnrE1* têm repetições invertidas intactas.

Utilizando a ferramenta BLAST e o banco de dados do NCBI foi possível verificar que pKp41M tem uma alta identidade com pKp145-11b, um plasmídeo proveniente de um isolado clínico humano de *K. pneumoniae* do Brasil (Acesso Genbank KX118608, dados não publicados). O alinhamento das sequências desses dois plasmídeos mostrou que ambos compartilham 96% de identidade de nucleotídeos (Figura 16).

Figura 15. Mapa circular da sequência de DNA completa de pKp41M. Os dois círculos maiores externos representam as regiões codificadoras (CDS), a ponta das setas violetas indicam a direção da transcrição dos genes. Os dois círculos seguintes representam o conteúdo de bases (GC em preto, GC+ em verde e GC- em roxo).

Fonte: (DAVIES, 2017).

Figura 16. Mapa genético linear do plasmídeo pKp41M I e comparação com pKp145-11b e Tn1331. As CDS são indicadas por setas apontando na direção da transcrição. As setas verdes indicam qnrE1 e blaCTX-M-8, setas azuis indicam outros genes de resistência, as setas amarelas indicam genes relacionados a elementos móveis, as setas roxas indicam genes de replicação e manutenção do plasmídeo, as setas de cor cinza claro indicam genes relacionados à transferência e mobilização, as setas vermelhas indicam outros genes com funções conhecidas e as setas brancas indicam genes com funções desconhecidas. As duas regiões de resistência são indicadas por linhas pontilhadas.

Fonte: (DAVIES, 2017).

4.5 DISCUSSÃO

Klebsiella pneumoniae é um patógeno emergente responsável por infecções em humanos no mundo todo. Muita atenção tem sido dada a cepas multirresistentes deste agente, já que em isolados apresentando esse perfil, as opções de tratamento são escassas. Infecções em animais causadas por *K. pneumoniae* são pouco relatadas e pouco se conhece sobre o impacto desse agente na medicina veterinária.

Alguns grupos clonais de *K. pneumoniae* são considerados pandêmicos e responsáveis por infecções nosocomiais e adquiridas na comunidade em todo mundo. Dentre esses grupos, o mais simbólico é o CC258 (complexo clonal 258), grupo produtor de CTX-M-15 e KPC-2 endêmico na América do Sul. Outros clones pandêmicos identificados como muito prevalentes em infecções humanas são ST23, ST147, ST14, ST15, ST48, ST307, ST387 e ST231 (DAMJANOVA et al., 2008; RODRIGUES et al., 2014; BONURA et al., 2015; HOLT et al., 2015; MARKOVSKA et al., 2017; TURTON et al., 2017).

Curiosamente, dentre os isolados produtores de ESBL aqui analisados, as três linhagens identificadas, ST15, ST147 e ST307 são reconhecidas como multirresistentes e causadoras de infecções em humanos.

A linhagem ST147 é normalmente encontrada em estudos epidemiológicos dentre isolados de *K. pneumoniae* produtores de ESBL e carbapenemases provenientes de infecções hospitalares na América, Europa, Ásia e África (PEIRANO et al., 2014; ROCHA et al., 2014; RODRIGUES et al., 2014, 2016; JAIDANE et al., 2017; NAHID; ZAHRA; SANDEGREN, 2017; TURTON et al., 2017). Existem relatos recentes desse ST relacionado a cepas produtoras de CTX-M-15 dentre isolados de infecções urinárias em cães e gatos na Europa e Ásia, no entanto não foram descritas na literatura, até o presente momento, infecções ou isolamentos em aves por esse grupo clonal (HARADA et al., 2016; OVEJERO et al., 2017).

O isolado pertencente ao ST147, denominado Kp41, carregava o gene *bla*_{CTX-M-15}, assim como a maioria dos relatos em todo mundo. Essa cepa também era coprodutora de CTX-M-8. No entanto, não existem dados na literatura sobre

produção de CTX-M-8 por este ST. Este dado indica que cepas ST147 podem adquirir outras classes de CTX-M, não sendo exclusivamente produtoras de CTX-M-15. Outro dado interessante é que em muitos relatos essa linhagem é multirresistente, dado que corrobora com nossos achados, visto que dentre as três cepas isoladas, Kp41 foi a que portava maior quantidade de genes de resistência, sendo produtora de cinco tipos de beta-lactamases distintas. Isso sugere uma tendência dessa linhagem em adquirir genes de resistência.

Os dados do alinhamento do genoma da estirpe Kp41 ao genoma completo de uma estirpe de origem humana ST147 dos EUA mostraram que esses isolados compartilham 96% de identidade nucleotídica, não sendo encontradas características que indicassem a adaptação do patógeno a um hospedeiro não mamífero (CONLAN et al., 2016). Esses resultados sugerem que cepas humanas podem estar sendo transmitidas aos animais pelo convívio e proximidade, levando-se em conta que linhagens de *K. pneumoniae* isoladas de humanos não são encontradas em animais silvestres ou animais que não tem proximidade com humanos.

Outra linhagem encontrada foi ST15, linhagem que já foi extensivamente reportada como patógeno nosocomial e infecções extra hospitalares no mundo todo (DAMJANOVA et al., 2008; SÁNCHEZ-ROMERO et al., 2012; PEIRANO et al., 2014; RODRIGUES et al., 2014; JAIDANE et al., 2017; MARKOVSKA et al., 2017). Diferente dos outros STs aqui relatados, ST15 já foi identificado em várias espécies de animais, porém não em aves (HAENNI et al., 2012; HARADA et al., 2012; DONATI et al., 2014; EWERS et al., 2014; SILVA, 2016).

Para a realização do alinhamento dos genomas de cepas ST15, foi selecionada uma cepa humana que não tivesse nenhuma relação epidemiológica ou geográfica (STOESSER et al., 2014). Mesmo assim o alinhamento mostrou que o cromossomo do isolado Kp58 apresentou 94% de similaridade de nucleotídeos com a cepa isolada de um surto em um hospital na Ásia. No entanto, os plasmídeos presentes em ambas estirpes apresentaram pouca similaridade, sendo que a cepa asiática continha um número maior de plasmídeos e com diferentes genes de resistência.

O isolado Kp137 pertence ao ST307, disseminada na Europa e comumente associada com a produção de CTX-M-15 e KPC-3 (BONURA et al., 2015; VILLA et al., 2016, 2017). Este ST também já foi relatado na América do Sul, Ásia e África, sempre descrito em estudos de isolados nosocomiais (MANSOUR et al., 2015; KIM et al., 2017; SAAVEDRA et al., 2017). O único relato de *K. pneumoniae* ST307 em animais é a descrição refere-se ao isolamento dessa linhagem em um cão com infecção urinária no Japão (HARADA et al., 2012).

As variantes de ESBL aqui encontradas foram CTX-M-8 e CTX-M-15, sendo que as três cepas apresentavam *bla*_{CTX-M-15}. Dentre os diversos tipos de ESBL encontrados em Enterobacteriaceae, o grupo CTX-M é o mais prevalente no mundo (NASEER; SUNDSFJORD, 2011; ZHAO; HU, 2013).

Segundo a *Beta-lactamase database* (BLDB) existem 204 variantes de CTX-M até o momento (Acesso em 10.12.2017) (NAAS et al., 2017). Dentre todas as variantes, a enzima CTX-M-15 é a mais disseminada em todo o mundo, sendo encontrada em patógenos Gram-negativos isolados de humanos, animais e ambiente (NASEER; SUNDSFJORD, 2011; ZHAO; HU, 2013). Acompanhando essa tendência mundial, no Brasil a variante mais comum em isolados humanos de *K. pneumoniae* é CTX-M-15 (ROCHA; PINTO; BARBOSA, 2016).

O relato de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de CTX-M-15 descritas em animais no Brasil restringem-se ao isolamento do agente em suínos comerciais, incluindo um isolado pertencente ao ST340 (CC258) (CERDEIRA et al., 2016; SILVA, 2016). Não existem dados na literatura sobre *K. pneumoniae* produtora de CTX-M isolados em animais de companhia no Brasil, mas em uma coleção de enterobactérias isoladas de animais de companhia do Laboratório de Medicina Aviária da FMVZ-USP CTX-M-15 é a enzima ESBL mais encontrada (dados não publicados).

Uma particularidade de CTX-M-15 em relação à maioria das variantes CTX-M é o fenótipo de resistência a ceftazidima (ZHAO; HU, 2013; HE et al., 2015). Essa enzima tem a capacidade catalítica mais eficiente contra esse antibiótico quando comparada às outras variantes, o que resulta em valores de CIM mais altos (HE et al., 2015). Esse fenômeno pôde ser observado nos valores das CIM de ceftadizima

dos nossos transconjugantes, quando comparamos com o transconjugante portador de CTX-M-8 (Tabela 6).

A variante CTX-M-8 é endêmica do Brasil, sendo descrita pela primeira vez por Bonnet et al. (2000) em um isolados de *Enterobacter* spp. e *Citrobacter amalonaticus* em isolados nosocomiais do Rio de Janeiro. No nosso trabalho essa variante estava inserido em um transposon composto com uma cópia de IS10 e duas cópias de IS26, ambiente genético encontrado por Dropa et al. (2016) em cepas de *E. coli* e *K. pneumoniae* isoladas de esgoto da cidade de São Paulo (DROPA et al., 2016). Em um trabalho realizado com *E. coli* isoladas de carne de frango importadas do Brasil pela China, Norizuki et al. (2017) também relataram este mesmo ambiente genético para *bla*_{CTX-M-8} inseridos em plasmídeos do tipo IncI1 (NORIZUKI et al., 2017). No trabalho de Dropa et al. esse transposon composto contendo *bla*_{CTX-M-8} estava presente em plasmídeos das família IncI1 e em IncM1, assim como no nosso plasmídeo (DROPA et al., 2016).

No ambiente genético de *bla*_{CTX-15} das três cepas *K. pneumoniae* isoladas de psitacídeos, o gene tinha uma cópia intacta de *ISEcp1* a jusante e um ORF (*Open read frame*), denominado ORF477, sendo essa estrutura a mais relatada como ambiente genético de CTX-M-15 no mundo (NASEER; SUNDSFJORD, 2011; ZHAO; HU, 2013). Além disso, duas cepas apresentavam próximo a *bla*_{CTX-15} um integron contendo os genes de resistência *sul1* e *aph(3')*, além de uma cópia da beta-lactamase *bla*_{OXA-1}. Em buscas pelo Genbank, encontramos sequencias que apresentaram 100% de identidade de nucleotídeos com a plataforma genética de 9.924 pares de base descrita aqui. Curiosamente, esse ambiente genético estava presente em plasmídeos de *K. pneumoniae* do grupo IncF(K) da Colômbia, Estados Unidos e Austrália (Acesso Genbank CP024566, CP024516, CP016925 e CP010390, dados não publicados).

Em nossos isolados o gene *bla*_{CTX-M-15} também estava presente em plasmídeos IncF(K) classificados em diferentes tipos de *replicon*: K9:A-B-, K5:A10:B- e IncFIB (não tipável por pMLST). Plasmídeos do grupo IncF e IncN são os principais disseminadores de *bla*_{CTX-15} em todo mundo (CARATTOLI, 2009, 2013). No entanto, no relato sobre *Klebsiella* produtora de CTX-M-15 no Brasil isolada de

hospedeiro animal, o gene *bla*_{CTX-15} estava inserido em um plasmídeo da família IncR (CERDEIRA et al., 2016).

A análise comparativa da sequência do plasmídeo IncM1 portador de CTX-M-8 mostrou que o mesmo tinha alta similaridade com um plasmídeo de um isolado clínico humano de *K. pneumoniae* do Brasil. Plasmídeos IncM1 portando *bla*_{CTX-M-8} também foram descritos por Dropa et al. (2016) em cepas de *K. pneumoniae* e *Enterobacter cloacae* provenientes da água de estações de tratamento de esgoto em São Paulo. A família de plasmídeos IncM é frequentemente encontrada em cepas clínicas de Enterobacteriaceae e associada a genes ESBL (*bla*_{CTX-M-3}, *bla*_{SHV-5}), carbapenemases (*bla*_{KPC}, *bla*_{IMP}, *bla*_{NDM}, and *bla*_{OXA-48}), beta-lactamases do tipo AmpC (*bla*_{FOX-7}), assim como genes codificadores de 16s rRNA metiltransferases, que conferem resistência a todos aminoglicosídeos de importância clínica (CARATTOLI et al., 2015).

Além de *bla*_{CTX-M-8}, o plasmídeo pKp41M continha uma região de resistência composto pelo Tn1331 truncado por um módulo de 4,108 pares de bases contendo *ISEcp1-qnrE1-araJ-Δahp*. O gene *qnrE1*, que confere resistência às quinolonas, foi recém descoberto por Albornoz et al. (2017) em um isolado clínico humano de *K. pneumoniae* na Argentina (ALBORNOS et al., 2017). Sugere-se que esse gene tenha sido mobilizado do cromossomo de *Enterobacter* spp. por *ISEcp1* a um plasmídeo e então o plasmídeo tenha sido mobilizado para *K. pneumoniae*. O que reforça essa hipótese é o fato dos dois genes adjacentes (*araJ* e *ahp*) serem genes cromossomais de *Enterobacter* spp.

O ambiente genético encontrado por Albornoz et al. (2017) contém apenas *ISEcp1-qnrE1-araJ-Δahp*, não estando relacionado ao Tn1331, como no plasmídeo pKp41M. O Tn1331 é um transposon descrito por Tolmasky e Croa em 1987 em um isolado humano de *K. pneumoniae* da Argentina (TOLMASKY; CROSA, 1987). A sequência original de Tn1331 (Acesso Genbank AF479774) é composta por 7993 pares de bases que codificam uma transposase e uma resolvase, enzimas utilizadas na mobilização do transposon, e cinco genes de resistência que conferem resistência a gentamicina, amicacina estreptomicina e ampicilina (*bla*_{TEM-1A}, *bla*_{OXA-9}, *aac(6')-Ib*, *aadA1*). No plasmídeo pKp41M o Tn1331 possui ainda uma inserção que contém *ISEcp1*, *qnrE1* e o resquício de genes cromossomais de *Enterobacter* spp.,

o que demonstra uma evolução desse transposon ao adquirir um novo gene de resistência.

Outro dado interessante é o fato de pKp41M apresentar alta similaridade com pKp145-11b, um plasmídeo proveniente de um isolado clínico humano de *K. pneumoniae* do Brasil (Acesso Genbank KX118608, dados não publicados). Isso indica a presença de um plasmídeo epidêmico que confere multirresistência circulando em *K. pneumoniae* de humanos e animais no Brasil.

4.6 CONCLUSÕES

Os dados aqui demonstrados indicam a infecção de psitacídeos por estirpes de *K. pneumoniae* produtoras de CTX-M-15 e CTX-M-8, pertencentes às linhagens mundialmente disseminadas (ST15, ST147, ST307) e responsáveis por infecções em humanos.

As estirpes aviárias de *K. pneumoniae* contém plasmídeos semelhantes aos observados em isolados humanos, de indivíduos que apresentaram infecções nosocomiais. Destaca-se a presença de um plasmídeo epidêmico multirresistente do grupo IncM1, que apresentou alta similaridade com plasmídeo de cepa clínica humana.

5 CONCLUSÃO GERAL

Os dados deste trabalho revelam que aves de companhia, mantidas em ambiente domiciliado, apresentam infecções respiratórias por estirpes virulentas e resistentes de *Klebsiella* spp.

A similaridade genética entre os isolados de *K. pneumoniae* de origem humana e aviária alertam para a possibilidade de infecção cruzada entre animais e proprietários, com possibilidade de as aves atuarem como reservatórios de cepas virulentas e multirresistentes. Estes dados sugerem o potencial antropozoonótico do agente e destacam a relevância clínica para humanos e animais.

REFERÊNCIAS

ACAR, J. F.; GOLDSTEIN, F. W. Trends in bacterial resistance to fluoroquinolones. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 24 Suppl 1, n. November, p. S67–S73, 1997.

AHER, T.; ROY, A.; KUMAR, P. Molecular detection of virulence genes associated with pathogenicity of *Klebsiella* spp. isolated from the respiratory tract of apparently healthy as well as sick goats. **Israel Journal of Veterinary Medicine**, v. 67, n. 4, p. 249–252, 2012.

ALBERTI, S.; MARQUES, G.; CAMPRUBI, S.; MERINO, S.; TOMAS, J. M.; VIVANCO, F.; BENEDI, V. J. Clq Binding and Activation of the Complement Classical Pathway by *Klebsiella pneumoniae* Outer Membrane Proteins. **Infection and Immunity**, v. 61, n. 3, p. 852–860, 1993.

ALBORNOS, E.; TIJET, N.; DE BELDER, D.; GOMEZ, S.; MARTINO, F.; CORSO, A.; MELANO, R. G.; PETRONI, A. *qnrE1*, a Member of a New Family of Plasmid-located Quinolone Resistance Genes Originated from the Chromosome of *Enterobacter* spp. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, n. February, p. AAC.02555-16, 2017. Disponível em: <<http://aac.asm.org/lookup/doi/10.1128/AAC.02555-16>>.

ARAKAWA, Y.; OHTA, M.; WACHAROTAYANKUN, R.; MORI, M.; KIDO, N.; ITO, H.; KOMATSU, T.; SUGIYAMA, T.; KATO, N. Biosynthesis of *Klebsiella* K2 Capsular Polysaccharide in *Escherichia coli* HB101 Requires the Functions of *rmpA* and the Chromosomal *cps* Gene Cluster of the Virulent Strain *Klebsiella pneumoniae* Chedid (O1 : K2). **Infection and Immunity**, v. 59, n. 6, p. 2043–2050, 1991.

BONNET, R. Growing group of extended spectrum: the CTX-M enzymes. **Antimicrob Agent Chemotherapy**, v. 48, n. 1, p. 1–14, 2004.

BONNET, R.; SAMPAIO, J. L. M.; LABIA, R.; CHAMPS, C. D. E.; SIROT, D.; CHANAL, C.; SIROT, J. A Novel CTX-M B-Lactamase (CTX-M-8) in Cefotaxime-Resistant Enterobacteriaceae Isolated in Brazil. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 44, n. 7, p. 1936–1942, 2000.

BONNIN, R. A.; JOUSSET, A. B.; URVOY, N.; GAUTHIER, L.; TLILI, L.; CRETON, E.; COTELLON, G.; ARTHUR, F.; DORTET, L.; NAASA, T. Detection of GES-5 Carbapenemase in *Klebsiella pneumoniae*, a Newcomer in France. **Antimicrob Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 3, p. 10–13, 2017.

BOOM, R.; SOL, C.J.A.; SALIMANS, M.M.M. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, p. 459-453, 1990.

BONURA, C.; GIUFFRÈ, M.; ALEO, A.; FASCIANA, T.; DI BERNARDO, F.; STAMPONE, T.; GIAMMANCO, A.; PALMA, D. M.; MAMMINA, C.; GERACI, D. M.; GRAZIANO, G.; SAPORITO, L.; SAPORITO, M. A.; SODANO, C.; VERDE, M. S.; BALDI, M. T.; DONATO, E.; AMATO, T.; IMMORDINO, R.; DISTEFANO, S. An update of the evolving epidemic of bla_{KPC} carrying *Klebsiella pneumoniae* in Sicily, Italy, 2014: Emergence of multiple Non-ST258 Clones. **PLoS ONE**, v. 10, n. 7, p. 1–9, 2015.

BRADFORD, P. Extended spectrum betalactamase in the 21 century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistant threat. **Clinical Microbiol Rev**, v. 14, n. 4, p. 933–951, 2001.

BRISSE, S.; FEVRE, C.; PASSET, V.; ISSENHUTH-JEANJEAN, S.; TOURNEBIZE, R.; DIANCOURT, L.; GRIMONT, P. Virulent clones of *Klebsiella pneumoniae*: identification and evolutionary scenario based on genomic and phenotypic characterization. **PloS one**, v. 4, n. 3, p. e4982, jan. 2009. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2656620&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 12 out. 2014.

BRISSE, S.; PASSET, V.; HAUGAARD, B.; BABOSAN, A.; KASSIS-CHIKHANI, N.; STRUVE, C. wzi Gene Sequencing , a Rapid Method for Determination of Capsular Type for *Klebsiella* Strains. **The Journal of infectious diseases**, v. 51, n. 12, p. 4073–4078, 2013.

BROBERG, C. a; PALACIOS, M.; MILLER, V. L. *Klebsiella*: a long way to go towards understanding this enigmatic jet-setter. **F1000prime reports**, v. 6, n. August, p. 64, jan. 2014. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4126530&tool=pmcentrez>>

z&rendertype=abstract>. Acesso em: 29 set. 2014.

BUSH, K. Bench-to-bedside review: The role of β -lactamases in antibiotic-resistant Gram-negative infections. **Critical Care**, v. 14, p. 224, 2010.

BUSH, K. The ABCD 's of β -lactamase nomenclature. **Journal of Infection Chemotherapy**, v. 19, p. 549–559, 2013a.

BUSH, K. The ABCD's of β -lactamase nomenclature. **Journal of infection and chemotherapy**, v. 19, n. 4, p. 549–59, ago. 2013b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23828655>>. Acesso em: 5 out. 2014.

CANTÓN, R.; GONZÁLEZ-ALBA, J. M.; GALÁN, J. C. CTX-M Enzymes: Origin and Diffusion. **Frontiers in microbiology**, v. 3, n. April, p. 110, jan. 2012. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3316993&tool=pmcentre> z&rendertype=abstract>. Acesso em: 19 jul. 2014.

CANTÓN, R.; MOROSINI, M. I.; MARTIN, O.; DE LA MAZA, S.; DE LA PEDROSA, E. G. G. IRT and CMT β -lactamases and inhibitor resistance. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14, n. SUPPL. 1, p. 53–62, 2008.

CARATTOLI, A. Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 53, n. 6, p. 2227–38, jun. 2009. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2687249&tool=pmcentre> z&rendertype=abstract>. Acesso em: 14 dez. 2013.

CARATTOLI, A. Plasmids and the spread of resistance. **International journal of medical microbiology**, v. 303, n. 6–7, p. 298–304, ago. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23499304>>. Acesso em: 11 dez. 2013.

CARATTOLI, A.; CARATTOLI, A. Resistance Plasmid Families in Resistance Plasmid Families in Enterobacteriaceae □. v. 53, n. 6, 2009.

CARATTOLI, A.; SEIFFERT, S. N.; SCHWENDENER, S.; PERRETEN, V.; ENDIMIANI, A. Differentiation of IncL and IncM plasmids associated with the spread of clinically relevant antimicrobial resistance. **PLoS ONE**, v. 10, n. 5, p. 1–14, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0123063>>.

CARTER, G. .; WISE, D. J. **Essential of Veterinary Bacteriology and Mycology 6th Ed**, 2004. .

CARVER, T.; HARRIS, S. R.; BERRIMAN, M.; PARKHILL, J.; MCQUILLAN, J. A. Artemis: An integrated platform for visualization and analysis of high-throughput sequence-based experimental data. **Bioinformatics**, v. 28, n. 4, p. 464–469, 2012.

CERDEIRA, L.; SILVA, K. C.; FERNANDES, M. R.; IENNE, S.; DE SOUZA, T. A.; DE OLIVEIRA GARCIA, D.; MORENO, A. M.; LINCOPAN, N. Draft genome sequence of a CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* sequence type 340 (clonal complex 258) isolate from a food-producing animal. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 7, p. 67–68, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jgar.2016.07.012>>.

CHUNG, D. C. H. and Y. **Veterinary Microbiology.Pdf**, 1999. .

CDC. Vital signs: carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. **MMWRMorb Mortal Wkly Rep**, 62:165–170, 2013.

CLSI. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; approved standard. VET01-A4. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, 4th Ed. ed.Wayne, PA, USA, 2013.

CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, document M100-S23. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, Twenty-thi ed.Wayne, PA, USA. 2013.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria from Animals, Approved Standard, M31-A3. **Clinical Laboratory Standard Institute**, Wayne, Pa, USA, 3rd edition, 2008.

CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria from Animals, Approved Standard, M31-A3**. 3rd. ed. [s.l: s.n.]

CONLAN, S.; LAU, A. F.; PALMORE, T. N.; FRANK, K. M.; SEGRE, J. A. Complete Genome Sequence of a *Klebsiella pneumoniae* Strain Carrying bla NDM-1 on a Multidrug Resistance Plasmid. **Genome Announcements**, v. 4, n. 4, p. e00664-16, 2016. Disponível em: <<http://genomea.asm.org/lookup/doi/10.1128/genomeA.00664-16>>.

CUNHA, M. P. V.; LINCOPAN, N.; CERDEIRA, L.; ESPOSITO, F.; DROPA, M.; FRANCO, L. S.; MORENO, A. M.; KNÖBL, T. Coexistence of CTX-M-2, CTX-M-55,

CMY-2, FosA3, and QnrB19 in Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* from Poultry in Brazil. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 61, n. 4, p. 1–3, 2017.

DAMJANOVA, I.; TÓTH, Á.; PÁSZTI, J.; HAJBEL-VÉKONY, G.; JAKAB, M.; BERTA, J.; MILCH, H.; FÜZI, M. Expansion and countrywide dissemination of ST11, ST15 and ST147 ciprofloxacin-resistant CTX-M-15-type β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* epidemic clones in Hungary in 2005 - The new “MRSA”? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 62, n. 5, p. 978–985, 2008.

DAVIES, Y. M.; CUNHA, M. P. V.; OLIVEIRA, M. G. X.; OLIVEIRA, M. C. V.; PHILADELPHO, N.; ROMEIRO, D. C.; MILANELO, L.; GUIMARAES, M. B.; FERREIRA, A. J. P.; MORENO, A. M.; SA, L. R. M.; KNOBL, T. Virulence and antimicrobial resistance of *Klebsiella pneumoniae* isolated from passerines and psittacine birds. **Avian pathology**, v. 9457, n. February, p. 1–28, 2016.

DE CÁSSIA ANDRADE MELO, R.; DE BARROS, E. M. R.; LOUREIRO, N. G.; DE MELO, H. R. L.; MACIEL, M. A. V.; SOUZA LOPES, A. C. Presence of fimH, mrkD, and irp2 Virulence Genes in KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolates in Recife-PE, Brazil. **Current microbiology**, v. 1, p. 824–831, 2 ago. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25085544>>. Acesso em: 2 out. 2014.

DONATI, V.; FELTRIN, F.; HENDRIKSEN, R. S.; SVENDSEN, C. A.; CORDARO, G.; GARCÍA-FERNÁNDEZ, A.; LORENZETTI, S.; LORENZETTI, R.; BATTISTI, A.; FRANCO, A. Extended-spectrum-beta-lactamases, AmpC beta-lactamases and plasmid mediated quinolone resistance in *klebsiella* spp. from companion animals in Italy. **PloS one**, v. 9, n. 3, p. e90564, jan. 2014. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3942433&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 10 jun. 2014.

DORRESTEIN, G. M.; BUITELAAR, M. N.; VAN DER HAGE, M. H.; ZWART, P. Evaluation of a bacteriological and mycological examination of psittacine birds. **Avian diseases**, v. 29, n. 4, p. 951–62, 1985.

DRAGO, L.; NICOLA, L.; MATTINA, R.; DE VECCHI, E. In vitro selection of resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. at in vivo fluoroquinolone concentrations. **BMC microbiology**, v. 10, p. 119–126, 2010.

DROPA, M. **Disseminação de resistência a antimicrobianos em cepas clínicas e ambientes de Enterobacteriaceae: identificação e mapeamento do ambiente genético de genes codificadores de ESBL**. 2012. 2012.

DROPA, M.; LINCOPAN, N.; BALSALOBRE, L. C.; OLIVEIRA, D. E.; MOURA, R. A.; FERNANDES, M. R.; DA SILVA, Q. M.; MATTÉ, G. R.; SATO, M. I. Z.; MATTÉ, M. H. Genetic background of novel sequence types of CTX-M-8- and CTX-M-15-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from public wastewater treatment plants in São Paulo, Brazil. **Environmental Science and Pollution Research**, 2016. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11356-016-6079-5>>.

EL FERTAS-AISSANI, R.; MESSAI, Y.; ALOUACHE, S.; BAKOUR, R. Virulence profiles and antibiotic susceptibility patterns of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from different clinical specimens. **Pathologie-biologie**, v. 61, n. 5, p. 209–16, out. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23218835>>. Acesso em: 12 out. 2014.

EL SALABI, A.; WALSH, T. R.; COUCHANI, C. Extended spectrum β -lactamases, carbapenemases and mobile genetic elements responsible for antibiotics resistance in Gram-negative bacteria. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 39, n. 2, p. 113–122, 2013.

EWERS, C.; STAMM, I.; PFEIFER, Y.; WIELER, L. H.; KOPP, P. A.; SCHENNING, K.; PRENGER-BERNINGHOFF, E.; SCHEUFEN, S.; STOLLE, I.; GÜNTHER, S.; BETHE, A. Clonal spread of highly successful ST15-CTX-M-15 *Klebsiella pneumoniae* in companion animals and horses. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, n. 10, p. 2676–2680, 2014.

FABÍOLA, D.; SANTOS, D. O. S. Características microbiológicas de *Klebsiella pneumoniae* isoladas no meio ambiente hospitalar de pacientes com infecção nosocomial. p. 1–98, 2007.

FÀBREGA, A.; MADURGA, S.; GIRALT, E.; VILA, J. Mechanism of action of and resistance to quinolones. **Microbial Biotechnology**, v. 2, n. 1, p. 40–61, 2009.

FANG, C.-T.; CHUANG, Y.-P.; SHUN, C.-T.; CHANG, S.-C.; WANG, J.-T. A novel virulence gene in *Klebsiella pneumoniae* strains causing primary liver abscess and

septic metastatic complications. **The Journal of experimental medicine**, v. 199, n. 5, p. 697–705, 1 mar. 2004. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2213305&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 16 set. 2014.

FANG, F. C.; SANDLER, N.; LIBBY, S. J. Liver Abscess Caused by magA + *Klebsiella pneumoniae* in North America Liver Abscess Caused by magA $\neq$ *Klebsiella pneumoniae* in North America. v. 43, n. 2, p. 991–993, 2005.

FRIEDLANDER, C. Ueber die Schizomyceten bei der acuten fibrösen Pneumonie. **Virchows Arch. path. Anat.**, v. 87, p. 319–324, 1882.

GALARDINI, M.; BIONDI, E. G.; BAZZICALUPO, M.; MENGONI, A. CONTIGuator: a bacterial genomes finishing tool for structural insights on draft genomes. **Source code for biology and medicine**, v. 6, n. 1, p. 11, 2011. Disponível em: <<http://www.scfbm.org/content/6/1/11>>.

GARBATI, M. A.; GODHAIR, A. I. Al. The growing resistance of *klebsiella pneumoniae*; The need to expand our antibiogram: Case report and review of the literature. **African Journal of Infectious Diseases**, v. 7, n. 1, p. 8–10, 2013.

GERLACH, H. Bacteria. In: **Avian Medicine: principles and application**¹. [s.l.: s.n.]p. 1384.

GODOY, S. N.; MATUSHIMA, E. R. A Survey of Diseases in Passeriform Birds Obtained From Illegal Wildlife Trade in Sao Paulo City , Brazil. **Journal of Avian Medicine and Surgery**, v. 24, n. 3, p. 199–209, 2010.

GOMEZ, S. A.; RAPOPORT, M.; PIERGROSSI, N.; FACCONI, D.; PASTERAN, F.; BELDER, D. De. Infection , Genetics and Evolution Performance of a PCR assay for the rapid identification of the *Klebsiella pneumoniae* ST258 epidemic clone in Latin American clinical isolates. **MEEGID**, v. 44, p. 145–146, 2016.

GUERRA, B.; FISCHER, J.; HELMUTH, R. An emerging public health problem: Acquired carbapenemase-producing microorganisms are present in food-producing animals, their environment, companion animals and wild birds. **Veterinary microbiology**, v. 171, n. 3–4, p. 290–297, 15 fev. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24629777>>. Acesso em: 22 mar. 2014.

GUERRA, M. F. L.; TEIXEIRA, R. H. F.; RIBEIRO, V. L.; CUNHA, M. P. V.; OLIVEIRA, M. G. X.; DAVIES, Y. M.; SILVA, K. C.; SILVA, A. P. S.; LINCOPAN, N.; MORENO, A. M.; KNÖBL, T. Suppurative peritonitis by *Klebsiella pneumoniae* in captive gold-handed tamarin (*Saguinus midas midas*). **Journal of Medical Primatology**, v. 45, n. 1, p. 42–46, 2016.

HAENNI, M.; PONSIN, C.; MÉTAYER, V.; MÉDAILLE, C.; MADEC, J. Y. Veterinary hospital-acquired infections in pets with a ciprofloxacin-resistant CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* ST15 clone. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 3, p. 770–771, 2012.

HANSEN, D. S.; MESTRE, F.; DOME, A.; TOMA, J. M. *Klebsiella pneumoniae* Lipopolysaccharide O Typing: Revision of Prototype Strains and O-Group Distribution among Clinical Isolates from Different Sources and Countries. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 1, p. 56–62, 1999.

HARADA, K.; NIINA, A.; NAKAI, Y.; KATAOKA, Y.; TAKAHASHI, T. Prevalence of antimicrobial resistance in relation to virulence genes and phylogenetic origins among urogenital *Escherichia coli* isolates from dogs and cats in Japan. **American Journal of Veterinary Research**, v. 73, n. 3, p. 409–417, 2012.

HARADA, K.; SHIMIZU, T.; MUKAI, Y.; KUWAJIMA, K.; SATO, T.; USUI, M.; TAMURA, Y.; KIMURA, Y.; MIYAMOTO, T.; TSUYUKI, Y.; OHKI, A.; KATAOKA, Y. Phenotypic and Molecular Characterization of Antimicrobial Resistance in *Klebsiella* spp. Isolates from Companion Animals in Japan: Clonal Dissemination of Multidrug-Resistant Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae*. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. June, p. 1–12, 2016. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fmicb.2016.01021/abstract>>.

HE, D.; CHIOU, J.; ZENG, Z.; LIU, L.; CHEN, X.; ZENG, L.; CHAN, E. W. C.; LIU, J. H.; CHEN, S. Residues distal to the active site contribute to enhanced catalytic activity of variant and hybrid β -lactamases derived from CTX-M-14 and CTX-M-15. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 10, p. 5976–5983, 2015.

HIDASI, H. W.; HIDASI NETO, J.; MORAES, M. D. C.; LINHARES, G. F. C.; JAYME, V. D. S.; ANDRADE, M. A. Enterobacterial Detection and *Escherichia Coli* Antimicrobial Resistance in Parrots Seized From the Illegal Wildlife Trade. **Journal of**

Zoo and Wildlife Medicine, v. 44, n. 1, p. 1–7, 2013.

HIROI, M.; YAMAZAKI, F.; HARADA, T.; TAKAHASHI, N.; IIDA, N.; NODA, Y.; YAGI, M.; NISHIO, T.; KANDA, T.; KAWAMORI, F.; SUGIYAMA, K.; MASUDA, T.; HARAKUDO, Y.; OHASHI, N. Prevalence of Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Food-Producing Animals. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 74, n. 2, p. 189–195, 2012.

HÖGENAUER, C.; LANGNER, C.; BEUBLER, E.; LIPPE, R.; SCHICHO, R.; GORKIEWICZ, G.; KRAUSE, R.; GERSTGRASSER, N.; KREJS, G. J.; HINTERLEITNER, T. A. *Klebsiella oxytoca* as a causative organism of antibiotic-associated hemorrhagic colitis. **The New England Journal of Medicine**, v. 355, p. 2418–26, 2006.

HOLT, K. E.; WERTHEIM, H.; ZADOKS, R. N.; BAKER, S.; WHITEHOUSE, C. A.; DANCE, D. Genomic analysis of diversity, population structure, virulence, and antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae*, an urgent threat to public health. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, p. E3574–E3581, 2015.

IBGE. **Desenvolvimento Sustentável Brasil 2010**. [s.l.: s.n.]

JACOBY, G. A.; JACOBY, G. A. AmpC β -Lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, n. 1, 2009.

JAIDANE, N.; BONNIN, R. A.; MANSOUR, W.; GIRLICH, D.; CRETON, E.; COLLETON, G.; CHAOUCH, C.; BOUJAFFAR, N.; BOUALLEGUE, O.; NAAS, T. Genomic insights into Colistin Resistant *Klebsiella pneumoniae* from a Tunisian teaching hospital. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, n. December, p. AAC.01601-17, 2017. Disponível em: <<http://aac.asm.org/lookup/doi/10.1128/AAC.01601-17>>.

JANBEN, T.; SCHWARZ, C.; PREIKSCHAT, P.; VOSS, M.; PHILIPP, H.; WIELER, L. H. Virulence-associated genes in avian pathogenic (APEC) isolated from internal organs of poultry having died from colibacillosis. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 291, n. 5, p. 371–378, 2001.

JOHNSON, J. R.; STELL, A. L. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise.

The Journal of infectious diseases, v. 181, n. 1, p. 261–72, jan. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10608775>>.

JOHNSON, T. J.; SIEK, K. E.; JOHNSON, S. J.; NOLAN, L. K. DNA Sequence of a ColV Plasmid and Prevalence of Selected Plasmid-Encoded Virulence Genes among Avian *Escherichia coli* Strains. **Journal of bacteriology**, v. 188, n. 2, p. 745–758, 2006.

JUAYANG, A. C.; MAESTRAL, D. G.; DE LOS REYES, G. B.; ACOSIDO, M. A. D.; GALLEGA, C. T.; JUAYANG, A. C.; MAESTRAL, D. G.; DE LOS REYES, G. B.; ACOSIDO, M. A. D.; GALLEGA, C. T. Review on the Antimicrobial Resistance of Pathogens from Tracheal and Endotracheal Aspirates of Patients with Clinical Manifestations of Pneumonia in Bacolod City in 2013. **International Journal of Bacteriology**, v. 2015, n. December 2013, p. 1–5, 2015.

KAKINUMA, Y.; IIDA, H.; SEKIZUKA, T.; USUI, K.; MURAYAMA, O.; TAKAMIYA, S.; MILLAR, B. C.; MOORE, J. E.; MATSUDA, M. Cloning, sequencing and characterization of a urease gene operon from urease-positive thermophilic *Campylobacter* (UPTC). **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, n. 1, p. 252–260, 2007.

KIM, J. O.; SONG, S. A.; YOON, E. J.; SHIN, J. H.; LEE, H.; JEONG, S. H.; LEE, K. Outbreak of KPC-2-producing Enterobacteriaceae caused by clonal dissemination of *Klebsiella pneumoniae* ST307 carrying an IncX3-type plasmid harboring a truncated Tn4401a. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 87, n. 4, p. 343–348, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2016.12.012>>.

KIM, S.-H.; WEI, C.-I.; TZOU, Y.-M.; AN, H. Multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolated from farm environments and retail products in Oklahoma. **Journal of food protection**, v. 68, n. 10, p. 2022–2029, 2005.

KUHNERT, P.; BISGAARD, M.; KORCZAK, B. M.; SCWENDENER, S.; CHRISTENSEN, H.; FREY, J. Identification of animal Pasteurellaceae by MALDI-TOF mass spectrometry. **Journal of Microbiological Methods**, v. 89, n. January, p. 1–7, 2015.

LI, B.; ZHAO, Y.; LIU, C.; CHEN, Z.; ZHOU, D. Molecular pathogenesis of *Klebsiella pneumoniae*. **Future Microbiology**, v. 9, n. 9, p. 1071–1081, 2014. Disponível em:

<<http://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/fmb.14.48>>.

LIGHTFOOT, T.; NACEWICZ, C. L. Comportamento de Psitacídeos. In: **Comportamento de Animais Exóticos de Companhia: aves, répteis e mamíferos**. São Paulo: São Paulo: Roca, 2009. p. 43–87.

LOIKO, M. R.; ABILHEIRA, F. S.; GUEDES, N. R.; PASSOS, D. T.; WEIMER, T. A.; OLIVEIRA, S. J.; ALLGAYER, M. C. Identificação da microbiota da orofaringe e cloaca em filhotes de arara-azul-grande (*Anodorhynchus hyacinthinus*) de vida livre do Pantanal-MS. **Revista de Iniciação Científica da ULBRA**, v. 6, n. 6, p. 29–35, 2007.

McLAUCHLIN, J.; NARAYANAN, G.L.; MITHANI, V.; O'NEILL, G. The detection of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin genes in *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction. **Journal of Food Protection**, v. 63, p. 479-488, 2000.

MAJUMDAR, S. De; YU, J.; FOOKES, M.; MCATEER, S. P.; LLOBET, E.; INGRAM, J.; BENGOCHEA, J.; GALLY, D. L.; FANNING, S.; ELBORN, J. S. Elucidation of the RamA Regulon in *Klebsiella pneumoniae* Reveals a Role in LPS Regulation. **Plos Pathogens**, v. 11, n. 1, p. 1–22, 2015.

MANSOUR, W.; GRAMI, R.; BEN HAJ KHALIFA, A.; DAHMEN, S.; CHÂTRE, P.; HAENNI, M.; AOUNI, M.; MADEC, J.-Y. Dissemination of multidrug-resistant blaCTX-M-15/*IncFIIk* plasmids in *Klebsiella pneumoniae* isolates from hospital- and community-acquired human infections in Tunisia. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 83, n. 3, p. 298–304, 2015. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0732889315002862>>.

MARKOVSKA, R.; STOEVA, T.; BOYANOVA, L.; STANKOVA, P.; PENCHEVA, D.; KEULEYAN, E.; MURJEVA, M.; SREDKOVA, M.; IVANOVA, D.; LAZAROVA, G.; NEDELICHEVA, G.; KANEVA, R.; MITOV, I. Dissemination of successful international clone ST15 and clonal complex 17 among Bulgarian CTX-M-15 producing *K. pneumoniae* isolates. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 89, n. 4, p. 310–313, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2017.08.012>>.

MARTÍNEZ, J.; MARTÍNEZ, L.; ROSENBLUETH, M.; SILVA, J.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. How are gene sequence analyses modifying bacterial taxonomy? The

case of Klebsiella. **International Microbiology**, v. 7, n. 4, p. 261–268, 2004.

MATTES, B. R.; CONSIGLIO, S. A. S.; ALMEIDA, B. Z.; GUIDO, M. C.; ORSI, R. B.; COSTA, A.; FERREIRA, A. J. P.; KNÖBL, T. Influência da biossegurança na colonização intestinal por *Escherichia coli* em psitacídeos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, n. 1, p. 13–16, 2005.

MONTEIRO, J.; SANTOS, A. F.; ASENSI, M. D.; PEIRANO, G.; GALES, A. C. First report of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 1, p. 333–334, 2009.

NAAS, T.; OUESLATI, S.; BONNIN, R. A.; DABOS, M. L.; ZAVALA, A.; DORTET, L.; RETAILLEAU, P.; IORGA, B. I. Beta-lactamase database (BLDB)—structure and function. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 32, n. 1, p. 917–919, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/14756366.2017.1344235>>.

NAHID, F.; ZAHRA, R.; SANDEGREN, L. A bla OXA-181 -harbouring multi-resistant ST147 *Klebsiella pneumoniae* isolate from Pakistan that represent an intermediate stage towards pan-drug resistance. **PLoS ONE**, p. 1–9, 2017.

NASEER, U.; SUNDSFJORD, A. The CTX-M conundrum: dissemination of plasmids and *Escherichia coli* clones. **Microbial drug resistance**, v. 17, n. 1, p. 83–97, mar. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21281129>>. Acesso em: 27 fev. 2014.

NORDMANN, P.; CUZON, G.; NAAS, T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 9, n. 4, p. 228–236, 2009.

NORIZUKI, C.; WACHINO, J.; SUZUKI, M.; KAWAMURA, K.; NAGANO, N.; KIMURA, K.; ARAKAWA, Y. Specific blaCTX-M-8/IncI1 Plasmid Transfer among Genetically Diverse *Escherichia coli* across Humans and Chickens. **Antimicrob Agents Chemother**, n. April, 2017.

O'BRIEN, T. F. Emergence, Spread, and Environmental Effect of Antimicrobial Resistance: How Use of an Antimicrobial Anywhere Can Increase Resistance to Any Antimicrobial Anywhere Else. **Clinical Infectious Diseases**, v. 34, n. s3, p. S78–S84, 2002.

OSMAN, K. M.; HASSAN, H. M.; ORABI, A.; ABDELHAFEZ, A. S. T. Phenotypic, antimicrobial susceptibility profile and virulence factors of *Klebsiella pneumoniae* isolated from buffalo and cow mastitic milk. **Pathogens and global health**, v. 108, n. 4, p. 191–9, jun. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24915048>>. Acesso em: 12 out. 2014.

OVEJERO, C. M.; ESCUDERO, J. A.; THOMAS-LOPEZ, D.; HOEFER, A.; MOYANO, G.; MONTERO, N.; MARTIN-ESPADA, C.; GONZALEZ-ZORN, B. Highly Tigecycline-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 11 (ST11) and ST147 Isolates from Companion Animals. **Antimicrob Agent Chemotherapy**, v. 61, n. 6, p. 1–6, 2017.

OVERBEEK, R.; OLSON, R.; PUSCH, G. D.; OLSEN, G. J.; DAVIS, J. J.; DISZ, T.; EDWARDS, R. A.; GERDES, S.; PARRELLO, B.; SHUKLA, M.; VONSTEIN, V.; WATTAM, A. R.; XIA, F.; STEVENS, R. The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, p. 206–214, 2014.

PACZOSA, M. K.; MECSAS, J. *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 80, n. 3, p. 629–61, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27307579>>.

PADMINI, N.; AJILDA, A. A. K.; SIVAKUMAR, N.; SELVAKUMAR, G. Extended spectrum β -lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: critical tools for antibiotic resistance pattern. **Journal of Basic Microbiology**, v. 57, n. 6, p. 460–470, 2017.

PAGANO, I. S. D. A.; SOUSA, A. E. A. B. De; WAGNER, P. G. C.; RAMOS, R. T. D. C. Aves depositadas no Centro de Triagem de Animais Silvestres do IBAMA na Paraíba: uma amostra do tráfico de aves silvestres no estado. **Ornithologia**, v. 3, n. 2, p. 132–144, 2010.

PAIVA, M. C.; NASCIMENTO, A. M. A.; CAMARGO, I. L. B. C.; LIMA-BITTENCOURT, C. I.; NARDI, R. M. D. The first report of the *qnrB19*, *qnrS1* and *aac(6')-Ib-cr* genes in urinary isolates of ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 5, p. 687–9, ago. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22850962>>.

PATERSON, D. L. Resistance in Gram-Negative Bacteria: Enterobacteriaceae. **American Journal of Medicine**, v. 119, n. 6 SUPPL. 1, p. 20–28, 2006.

PATERSON, D. L.; BONOMO, R. A. Extended-Spectrum beta-Lactamases : a Clinical Update. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 18, n. 4, p. 657–686, 2005.

PEIRANO, G.; AHMED-BENTLEY, J.; FULLER, J.; RUBIN, J. E.; PITOUT, J. D. D. Travel-related carbapenemase-producing Gram-negative bacteria in Alberta, Canada: the first 3 years. **Journal of clinical microbiology**, v. 52, n. 5, p. 1575–81, 2014. Disponível em: <<http://jcm.asm.org/cgi/content/long/52/5/1575>>.

PEIRANO, G.; SEKI, L. M.; VAL PASSOS, V. L.; PINTO, M. C. F. G.; 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, 2009.

PODSCHUN, R.; ULLMANN, U. *Klebsiella* spp. as Nosocomial Pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods, and Pathogenicity Factors. **Clinical microbiology reviews**, v. 11, n. 4, p. 589–603, 1998.

POIREL, L.; PITOUT, J. D.; NORDMANN, P. Carbapenemases : molecular diversity and clinical consequences. **Future Microbiology**, v. 2, p. 501–512, 2007.

REGUÉ, M.; HITA, B.; PIQUE, N.; IZQUIERDO, L.; MERINO, S.; FRESNO, S.; BENEDI, V. J.; TOMÁS, J. M. A gene, *uge*, is essential for *Klebsiella pneumoniae* virulence. **Infect Immun**, v. 72, n. 1, p. 54–61, 2004.

RENTAS. 1º Relatório sobre o tráfico Nacional de Animais Silvestres. **Rede Nacional de Combate ao Tráfico de Animais Silvestres**, p. 40, 2001.

RENNIE, R. P.; ANDERSON, C. M.; WENSLEY, B. G.; ALBRITTON, W. L.; MAHONY, D. E. *Klebsiella pneumoniae* gastroenteritis masked by *Clostridium perfringens*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 2, p. 216–219, 1990.

RICE, L. Evolution and clinical importance of extended spectrum β -lactamase. **Chest**, v. 119, n. 2 SUPPL., p. 391S–396S, 2001.

RITCHIE, B. W.; HARRISON, G. J.; HARRISON, L. R. **Avian Medicine: principles and application**. 1. ed. Florida: Wingers Publishing, 1994. v. 1

ROCHA, F. R.; PINTO, V. P. T.; BARBOSA, F. C. B. The Spread of CTX-M-Type Extended-Spectrum β -Lactamases in Brazil: A Systematic Review. **Microbial Drug Resistance**, v. 22, n. 4, p. 301–311, 2016.

ROCHA, L. K. L.; NETO, R. L. D. S.; GUIMARÃES, A. C. D. C.; ALMEIDA, A. C. S.; VILELA, M. A.; MORAIS, M. M. C. De. Plasmid-mediated qnrA1 in *Klebsiella pneumoniae* ST147 in Recife, Brazil. **International journal of infectious diseases**, v. 26, p. 49–50, 26 jun. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24980465>>. Acesso em: 17 jul. 2014.

RODRIGUES, C.; BAVLOVIC, J.; MACHADO, E.; AMORIM, J.; PEIXE, L.; NOVAIS, Â. KPC-3-producing *Klebsiella pneumoniae* in Portugal linked to previously circulating non-CG258 lineages and uncommon genetic platforms (Tn4401d-IncFIA and Tn4401d-IncN). **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. JUN, 2016.

RODRIGUES, C.; MACHADO, E.; RAMOS, H.; PEIXE, L.; NOVAIS, Â. Expansion of ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* in hospitalized patients: a successful story of international clones (ST15, ST147, ST336) and epidemic plasmids (IncR, IncFIK). **International journal of medical microbiology : IJMM**, v. 304, n. 8, 2014.

ROUFFAER, L. O.; HAESBROUCK, F.; MARTEL, A. Extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae isolated from feces of Falconidae, Accipitridae, and Laridae in bird rescue centers in Belgium. **Journal of wildlife diseases**, v. 50, n. 4, p. 957–60, 2014.

SAAVEDRA, S. Y.; DIAZ, L.; WIESNER, M.; ADRIANA CORREA ARÉVALO, S. A.; REYES, J.; HIDALGO, A. M.; CADENA, E. De; PERENGUEZ, M.; MONTAÑO, A.; ARDILA, J.; VILLEGAS, M. V.; ARIAS, C. A.; BELTRÁN, M. Genomic and Molecular Characterization of Clinical Isolates of Enterobacteriaceae Harboring mcr-1 in Colombia, 2002 to 2016. **Antimicrob Agent Chemotherapy**, v. 61, n. 12, p. 1–13, 2017.

SAIDENBERG, A. B. S.; KNÖBL, T.; MELVILLE, P. A.; ZUNIGA, E.; SALABERRY, S. R. S.; BENITES, N. R.; BRANDÃO, P. E. An Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* Isolate with Possible Human and Domestic Animal Origin from a Free-Living Lear's Macaw (*Anodorhynchus leari*). **Journal of Wildlife Diseases**, v. 53, n. 2, p. 396–398, 2017.

SAIDENBERG, A. B.; TEIXEIRA, R. H. F.; GUEDES, N. M. R.; ALLGAYER, M. da C.; MELVILLE, P. A.; BENITES, N. R. Molecular detection of enteropathogenic *Escherichia coli* in asymptomatic captive psittacines. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 9, p. 922–926, 2012.

SANCHES, L. A.; GOMES, M. da S.; TEIXEIRA, R. H. F.; CUNHA, M. P. V.; OLIVEIRA, M. G. X. de; VIEIRA, M. A. M.; GOMES, T. A. T.; KNOBL, T. Captive wild birds as reservoirs of enteropathogenic *E. coli* (EPEC) and Shiga-toxin producing *E. coli* (STEC). **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 4, p. 760–763, 2017.

SANCHES, T. C. **Causas de morte em Passeriformes: comparação entre aves de vida livre residentes na Região Metropolitana de São Paulo e aves oriundas do tráfico**. 2008. 2008.

SÁNCHEZ-ROMERO, I.; ASENSIO, A.; OTEO, J.; MUÑOZ-ALGARRA, M.; ISIDORO, B.; VINDEL, A.; ALVAREZ-AVELLO, J.; BALANDÍN-MORENO, B.; CUEVAS, O.; FERNÁNDEZ-ROMERO, S.; AZAÑEDO, L.; SÁEZ, D.; CAMPOS, J. Nosocomial outbreak of VIM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates of multilocus sequence type 15: molecular basis, clinical risk factors, and outcome. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 56, n. 1, p. 420–7, 2012. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3256054&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

SCHUBERT, S.; RAKIN, A.; KARCH, H.; CARNIEL, E. Prevalence of the “ High-Pathogenicity Island ” of *Yersinia* Species among *Escherichia coli* Strains That Are Pathogenic to Humans. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 2, p. 480–485, 1998.

SCHWARZ, S.; CHASLUS-DANCLA, E. Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. **Veterinary research**, v. 32, p. 201–225, 2001.

SHLAES, D. M.; GERDING, D. N.; JOHN, J. F.; CRAIG, W. A.; BORNSTEIN, D. L.; DUNCAN, R. A.; ECKMAN, M. R.; FARRER, W. E.; GREENE, W. H.; LORIAN, V.; LEVY, S.; MCGOWAN, J. E.; PAUL, S. M.; RUSKIN, J.; TENOVER, F. C.; WATANAKUNAKORN, C. Society for Healthcare Epidemiology of America and Infectious Diseases Society of America Joint Committee on the Prevention of Antimicrobial Resistance: Guidelines for the Prevention of Antimicrobial Resistance in

Hospitals. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 18, n. 4, p. 275–291, 1997.

SHON, A. S.; BAJWA, R. P. S.; RUSSO, T. A. Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*: a new and dangerous breed. **Virulence**, v. 4, n. 2, p. 107–118, 2013.

SILVA, K. C. da. **Caracterização molecular de plasmídeos carreadores de genes codificadores de beta-lactamases de espectro estendido em Enterobactereaceas isoladas de suínos**. 2016. Universidade de São Paulo, 2016.

SOUSA, J. C. **Manual de Antibióticos Antibacterianos**. [s.l: s.n.]

SOUSA JR, M. A.; FERREIRA, E. S.; CONCEIÇÃO, G. C. Beta-lactamases de Espectro Ampliado (ESBL): um Importante Mecanismo de Resistência Bacteriana e sua Detecção no Laboratório Clínico. **NewsLab**, n. 63, p. 152–174, 2004.

STEELE, C. M.; BROWN, R. N.; BOTZLER, R. G. Prevalences of zoonotic bacteria among seabirds in rehabilitation centers along the Pacific Coast of California and Washington, USA. **Journal of wildlife diseases**, v. 41, n. 4, p. 735–744, 2005.

STENKAT, J.; KRAUTWALD-JUNGHANNS, M.-E.; SCHMITZ ORNÉS, a; EILERS, a; SCHMIDT, V. Aerobic cloacal and pharyngeal bacterial flora in six species of free-living birds. **Journal of applied microbiology**, p. 1–8, 30 ago. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25176477>>. Acesso em: 17 out. 2014.

STOESSER, N.; GIESS, A.; BATTY, E. M.; SHEPPARD, A. E.; WALKER, A. S.; WILSON, D. J.; DIDELOT, X.; BASHIR, A.; SEBRA, R.; KASARSKIS, A.; STHAPIT, B.; SHAKYA, M.; KELLY, D.; POLLARD, A. J.; PETO, T. E. A.; CROOK, D. W.; DONNELLY, P.; THORSON, S.; AMATYA, P.; JOSHI, S. Genome sequencing of an extended series of NDM-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates from neonatal infections in a Nepali hospital characterizes the extent of community- Versus hospital- associated transmission in an endemic setting. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 12, p. 7347–7357, 2014.

SUN, Y.; LI, S.; JIANG, J.; WANG, X.; ZHANG, Y.; WANG, H.; CAO, W. Extended-spectrum β -lactamases in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Gulls, Alaska, USA. **Emerging infectious diseases**, v. 20, n. 5, p. 897–9, 2014.

TOLMASKY, M. E.; CROSA, J. H. Tn1331, a novel multiresistance transposon encoding resistance to amikacin and ampicillin in *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 31, n. 12, p. 1955–1960, 1987.

TURTON, J. F.; BAKLAN, H.; SIU, L. K.; KAUFMANN, M. E.; PITT, T. L. Evaluation of a multiplex PCR for detection of serotypes K1, K2 and K5 in *Klebsiella* sp. and comparison of isolates within these serotypes. **FEMS Microbiology Letters**, v. 284, n. 2, p. 247–252, 2008.

TURTON, J. F.; PAYNE, Z.; COWARD, A.; HOPKINS, K. L.; TURTON, J. A.; DOUMITH, M.; WOODFORD, N. Virulence genes in isolates of *Klebsiella pneumoniae* from the UK during 2016, including among carbapenemase gene-positive hypervirulent K1-ST23 and “non-hypervirulent” types ST147, ST15 and ST383. **Journal of Medical Microbiology**, 2017. Disponível em: <<http://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/jmm.0.000653.v1>>.

VILLA, L.; FEUDI, C.; FORTINI, D.; BRISSE, S.; PASSET, V.; BONURA, C.; ENDIMIANI, A.; MAMMINA, C.; OCAMPO, A. M.; JIMENEZ, J. N.; DOUMITH, M.; WOODFORD, N.; HOPKINS, K.; CARATTOLI, A. Diversity, virulence, and antimicrobial resistance of the KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* ST307 clone. **Microbial Genomics**, v. 3, n. 4, 2017. Disponível em: <<http://www.microbiologyresearch.org/content/journal/mgen/10.1099/mgen.0.000110>>.

VILLA, L.; FEUDI, C.; FORTINI, D.; IACONO, M.; BONURA, C.; ENDIMIANI, A.; MAMMINA, C.; CARATTOLI, A. Complete Genome Sequence of KPC-3- and CTX-M-15-Producing *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 307. **Genome Announcements**, v. 4, n. 2, p. e00213-16, 2016. Disponível em: <<http://genomea.asm.org/lookup/doi/10.1128/genomeA.00213-16>>.

WHITE, L.; HOPKINS, K. L.; MEUNIER, D.; PERRY, C. L.; PIKE, R.; WILKINSON, P.; PICKUP, R. W.; CHEESBROUGH, J.; WOODFORD, N. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in hospital wastewater: a reservoir that may be unrelated to clinical isolates. **Journal of Hospital Infection**, v. 93, n. 2, p. 145–151, 2016.

XENOULIS, P. G.; GRAY, P. L.; BRIGHTSMITH, D.; PALCULICT, B.; HOPPES, S.; STEINER, J. M.; TIZARD, I.; SUCHODOLSKI, J. S. Molecular characterization of the cloacal microbiota of wild and captive parrots. **Veterinary microbiology**, v. 146, n. 3–4, p. 320–5, 15 dez. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20646876>>. Acesso em: 28 jan. 2014.

YEH, K. M.; KURUP, A.; SIU, L. K.; KOH, Y. L.; FUNG, C. P.; LIN, J. C.; CHEN, T. L.; CHANG, F. Y.; KOH, T. H. Capsular serotype K1 or K2, rather than magA and rmpA, is a major virulence determinant for *Klebsiella pneumoniae* liver abscess in Singapore and Taiwan. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 2, p. 466–471, 2007.

YU, V. L.; HANSEN, D. S.; KO, W. C.; SAGNIMENI, A.; KLUGMAN, K. P.; GOTTBORG, A. Von; GOOSSENS, H.; WAGENER, M. M.; BENEDI, V. J. Virulence Characteristics of *Klebsiella* and Clinical Manifestations of *K. pneumoniae* Bloodstream Infections. **Emerging infectious diseases**, v. 13, n. 7, p. 986–993, 2007.

YU, W. L.; KO, W. C.; CHENG, K. C.; LEE, C. C.; LAI, C. C.; CHUANG, Y. C. Comparison of prevalence of virulence factors for *Klebsiella pneumoniae* liver abscesses between isolates with capsular K1/K2 and non-K1/K2 serotypes. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 62, n. 1, p. 1–6, 2008.

ZERBINO, D. R.; BIRNEY, E. Velvet: Algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. **Genome Research**, v. 18, n. 5, p. 821–829, 2008.

ZHANG, X.; LÜ, X.; ZONG, Z. Enterobacteriaceae producing the KPC-2 carbapenemase from hospital sewage ☆. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 73, n. 2, p. 204–206, 2012.

ZHAO, W.-H.; HU, Z.-Q. Epidemiology and genetics of CTX-M extended-spectrum β -lactamases in Gram-negative bacteria. **Critical reviews in microbiology**, v. 39, n. 1, p. 79–101, mar. 2013. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4086240&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 30 jul. 2014.