

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE

**RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS E FATORES DE
VIRULÊNCIA EM *Klebsiella* sp. ISOLADAS DA LAGUNA DE
TRAMANDAÍ**

ATHOS ARAMIS TÓPOR NUNES

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Gertrudes Corção

Porto Alegre
Agosto, 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE

**RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS E FATORES DE VIRULÊNCIA EM
Klebsiella sp. ISOLADAS DA LAGUNA DE TRAMANDAÍ**

ATHOS ARAMIS TÓPOR NUNES

Biomédico

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Microbiologia Agrícola e do Ambiente da Universidade Federal do Rio Grande do
Sul, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em
Microbiologia Agrícola e do Ambiente

Área de concentração: Microbiologia Ambiental

Orientadora: Prof^a Dr^a. Gertrudes Corção

Porto Alegre, Rio Grande do Sul - Brasil
Agosto, 2017

CIP - Catalogação na Publicação

Tópor, Athos

RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS E FATORES DE
VIRULÊNCIA EM *Klebsiella* sp. ISOLADAS DA LAGUNA DE
TRAMANDAÍ / Athos Tópor. -- 2017.

114 f.

Orientadora: Gertrudes Corção.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. *Klebsiella* sp.. 2. Genes de resistência. 3.
ERIC-PCR. 4. Fatores de virulência. 5. Maldi-TOF. I.
Corção, Gertrudes, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

AGRADECIMENTOS

A toda minha família e especialmente a minha avó, todo amor do mundo! Não seria quem sou senão fosse por ela. Nem todas as riquezas do mundo seriam capazes de atingir minimamente teu valor.

A minha professora e orientadora Dra. Gertrudes Corção, muito obrigado. Por toda sua paciência e dedicação durante esse período e por ter confiado em meu trabalho me dando a oportunidade e a honra do convívio e do aprendizado, além da chance de crescer cada vez mais. Muito obrigado mesmo.

Agradeço também a todas minhas colegas de laboratório pelo tempo em que passamos juntos, pelo estresse e pela alegria, pelo enorme conhecimento acrescentado a mim e pela paciência a mim conferida quando tão distraído nem mesmo as ouvia. Elas entenderão.

A todos do setor de Bacteriologia do departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia localizado no Instituto de Ciências Básicas da Saúde, professoras, técnicas e colegas, todos, de uma maneira ou de outra, me ajudaram a chegar até aqui.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudos e a UFRGS por ter aberto as portas para mim.

RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS E FATORES DE VIRULÊNCIA EM *Klebsiella* sp. ISOLADAS DA LAGUNA DE TRAMANDAÍ

Autor: Athos Tópor

Orientadora: Dra. Gertrudes Corção

RESUMO

A resistência antimicrobiana e fatores de virulência são importantes mecanismos de sobrevivência das bactérias, através deles elas se tornaram capazes de escapar da ação das adversidades do ambiente. O presente trabalho teve como objetivo principal analisar os fatores de virulência e genes de resistência de isolados de *Klebsiella* sp. e sua participação na manutenção de populações bacterianas resistentes em pontos na Laguna de Tramandaí. As amostragens foram realizadas em agosto de 2014 e janeiro de 2015 em quatro pontos distintos com diferentes graus de impacto ambiental. Foram analisados 272 isolados bacterianos das amostras de água da laguna de Tramandaí. Estes isolados foram submetidos a testes bioquímicos e microbiológicos para identificação e foram encontrados 37 isolados de *Klebsiella* sp. Estes isolados foram submetidos a testes de susceptibilidade antimicrobiana por disco-difusão, análise fenotípica de fatores de virulência e genes de resistência e pesquisa de genes de resistência (*bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}) através de PCR e similaridade através do ERIC-PCR. Através da análise por MALDI-TOF, os 37 isolados foram identificados como quatro *K. oxytoca*, seis *K. pneumoniae* e 27 *K. variicola*. Todos os isolados foram suscetíveis a imipenem, ertapenem, piperacilina/tazobactam e polimixina B. Ampicilina e amoxicilina foram os antimicrobianos com maior índice de resistência, o gene *bla*_{shv} foi o mais encontrado dentre os genes pesquisados. Todos os isolados apresentaram cápsula polissacarídica, 56,7% dos isolados apresentaram fímbrias do tipo 1, 56,7% demonstraram serem capazes de produzir biofilmes, 78,4% foram capazes de inativar os fatores bactericidas do soro e 81,1% sintetizaram sideróforos. A análise por ERIC-PCR e MALDI-TOF geraram dendrogramas de alta heterogeneidade e baixos índices de similaridade, indicando que diferentes populações de *Klebsiella* estão se mantendo naquele ambiente. Ficou evidenciado neste estudo, através dos isolados encontrados e suas características genéticas e fenotípicas de resistência bacteriana, que eles podem estar contribuindo para a manutenção e disseminação da resistência aos antimicrobianos no ambiente.

RESISTANCE TO ANTIMICROBIALS AND VIRULENCE FACTORS IN *KLEBSIELLA* SP. ISOLATED FROM THE TRAMANDAÍ LAGOON

ABSTRACT

Antimicrobial resistance and virulence factors are important mechanisms for the survival of bacteria, through which they have become capable of escaping from the adversities of the environment. The present work had as main objective to analyze the virulence factors and resistance genes of *Klebsiella* sp. And its participation in the maintenance of resistant bacterial populations in points in Tramandaí Lagoon. Samplings were carried out in August 2014 and January 2015 at four different points with different degrees of environmental impact. A total of 272 bacterial isolates from the Tramandaí lagoon water samples were analyzed. These isolates were submitted to biochemical and microbiological tests for identification and 37 isolates of *Klebsiella* sp. These isolates were submitted to antimicrobial susceptibility tests by disc-diffusion, phenotypic analysis of virulence factors and and resistance gene (*bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}) search by PCR and similarity through ERIC-PCR. Through the use of MALDI-TOF, the 37 isolates were identified as four of *K. oxytoca*, six of *K. pneumoniae* and 27 of *K. variicola*. All the isolates were susceptible to imipenem, ertapenem, piperacilin/tazobactam e polimixin B. Ampicillin and amoxicillin were the most resistant antimicrobials, the *bla*_{SHV} gene was the most found among the genes studied. All isolates presented a polysaccharide capsule, 56.7% of the isolates had type 1 fimbriae, 56.7% were able to produce biofilms, 78.4% were able to inactivate serum bactericidal factors and 81.1% synthesized siderophores. Analysis by ERIC-PCR and MALDI-TOF generated dendrograms with high diversity and low similarity indexes, indicating that different populations of *Klebsiella* are remaining in that environment. It was evidenced in this study, through the isolates found and their genetic and phenotypic characteristics of bacterial resistance that they may be contributing to the maintenance and dissemination of antimicrobial resistance.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
2.1 Objetivo geral	4
2.1 Objetivos específicos	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1 Características da família <i>Enterobacteriaceae</i> e <i>Klebsiella</i> sp.	5
3.1.1 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	7
3.1.2 <i>Klebsiella oxytoca</i>	8
3.1.3 <i>Klebsiella variicola</i>	8
3.1.4 <i>Klebsiella ozaenae</i> e <i>Klebsiella rhinoscleromatis</i>	9
3.2 Fatores de virulência	10
3.2.1 Cápsula polissacarídica (CPS)	10
3.2.2 Fímbrias	11
3.2.3 Sideróforos	12
3.2.4 Biofilmes	13
3.2.5 Resistência bacteriana ao soro humano	15
3.3 Resistência a agentes antimicrobianos em bactérias de corpos d'água	16
3.4 Genes de resistência em <i>Klebsiella</i> sp.	18
3.4.1 β -lactamases	18
3.4.2 β -lactamases classe c	18
3.4.3 β -lactamases de espectro estendido (ESBL)	19
3.4.4 Família carbapenemase	23
3.4.5 Carbapenemases de classe A	23
3.4.6 Carbapenemases de classe B	25
3.4.7 Carbapenemases de classe D	27
3.4.8 Resistência às polimixinas pelo gene <i>mcr-1</i>	28
3.5 PCR em tempo real com curva de derretimento de alta resolução (HRM)	29
3.6 ERIC-PCR	29
3.7 Tipificação por espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser-assistida por matriz MALDI – TOF MS (<i>matrix - assisted laser desorption - ionization time of flight mass spectrometry</i>)	30
4. MATERIAIS e MÉTODOS	32
4.1 Meios de cultura e soluções	32
4.2 Área de estudo	32
4.3 Pontos de coleta	33
4.4 Isolamento e identificação de <i>Klebsiella</i> sp.	34
4.5 Identificação bacteriana por MALDI – TOF MS (<i>matrix - assisted laser desorption - ionization time of flight mass spectrometry</i>)	35
4.6 Análises de suscetibilidade a antimicrobianos	35
4.7 Análise de fatores de virulência	37
4.7.1 Cápsula polissacarídica (CPS)	37
4.7.2 Fímbrias	37
4.7.3 Biofilmes	38

4.7.4 Resistência bacteriana ao soro humano	39
4.7.5 Produção de sideróforos	39
4.7.6 Amplificação dos genes <i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{SHV} e <i>bla</i> _{CTX-M} através de PCR	40
4.7.7 Amplificação das sequências ERIC através da técnica de PCR	43
4.7.8 Análise dos fragmentos de ERIC-PCR e MALDI-TOF	44
5. RESULTADOS	45
5.1 Isolamento e identificação de <i>Klebsiella</i> sp.	45
5.2 Susceptibilidade a antimicrobianos e genes de resistência	45
5.2.1 Perfil de resistência	45
5.2.3 Produção de ESBL	46
5.2.4 Presença de genes de resistência	47
5.3 Análise de similaridade dos isolados de <i>Klebsiella</i> sp.	50
5.3.1 ERIC-PCR	50
6. DISCUSSÃO	53
7. CONCLUSÃO	64
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
9. ANEXOS	97
9.1 Antimicrobianos	97
9.2 Meios de cultura	97
9.3 Soluções	101

RELAÇÃO DE TABELAS

Tabela 1: Antimicrobianos utilizados para análise de perfil de susceptibilidade	36
Tabela 2: Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para pesquisa de genes de resistência nos isolados de <i>Klebsiella</i> multirresistentes	40
Tabela 3: Concentração final dos reagentes para as reações de PCR para os genes <i>bla</i> dos isolados multirresistentes de <i>Klebsiella</i> sp.	41
Tabela 4: Ciclos de amplificação dos genes gene <i>bla</i> dos isolados de <i>Klebsiella</i> multirresistentes	41
Tabela 5: Curva de desnaturação (<i>melt curve step</i>) de 65°C com incremento de 0,1°C/s até 95°C, com aquisição de fluorescência a cada 1s	42
Tabela 6: Oligonucleotídeos utilizados na amplificação dos genes de carbapenemases	43
Tabela 7: Distribuição de espécies de <i>Klebsiella</i> sp. por ponto de coleta	45
Tabela 8: Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos dos isolados de <i>Klebsiella</i> sp.	46
Tabela 9: Resistência a antimicrobianos dos isolados de <i>Klebsiella</i> sp. por ponto de coleta	47
Tabela 10: Relação entre teste de disco-difusão, disco combinado e PCR de genes de resistência por ponto de coleta	48
Tabela 11: Fatores de virulência dos isolados de <i>Klebsiella</i> distribuídos por espécies	49
Tabela 12: Relação de fatores de virulência encontrados por ponto de coleta	49
Tabela 13: Resultados de níveis de intensidade de formação de biofilmes por ponto de coleta	50
Tabela 14: Características físicas e químicas de quatro pontos de amostragem da Laguna Tramandaí no inverno (agosto de 2014) e no verão (janeiro de 2015).	104

RELAÇÃO DE FIGURAS

Figura 1 : Localização dos pontos de coleta da laguna de tramandaí. **Ponto 1**: foz do estuário, onde há maior salinidade e acentuada urbanização. **Ponto 2**: trapiche de um condomínio de Imbé, ponto interno da lagoa, onde ainda há acentuada urbanização, porém as águas geralmente têm menor salinidade. **Ponto 3**: meio da Lagoa. **Ponto 4**: margem da lagoa e salinidade reduzida. **34**

Figura 2: Dendrograma dos isolados de *Klebsiella* da Laguna de Tramandaí tipificados por ERIC-PCR, analisados por índice de similaridade de Dice e agrupamento por UPGMA. **51**

Figura 3: Dendrogramas por espécies de *Klebsiella* isoladas da Laguna de Tramandaí, tipificadas por ERIC-PCR, analisadas por índice de similaridade de Dice e agrupadas por UPGMA **52**

RELAÇÃO DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

°C	Graus celsius
%	Percentual
β	Beta
AMC	Amoxicilina-ácido clavulânico
AMI	Amicacina
AMP	Ampicilina
AmpC	β-lactamases Classe C
ATM	Aztreonam
CAZ	Ceftazidima
CFO	Cefoxitina
CLO	Cloranfenicol
CLSI	Clinical laboratory standards institute
CHDL	Enzimas hidrolisantes de carbapenêmicos
CPM	Cefepima
CPS	Cápsula polissacarídica
CTX	Cefotaxima
ERIC	Sequências repetitivas intergênicas de enterobactérias
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EMB	Ágar eosina azul de metileno
ESBL	β-lactamase de espectro estendido
et al	E colaboradores
GEN	Gentamicina
GES	Guiana extend spectrum
H ₂ S	Sulfeto de hidrogênio
IMP	Imipenemase
IPM	Imipenem
KOH	Hidróxido de sódio
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Carbapenemase
L	Litro
LIA	Ágar lisina ferro
LPS	Lipopolissacarídeo
M	Molar
mL	Mililitro
MBL	Metallo- β-lactamases
mcr-1	Mobilized colistin resistance

MDR	Multirresistente
MIO	Ágar motilidade indol ornitina
MOS	Mananoligossacarideo
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
NDM	New-Delhi-Metalo- β -lactamases
ng	Nanogramas
NOR	Norfloxacina
OXA	Oxacilinas
pb	Pares de base
PCR	Polymerase Chain Reaction
pH	Logatítmo decimal do inverso da atividade de íons de hidrogênio em solução
PPT	piperacilina-tazobactam
R	Resistente
RPM	Rotações por minuto
S	Sensível
SHV	Sulfidril variável
SNP	Polimorfismos de nucleotídeo único
SPM	São Paulo- Metalo- β -lactamases
SUT	Sulfametoxazol
TEM	Teimonera
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TET	tetraciclina
TSA	Ágar Triptona de Soja
TSB	Caldo Soja Trypticaseína
UFC	Unidades formadoras de colônias
VIM	Verona imipenemase
μg	Micrograma
μL	Microlitro

1. INTRODUÇÃO

Durante milhões de anos de evolução, as populações de microrganismos vêm sobrevivendo e se adaptando a todos os obstáculos e ambientes hostis à sua existência, como variações bruscas de temperaturas, escassez de nutrientes, pouca disponibilidade de água, entre outros. Tudo isso devido a sua alta capacidade de adaptabilidade através de trocas gênicas, plasticidade genômica e grande variabilidade de espécies. Todos estes fatores acarretaram em complexos sistema de sobrevivência e resistência, selecionando as cepas mais capazes de darem continuidade a sua existência (RODRIGUEZ-ROJAS *et al.*2013).

Um dos mais importantes mecanismos de sobrevivência é a resistência a agentes antimicrobianos. Através dela foram selecionadas características pelas quais as bactérias tornaram-se capazes de escapar da ação dos fármacos. Com o passar das décadas, essa resistência sofreu um aumento considerável, estabelecendo-se como umas das principais preocupações em saúde pública (KUMMERER, 2009).

Um determinante fundamental para que esse processo se desenvolvesse foi o uso indiscriminado dos antimicrobianos. Seu descarte no meio ambiente, seja através de fontes humanas, industriais ou hospitalares, favoreceu o contato com a microbiota residente, causando potenciais alterações no ecossistema e conseqüentemente o aumento das populações microbianas resistentes a estes fármacos (KEMPER e ATKINSON, 2007).

Os antimicrobianos, por sua vez, foram desenvolvidos com o intuito de combater os microrganismos e estão amplamente distribuídos no meio ambiente (LOCATELLI *et al.*, 2011). Estudos demonstraram que as concentrações de antimicrobianos encontradas nos sedimentos de águas de rios que recebiam dejetos de fontes relacionadas à agricultura foram muito maiores do que em águas situadas em pontos mais distantes dos locais de plantio ou criação de animais, indicando que as águas utilizadas para irrigação carregavam os antimicrobianos até o meio ambiente (KUMMERER, 2009).

Além da poluição gerada por este tipo de atividade, ainda pode-se citar a utilização na aquicultura, assim como o uso clínico destes agentes, e somando-se a eles, a liberação de esgotos com ou sem tratamento nas águas de rios, lagos e

mares (AARESTRUP, 2005, CABELLO, 2006; KIM & CARLSON, 2007; ZHANG *et al.*, 2009; KUMMERER, 2009).

Nestes ambientes que sofreram algum tipo de alteração é comum encontrar inúmeras bactérias da família *Enterobacteriaceae*. O gênero *Klebsiella*, integrante do grupo dos coliformes e um importante representante das enterobactérias, pode ser encontrada no ambiente, águas superficiais, solo e plantas (PODSCHUN *et al.* 2001; GALES *et al.* 2002). Apresentam diversos fatores de virulência que colaboram para sua permanência em hospedeiros e no ambiente, como a cápsula polissacarídica (CPS), fímbrias, formação de biofilme, resistência aos fatores bactericidas do soro humano e sideróforos. O fator de virulência mais importante neste gênero é a CPS, capaz de impedir a fagocitose, é considerada predominante em *Klebsiella*. As fímbrias, por sua vez, não estão envolvidas com a motilidade das bactérias deste gênero, mas apresentam semelhança com os flagelos, constituídas por proteínas, têm como função a adesão bacteriana a superfícies bióticas e abióticas. O biofilme é uma estrutura complexa constituída por uma ou mais espécies de bactérias que em conjunto se aderem às superfícies e epitélios, formando uma matriz que acumula nutrientes e impede a penetração de antimicrobianos (CRESS *et al.*, 2013).

O soro humano tem proteínas que atuam como fatores bactericidas que ativam o sistema imune contra as bactérias indesejadas ao organismo. Para conseguir sobreviverem a estes fatores, algumas bactérias são capazes de alterar sua apresentação perante o sistema imune, impedindo que sejam reconhecidas e destruídas. Essas alterações podem ocorrer através de modificações dos lipídios de membrana e internalização bacteriana, escapando da ação dos macrófagos e impedindo a fagocitose (PODSCHUN e ULLMAN, 1998; MURRAY, 2015). Outro importante fator de virulência deste gênero é a produção de sideróforos, moléculas capazes de captar o ferro do ambiente onde se localizam com a função de nutrir as bactérias e auxiliar no seu crescimento e sobrevivência (MIETHKE e MARAHIEL, 2007).

Dentro deste gênero, a espécie mais importante clinicamente é a *Klebsiella pneumoniae*, patógeno oportunista, frequentemente encontrado em surtos de infecção hospitalar e também em amostras do ambiente (PODSCHUN *et al.*

2001; GALES *et al.* 2002). Na última década, esta bactéria assumiu protagonismo nos estudos microbiológicos pois causou inúmeros surtos e epidemias em hospitais e na comunidade (CORRÊA *et al.*, 2013). Esta elevação na resistência bacteriana se deu pelo surgimento da enzima *K. pneumoniae* carbapenemase (KPC) e New Delhi Metalo- β -Lactamase (NDM-1), as quais conferem resistência aos fármacos como Imipenem e carbapenêmicos (CABRAL *et al.* 2012; RAAP & URBAN, 2012).

Sabendo-se destes fatos, antimicrobianos liberados no meio ambiente, utilização desenfreada dos mesmos, aumento da resistência e alterações genéticas bacterianas, fazem-se necessários estudos e análises das águas onde estas moléculas tornam-se contaminantes e o impacto destes sobre a estrutura das populações bacterianas presentes nestas águas e conseqüentemente os efeitos sobre os indivíduos que dela se utilizam.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Analisar os fatores de virulência e genes de resistência em bactérias do gênero *Klebsiella* e sua participação na permanência de populações resistentes e potencialmente patogênicas em pontos na Laguna de Tramandaí que apresentem diferentes níveis de antropização.

2.2 Objetivos Específicos

- Isolar e identificar bactérias dos gêneros *Klebsiella* a partir de amostras de água de quatro pontos distintos da Laguna de Tramandaí.
- Caracterizar os isolados de *Klebsiella* quanto aos seus perfis de suscetibilidade a diferentes classes de antimicrobianos e produção de β -lactamases de espectro estendido (ESBL).
- Verificar a presença de fatores de virulência presentes em populações de *Klebsiella* sp. isoladas das amostras da laguna de Tramandaí em diferentes pontos de coleta.
- Verificar a presença de genes de resistência nas populações de *Klebsiella* sp. isoladas das amostras da laguna de Tramandaí em diferentes pontos de coleta.
- Analisar a similaridade dos isolados de *Klebsiella* sp. através de ERIC-PCR.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Características da Família *Enterobacteriaceae* e gênero *Klebsiella* sp.

A família *Enterobacteriaceae* pertence ao domínio Bacteria, divisão Proteobacteria, classe Gammaproteobacteria e ordem Enterobacteriales (EUZÉBY, 2016). Constituída por bacilos Gram negativos, divididos em mais de 40 gêneros, subdividindo-se em centenas de espécies e subespécies. Apesar do grande número de integrantes, esta família apresenta poucas espécies de interesse clínico. As bactérias que a compõe são ubíquas na natureza, fazendo parte da microbiota comum de animais e humanos. Medem entre 0,3 a 1,0 × 1,0 a 6,0µm e têm como temperatura ideal de crescimento 37C⁰. Algumas são obrigatoriamente patogênicas ao ser humano, enquanto outras são comensais, causando doenças apenas quando há desequilíbrio imunológico (MURRAY, 2015).

A *Klebsiella* sp. tem como sítios mais comuns de colonização nos hospedeiros o trato respiratório e geniturinário. Apresenta-se imóvel e contém cápsula polissacarídica notadamente proeminente que atribui o aspecto mucóide às colônias deste microrganismo, sendo responsável pelo aumento da virulência desta bactéria. Pili são encontrados em sua superfície, auxiliando na aderência às mucosas do trato respiratório e urinário, locais de comum surgimento de infecção em humanos (RYAN *et al.*, 2010). A *Klebsiella* sp. coloniza além de humanos, ecossistemas, incluindo solos, águas e esgotos (TRIPATHY *et al.*, 2014). Forma biofilmes e é capaz de sobreviver e se multiplicar em águas de estações de tratamento através da utilização dos mesmos (LECHEVALLIER, 1987).

São tanto aeróbias quanto anaeróbias, podendo ser com frequência anaeróbias facultativas. Móveis por flagelos peritríquios ou imóveis, não apresentam a capacidade de sintetizar esporos, fermentadores de lactose entre outros carboidratos, também reduzem nitratos e apresentam positividade para catalase. São pouco exigentes na questão nutricional e são negativas para o teste de oxidase crescendo na faixa de pH 7. Os testes bioquímicos mais comumente utilizados na sua identificação são a produção de indol através da utilização do triptofano, caldo uréia, onde de cor rósea adota coloração avermelhada, e meio lisina ferro, onde a coloração roxa sem formação de H₂S indica positividade para *Klebsiella* sp. Crescem bem em ágar MacConkey pois não sofrem inibição dos sais biliares e

produzem proteínas chamadas de bacteriocinas que são capazes de causar lise de outras espécies bacterianas com o intuito de manter o equilíbrio da microbiota onde se localizam (MURRAY, 2015).

As principais representantes deste gênero são a *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *K. variicola*, *K. ozaenae* e *K. rhinoscleromatis*. Outras espécies representantes, mesmo de pouca importância clínica são *K. planticola* e *K. terrigena*. Estas espécies foram reclassificadas taxonomicamente em *Raoultella* (DRANCOURT *et al.*, 2001).

Muitas estruturas celulares são consideradas antigênicas, entre elas estão os flagelos (antígeno H), a cápsula polissacarídica (antígeno K), fímbrias e lipopolissacarídeo (LPS), este contendo o antígeno O, constituinte comum a todas bactérias Gram negativas. Contém juntamente com o lipopolissacarídeo o antígeno A que confere a propriedade endotóxica. Tais antígenos são a base para a identificação sorológica destas bactérias (MURRAY, 2015).

Causadoras de pneumonias, esta patologia quando vinculadas à *K. pneumoniae*, tem como característica a destruição alveolar por necrose com consequente formação de cavidades e surgimento de hemoptise. São responsáveis também por infecções do sistema urinário e infecções dos tecidos moles. São causadoras, mesmo que raramente, de abscessos hepáticos e endocardites, além de altos índices de infecções hospitalares (MEDELL *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 2013; MOORE *et al.*, 2013; BERRAZEG *et al.*, 2013; HAYDEN *et al.*, 2015).

Como mecanismos de resistência aos agentes antimicrobianos, é característica a expressão de β -lactamases (TEM, SHV e CTX-M), enzimas que atuam sobre os fármacos β -lactâmicos e que vem a causar falhas significativas na terapêutica contra este microrganismo (YANG *et al.*, 2008). Com o aumento do uso indiscriminado de antimicrobianos e consequente seleção natural, a *K. pneumoniae* adquiriu resistência também aos antimicrobianos carbapenêmicos através da produção de enzimas carbapenemases. A *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) causa resistência a todos β -lactâmicos e carbapenêmicos, medicamentos usualmente utilizados contra bactérias multirresistentes (MOLLAND *et al.* 2003; ANDERSON *et al.*, 2007). Com alto potencial para se disseminar e capaz de transmitir genes de resistência através de plasmídeos, o controle de surtos e

epidemias se torna bastante difícil, aumentando ainda mais suas taxas de morbidade e mortalidade (DIENSTMANN, 2010; DEL PELOSO *et al.*, 2010).

3.1.1 *Klebsiella pneumoniae*

A *K. pneumoniae* é a espécie mais comumente isolada em análises de amostras clínicas dentre as espécies de *Klebsiellas* sp. e estudos apontam incidência de até 30% nas fezes da população hígida, colonizando também, mas em menor frequência, a nasofaringe. A população que apresenta maior risco de infecção por *K. pneumoniae* são os recém-nascidos, pacientes pós-cirúrgicos, diabéticos e portadores de neoplasias (MURRAY, 2015).

Dentre os fatores que incrementam sua virulência pode-se citar a produção de cápsula polissacarídica (CPS), resistência aos fatores bactericidas do soro humano, produção de biofilmes, complexo para captação de ferro e síntese de adesinas e fímbrias. Suas colônias se apresentam grandes e mucóides, de coloração rósea-púrpura (MURRAY, 2015).

É a causa de grandes surtos de infecções hospitalares e se sobressai quando relacionada às infecções em indivíduos imunodeprimidos ou com doenças primárias, sendo assim causadora de infecções oportunistas (TSAI *et al.*, 2014; TOKAJIAN *et al.*, 2015). Apresenta altas taxas de resistência bacteriana e a presença de β -lactamases de espectro estendido (ESBL) é comum em seus isolados (GABARTI, 2013; MAVROIDI *et al.*, 2014). No Brasil, a taxa de letalidade por infecções nosocomiais atribuídas a *K. pneumoniae* produtora de ESBL em recém-nascidos já atingiu 50% dos pacientes acometidos (LIMA *et al.*, 2014) e em pacientes em unidades de tratamento intensivo (UTI), este número já foi superior a 73% (PERNA *et al.*, 2015). Segundo a Rede Nacional de Monitoramento da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde (Rede RM), a *K. pneumoniae* é o terceiro microrganismo mais isolado em casos de bacteremias em pacientes internados em UTIs e mais de 35% das cepas isoladas são resistentes às cefalosporinas e 25% aos carbapenêmicos (FORTALEZA *et al.*, 2014).

A resistência às cefalosporinas de terceira e quarta gerações levou à utilização de carbapenêmicos para o tratamento de infecções por *K. pneumoniae* produtoras de enzimas EBLs e com o passar dos anos essa bactéria desenvolveu

mecanismos de evasão e resistência também para estes fármacos através da síntese da enzima *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase, a qual acarretou em surtos mundiais de pneumonias com altos índices de morbidade e mortalidade (LEE e BURGESS, 2012; CORRÊA *et al.*, 2013). Durante as últimas três décadas, a *K. pneumoniae* se manteve como a enterobactéria com maior índice de produção de ESBLs e carbapenemases em cepas encontradas em surtos de infecções nosocomiais no mundo (FREITAS *et al.*, 2014; ROBERT *et al.*, 2014).

3.1.2 *Klebsiella oxytoca*

A *K. oxytoca* é componente do grupo A de Ambler e apresenta comumente fenótipo de resistência para penicilinas como ampicilina e amoxicilina, são também resistentes a desinfetantes, elevando os riscos de infecções através de alimentos e águas (AMBLER, 1980; ARAKAWA *et al.* 1989; LIVERMORE, 1995; REISS *et al.*, 2000).

Dentre as *Klebsiella*, a espécie *K. oxytoca* é a segunda com mais relatos nos estudos clínicos. Sendo responsável por infecções nosocomiais e oportunistas, atinge o trato geniturinário, além de causar pneumonia lobar e septicemia em casos mais graves (LIAO *et al.*, 2012). Apesar de mostrar-se mais notória em isolados clínicos, surtos de amostras ambientais já foram relatados (DECRÉ *et al.*, 2004; ZÁRATE *et al.*, 2008).

3.1.3 *Klebsiella variicola*

Esta espécie difere das espécies anteriores devido ao seu habitat, mais comum em plantas, vegetais, frutas e insetos, também difere na capacidade de fixação de nitrogênio, a qual apenas a *K. variicola* e a *K. quasipneumoniae* dentro deste gênero são capazes (ROSENBLUETH ,2004; FOUTS *et al.* 2008, PINTO-TOMÁS *et al.* 2009, HAZEN *et al.* 2014).

Há grande dificuldade de identificação através de teste bioquímicos, pois apresenta alta semelhança com a *K. pneumoniae*, muitas vezes sendo identificada erroneamente. Esta bactéria foi descoberta posteriormente a *K. pneumoniae* e *K. oxytoca*, assim como a descrição de cepas de *K. variicola* produtoras de ESBL (ROSEMBLUETH *et al.*, 2004; ALVES *et al.*, 2006).

Além dos testes bioquímicos dificultarem sua identificação, testes baseados em automação como VITEK e MALDI-TOF mantém taxas de falsos negativos consideráveis (SEKI *et al.*, 2013; BERRY *et al.*, 2015). Outra característica comum ao gênero *Klebsiella* mas que se apresenta variável na *K. variicola* é o aspecto mucóide das colônias. Nas espécies anteriores, a formação de colônias mucóides, grandes e brilhantes é comum, já em *K. variicola* pode não acontecer, demonstrando fenótipo com colônias pequenas, opacas e secas (SEKI *et al.*, 2013).

Testes mais sensíveis de biologia molecular e espectrometria devem ser utilizados para confirmação desta espécie (GARZA-RAMOS *et al.*, 2015), porque mesmo raramente encontrada em amostras clínicas, quando descrita, apresenta altas taxas de letalidade, principalmente em bacteremias, elevando os índices de comorbidade e, recentemente, o surgimento de genes de resistência até então restritos a outras espécies (MAATALLAH *et al.*, 2014; HOLT *et al.*, 2015; ZURFLUH *et al.*, 2015).

3.1.4 *Klebsiella ozaenae* e *Klebsiella rhinoscleromatis*

A *K. ozaenae* e *K. rhinoscleromatis* são subespécies da *K. pneumoniae* e são importantes clinicamente devido à capacidade de causar dois tipos de rinite crônica e serem patógenos oportunistas, podendo causar meningites bacterianas em pacientes imunodeprimidos (TANG e CHEN, 1994; BRISSE e VERHOEF, 2001). Estudos demonstram que a identificação destas bactérias é de elevada complexidade e a identificação de isolados destas bactérias, quando registrados, ocorrem entre períodos espaçados de tempo, devido aos testes de triagem conterem capacidade limitada de identificação (HANSEN *et al.*, 2004; DE CHAMPS *et al.*, 2005).

A *K. ozaenae* causa rinite conhecida como rinite atrófica *ozenae* ou rinite fétida e a *K. rhinoscleromatis* causa a rinoscleroma (MALOWANY *et al.*, 1972; MENDONÇA *et al.*, 2000; MOCELLIN, 2007). Ambas doenças são endêmicas em países com baixos índices de higiene e em desenvolvimento (EVRARD *et al.*, 1998; MEDINA *et al.*, 2003). A patogenicidade da *K. rhinoscleromatis* está relacionada com a presença da CPS e o antígeno do sorotipo denominado antígeno K3 que atribui

resistência à fagocitose pelas células do sistema imune (CANALIS e ZAMBONI, 2001).

3.2 Fatores de virulência do gênero *Klebsiella*

3.2.1 Cápsula polissacarídica

A cápsula polissacarídica representa o principal fator de virulência da *Klebsiella* sp. Composta por camadas de polissacarídeos interligados à superfície celular bacteriana, associados à superfície externa através de lipídeos inseridos na bicamada lipídica da membrana. Variando conforme o isolado, engloba 78 sorotipos capsulares distintos. Confere resistência à fagocitose pelas células do hospedeiro, escondendo os componentes da parede bacteriana que são ativadores do sistema imune (CRESS *et al.*, 2013; PAN, 2013).

Pela sua organização compacta, as camadas da CPS tornam-se rígidas, impedindo que partículas como a tinta Nanquim sejam englobadas e fiquem impossibilitadas de internalização (MADIGAN *et al.*, 2010). As células responsáveis pela fagocitose não conseguem se aderir à cápsula polissacarídica porque esta contém características químicas que impedem esta adesão, inibindo compostos do sistema complemento com o C3b e a capacidade funcional dos macrófagos (PODSCHUN e ULLMANN, 1998). Possui também receptores específicos que atuam como sítios de ligação a outras superfícies, possibilitando a formação de biofilmes que venham a se aderir a diferentes superfícies, assim como é essencial para adesão ao epitélio do trato urinário e respiratório (CAMPOS *et al.*, 2004; REGUÉ *et al.*, 2004). Tendo alto peso molecular, a cápsula é muito relacionada com a gravidade da infecção, conforme o sorotipo contido em sua composição (PAN, 2013). A CPS é capaz de gerar proteção contra agentes agressores do ambiente e concentrar nutrientes sobre a superfície da bactéria (CRESS *et al.*, 2013).

A cápsula polissacarídica contém o antígeno K que possui a função de proteção contra fatores bactericidas do soro humano e também apresenta a capacidade de anular a expressão de β -defensinas secretadas pelo epitélio do sistema respiratório (MORANTA *et al.*, 2010) inviabilizando a ação de peptídeos antimicrobianos (LLOBET *et al.*, 2008). Nos últimos anos, vários pesquisadores vêm

desenvolvendo meios para neutralizar a ação do CPS através de vacinas específicas e outros tratamentos imunológicos (AHMAD *et al.*, 2012; DIAGONAVARRO *et al.*, 2014).

3.2.2 Fímbrias

O fator responsável pela adesão bacteriana às células hospedeiras são as adesinas que interagem com receptores localizados na superfície das células hospedeiras e são divididas em fimbriais e não fimbriais. As fimbriais são divididas em fímbrias do tipo 1 (manose-sensível) e fímbrias do tipo 3 (manose-resistente). Contém diferenças relevantes tanto mecânica quanto estruturalmente, desempenhando funções distintas (CHEN *et al.*, 2011). São estruturas responsáveis por uma etapa fundamental na colonização do hospedeiro, mediando a ligação com os receptores dos tecidos e consequente adesão epitelial (ROSEN *et al.*, 2008; STRUVE *et al.*, 2009).

Estruturas similares aos flagelos, mas sem a função motora, constituídas por proteínas específicas como a fibrilina e pilina, são compostas de subunidades principais e subunidades menores, onde as características adesivas são conferidas às subunidades menores inseridas no ápice da fímbria, podendo também se localizar de maneira intercalada em diferentes locais ao longo deste filamento (KUEN *et al.*, 1994; MOL e OUDEGA, 1996).

A subunidade responsável pela ligação à manose nas fímbrias do tipo 1 é a *fimH*. Esta subunidade também é a grande responsável pela colonização e aderência às células do hospedeiro (EUSÉBIO *et al.*, 2016). A subunidade *fimH* é composta por dois domínios conhecidos como adesina amino-terminal e pili carboxi-terminal, sendo que o primeiro se liga ao receptor celular (ROSEN *et al.*, 2008).

A fímbria tipo 1 é relacionada ao poder de infecção da *K. pneumoniae* nas infecções urinárias (STRUVE *et al.*, 2009; EUSÉBIO *et al.*, 2016). Por sua vez, as fímbrias tipo 3 são responsáveis pela ligação às células endoteliais e epiteliais respiratórias dos humanos também pela ligação às células epiteliais do trato urinário como as do tipo 1. As fímbrias do tipo 1 apresentam composição delgada e rígida e são constantemente encontradas na família *Enterobacteriaceae* (SAHLY *et al.*, 2008; STRUVE *et al.*, 2009; BARROSO, 2014).

Tanto as fímbrias do tipo 1 quanto as do tipo 3 estão relacionadas à formação de biofilme e colonização de materiais não biológicos como cateteres e outros materiais cirúrgicos (WU *et al.*, 2010; STAHLHUT *et al.*, 2012). As fímbrias do tipo 3 estão correlacionadas ao colágeno IV e V e frequentemente presentes nos isolados de *Klebsiella* sp. (WITKOWSKA *et al.*, 2005).

3.2.3 Sideróforos

Um fator essencial para o crescimento bacteriano é a presença de ferro no ambiente onde se encontra a bactéria (PODSCHUN, ULLMANN 1998). O ferro encontra-se no hospedeiro ligado às proteínas transportadoras como ferritina, hemoglobina, transferrina, hemosiderina e lactoferrina (PODSCHUN *et al.*, 2000). Na natureza, o ferro não se encontra disponível em ambientes de aerobiose por apresentar baixa solubilidade (STOREY, 2006). Os microrganismos para obter o ferro disponível nestas condições, desenvolveram sistemas para captação, sintetizando substâncias quelantes capazes de solubilizar o ferro ligado às proteínas, liberando-o para utilização com fins de crescimento (PODSCHUN, ULLMANN 1998).

Os sideróforos são compostos orgânicos de baixo peso molecular (500-1500 Daltons), produzidos por bactérias, fungos e plantas gramíneas formando complexos estáveis com o ferro (REICHARD, 2005). Quando esta molécula é secretada para o meio extracelular, tem a capacidade de “sequestrar” o ferro, onde se ligarão à forma férrica formando complexos ferro-sideróforo, sendo sua biossíntese dependente da concentração de ferro disponível no ambiente onde o microrganismo se encontra (HIDER e KONG, 2010). A partir deste momento, chamados de ferrisideróforos, são capturados por algum organismo que contenha receptor específico e internalizados através de transporte ativo (HARRISON e BUCKLING, 2009; KREWULAK e VOGEL, 2011). A inibição da biossíntese destes compostos é afetada pelo tipo de sideróforos e a espécie do microrganismo produtor (ILLMER e BUTTINGER, 2006). No interior da célula, a liberação do sideróforos se dá por degradação enzimática utilizando a ferrisideróforo redutase ou por redução do ferro da forma Fe₃ para Fe₂, ocasionando desestabilização do complexo formado entre o sideróforos e o ferro (MIETHKE e MARAHIEL, 2007).

Considerados fatores de virulência da *Klebsiella* sp. têm como característica conterem níveis até 10 vezes maiores de afinidade por íons férricos do que as próprias proteínas ligantes de ferro, conseguindo assim adquiri-lo para seu benefício (SMITS e DUFFY, 2011).

O gênero *Klebsiella* é capaz de sintetizar dois tipos de sideróforos, são eles a aerobactina e a enterobactina. A enterobactina, sideróforos da categoria dos catecolatos (MIETHKE e MARAHIEL, 2007), apresenta maiores índices de afinidade para captação de ferro, enquanto a aerobactina, categoria dos hidroxamatos (BENITE, 2002; GAO, 2012), é considerada mais virulenta por ser mais estável e solúvel (LAWLER *et al.*, 2007), sendo capaz de manter um suprimento constante de ferro para a bactéria, elevando sua virulência (ÉSPER *et al.*, 2013).

Estudos ligam estes dois tipos de sideróforos contidos na *Klebsiella* sp. a uma nova cepa mais invasiva e virulenta, onde ao se combinarem venham a produzir fenótipo de hipermucoviscosidade e hipervirulência com altas taxas de infecção hospitalar e comunitária (BACHMAN *et al.*, 2011; SHON *et al.*, 2013). Trabalhos recentes citam trocas de genes de resistência entre as cepas de *Klebsiella* sp. clássica e hipervirulentas, tornando-as resistentes aos betalactâmicos e aos carbapenêmicos (LI *et al.*, 2014; LIU *et al.*, 2014).

3.2.4 Biofilmes

A formação de biofilmes é outro importante fator de virulência da *Klebsiella* sp. O biofilme é, por definição, um agregado de células capaz de arranjos multicelulares complexos que em conjunto são capazes de formar um “bloqueio”, pois funcionam como barreira protetora, podendo ser composto por diferentes espécies bacterianas ligadas entre si e capazes de reterem substâncias inorgânicas em sua matriz. Possuem a habilidade de expulsar substâncias quando em contato, impedindo assim a ação de antimicrobianos, e de capturar e armazenar nutrientes para as células bacterianas (RYAN *et al.*, 2010). Clinicamente, o biofilme está muito associado às infecções crônicas por resistirem ao sistema imune do hospedeiro, tornando recorrentes as infecções que seriam de fácil tratamento, elevando as taxas de resistência aos antimicrobianos e desinfetantes (BRYERS, 2008; CANTON e MOROSINI, 2011).

Agressões do ambiente e baixa disponibilidade de nutrientes onde se localizam causam mudanças fenotípicas nas bactérias submetidas a estes fatores hostis a sua sobrevivência. Uma dessas modificações ocorre, por exemplo, quando a existência planctônica, suspensão da bactéria em meio líquido, se altera para mucóide, estilo de vida relacionado aos biofilmes, onde as bactérias deixam de possuir flagelos e tornam-se estáticas (SAUER *et al.*, 2001; SAUER *et al.*, 2002).

Os mecanismos genéticos que ativam essas alterações nos fenótipos estão associados à densidade microbiana ou *quorum sensing*. Mecanismo de comunicação entre as bactérias pelo qual é medida a taxa de densidade do microrganismo num dado ambiente regulando a proliferação bacteriana, permitindo o gerenciamento do metabolismo desta comunidade de microrganismos (WILLIAMS, 2007; JAYARAMAN e WOOD, 2008). Esta modificação no estilo de vida exige uma complexa alteração genética que varia entre espécies bacterianas (HANDKE *et al.*, 2004; AGLADZE *et al.*, 2005).

A síntese do biofilme se dá com o início da adesão da célula bacteriana sobre a superfície, seguida por estágio de maturação, ruptura e posterior dispersão. Contêm em sua composição lipídeos, carboidratos, proteínas, fosfolipídios, vitaminas e sais minerais que ao se unirem formam camadas denominadas de matriz, sob a qual os microrganismos conseguem se multiplicar e se desenvolver (MCBAIN, 2009), formando microcolônias por onde ocorre fluxo de água e carreamento de nutrientes. (HALL-STOODLEY *et al.*, 2004).

Estudos demonstraram que a formação de biofilme por parte da *Klebsiella* sp. auxilia na adesão deste microrganismo às superfícies bióticas, impedindo a ação de antimicrobianos e do sistema imunológico do hospedeiro, e abióticas como cateteres e canos de abastecimento de água residenciais e de estações de tratamento (AHMED *et al.*, 2012; STHALHUT *et al.*, 2012; SUBRAMANIAN *et al.*, 2012). Além disto, estudos demonstraram haver relação entre o aumento da resistência a betalactâmicos e carbapenêmicos e a formação de biofilmes por algumas bactérias (SINGHAI *et al.*, 2012; SOWMIYA *et al.*, 2012).

3.2.5 Resistência bacteriana ao soro humano

A atividade bactericida do soro humano consiste em proteínas do sistema imune com capacidade de eliminar microrganismos invasores. Este sistema de proteção é baseado no sistema complemento e é formado por uma complexa rede de proteínas presentes no soro juntamente com o plasma sanguíneo que atuam regulando respostas inflamatórias e imunes perante organismos patogênicos como bactérias, vírus e parasitas (DUNKELBERGER e SONG, 2010). Estas proteínas são sintetizadas nos macrófagos, fibroblastos e principalmente no fígado, quando algum elemento do sistema é ativado, este posteriormente irá ativar elementos seguintes, seguindo um processo de cascata (ABBAS e LICHTMAN, 2003; KEMPER e ATKINSON, 2007).

Após a ativação em cascata do sistema complemento, as proteínas formam um complexo de ataque à membrana na superfície do microrganismo, e para sobreviverem às defesas naturais do sistema imune, algumas bactérias criaram mecanismos de evasão a esses fatores bactericidas. A cápsula polissacarídica exerce esse papel, assim como outros elementos que impedem a ligação do complemento ao microrganismo, como o lipopolissacarídeo da membrana externa (LPS), lipoproteína TraT, proteína situada na membrana externa, e porinas (PODSCHUN, ULLMAN, 1998).

Os meios pelos quais estes mecanismos de defesa atuam são baseados em modificações nas moléculas de lipopolissacarídeos, expondo uma estrutura de superfície alterada que não sofre reconhecimento e ativação através do sistema complemento. A formação do complexo de ataque à membrana é então inibida, impossibilitando o dano à membrana e morte da célula bacteriana (PODSCHUN e ULLMANN, 1998). Estudos relacionam o LPS como principal fator de inibição dos fatores bactericidas do soro do hospedeiro e a relação entre genótipos de ESBLs com aumento nos níveis de resistência ao soro (TOMÁS *et al.*, 1986; CIURANA e TOMÁS, 1987; PORAT *et al.*, 1987; MERINO *et al.*, 1992; SAHLY *et al.* 2004). Os genes de virulência que conferem às bactérias o poder de resistir aos fatores bactericidas do soro atuam no complexo terminal do sistema complemento, bloqueando-o e impedindo que se ligue à bactéria, causando consequente lise da membrana celular (DHO-MOULIN e FAIRBROTHER, 1999).

Na *Klebsiella* sp. este processo é também baseado na CPS e no LPS. A cápsula causa inibição da ativação e absorção dos componentes do sistema complemento, principalmente o fator C3b, inibindo conseqüentemente a ação e a capacidade fagocítica dos macrófagos. Outro mecanismo que auxilia as bactérias a escaparem dos efeitos do sistema imune é a internalização através da invasão celular, onde o microrganismo por se encontrar no interior das células, evita exposição aos efeitos bactericidas do soro (PODSCHUN e ULLMANN, 1998; CRESS *et al.*, 2013).

3.3 Resistência antimicrobiana em bactérias de corpos d'água

A água é um habitat natural para as bactérias e outros microrganismos e é também local de grande diversidade de espécies. Através dela, esses microrganismos conseguem se disseminar e se multiplicar, podendo constituir por conseqüência uma importante reserva de genes de resistência bacteriana (ZHANG *et al.*, 2009; TAMAMES *et al.*, 2010; RIZZO *et al.*, 2013).

A introdução de substâncias no meio ambiente que venham a provocar alterações danosas, contaminando-o, caracteriza a poluição. No meio aquático, esses contaminantes são de diversas origens, como compostos organossintéticos, metais pesados, produtos químicos e destacando-se a matéria orgânica de microrganismos provenientes de esgotos de diversas origens. Esta matéria orgânica traz consigo elevado número de coliformes fecais. Estes encontram-se amplamente distribuídos no ambiente já que são provenientes das fezes de animais de sangue quente e dos seres humanos, e podem constituir microrganismos potencialmente patogênicos (REYNOLDS, 2013; FREIRE, 2015).

Os antimicrobianos, em sua maioria, chegam ao meio ambiente através de efluentes industriais e esgotos residenciais e quando utilizados pela população, não são totalmente metabolizados pelo organismo, sendo excretados em formas ainda ativas, chegando ao ambiente e causando modificações nas populações microbianas residentes (ZHANG *et al.*, 2009; EVERAGE *et al.*, 2014). Além da matéria orgânica que por si só constitui fonte de bactérias exógenas e outros contaminantes, a disseminação de antimicrobianos através dos esgotos residenciais, industriais, uso veterinário, agricultura e aquicultura, o próprio meio ambiente pode

sintetizar antibióticos através de outras fontes (ANUKOOL *et al.*, 2004; JURY *et al.*, 2010).

A resistência bacteriana é dividida em intrínseca e adquirida. Por intrínseca, entende-se a característica inerente do microrganismo, sendo que todos da mesma espécie ou gênero expressam essa condição (MACEDO e FALCÃO, 2011). A resistência adquirida é aquela obtida através de transferência de genes de outros microrganismos e apenas uma parte das cepas da espécie apresentam esta característica (COURA, 2013). O que se deve levar em conta é o fato de que os antimicrobianos não causam por si só a resistência, e sim, selecionam as cepas capazes de sobreviver a ele, inibindo parcialmente ou completamente as cepas selvagens (TELLO *et al.*, 2012). Esta resistência se dá quando as bactérias do meio são expostas a grandes quantidades de antimicrobianos em doses subletais por longos períodos, forçando os microrganismos a criarem respostas de defesa a estes agressores através de mecanismos de evasão e de alterações genéticas (FERNANDES *et al.*, 2016; JURY *et al.*, 2010).

Alterações genéticas geram mutações e alterações na expressão de genes mutantes, tornando-se as causas moleculares do surgimento de resistências, causando alterações a nível cromossomal, por transferência plasmidial e de transposons. Estas mutações podem ser geradas de diferentes maneiras. Estresse oxidativo através da produção de espécies reativas de oxigênio (KOHANSKY *et al.*, 2007; DWYER *et al.*, 2009), resposta SOS, onde ao reparar o DNA danificado surgem novas mutações (BAHAROGLU e MAZEL, 2011; THI *et al.*, 2011) e modificações nucleotídicas, onde ocorre adição ou deleção de nucleotídeos visando a proteção do DNA (HASTAK, 2008).

Os genes de resistência são transmitidos através de elementos genéticos móveis, plasmídeos e transposons, podendo ser transferidos entre bactérias de diferentes filós que compartilhem similaridade genética (Wellington *et al.*, 2013). Os plasmídeos são os elementos móveis mais estudados e conhecidos entre os elementos deste sistema de transferência (OSBORN e BOLTNER, 2002).

Portanto ao se juntar todos esses fatores, as chances de transferência horizontal de material genético entre bactérias sem resistência e com resistência se elevam consideravelmente e a preocupação com esse fato vem aumentando nos

últimos anos, já que esta disseminação pode acarretar em maiores níveis de resistência por parte das bactérias que se encontram no meio ambiente (MARTINEZ, 2009; MILIC *et al.*, 2013; RODRÍGUEZ-ROJAS *et al.*, 2013; HOLVOET *et al.*, 2013; WELLINGTON *et al.*, 2013; RODRIGUES, 2015).

3.4 Genes de resistência em *Klebsiella* sp.

3.4.1 β -lactamases

Os antibióticos da família dos betalactâmicos são os mais utilizados na prática clínica (DRAWZ e BONOMO, 2010). Possuem características e espectro de ação semelhantes, atuam na inibição da síntese da parede celular bacteriana e possuem anéis betalactâmicos. Os mecanismos de evasão a estes antimicrobianos são baseados na produção de enzimas que inativem os antimicrobianos (COURA, 2013), alteração de permeabilidade de membrana, alteração dos sítios de ligação (BRUTON *et al.*, 2012), ação enzimática e bombas de efluxo (BUSH *et al.*, 2011; MOREIRA e FREIRE, 2011; WALSH *et al.*, 2011).

A enzima β -lactamase atua nos anéis betalactâmicos, hidrolisando-os e inativando a droga. Após hidrolisar a estrutura dos anéis betalactâmicos, ocorre regeneração da β -lactamase, tornando-se ativa novamente para novo processo de hidrólise (DRAWS e BONOMO, 2010). Esta enzima pode se localizar no espaço periplasmático, impedindo que o antibiótico entre na célula bacteriana (GOODMAN e GILMAN, 2012). Dentre as enterobactérias, ocorrem com maior frequência em *K. pneumoniae* e *Escherichia coli* (FREITAS *et al.*, 2003).

As β -lactamases foram então divididas entre as classes A a D de Ambler e a classe A é a mais encontrada entre as enterobactérias. As bactérias presentes neste grupo apresentam capacidade hidrolítica para penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos (MURRAY, 2015).

Outro modelo de classificação das β -lactamases é proposto por Bush-Jacoby-Medeiros e é baseado na afinidade do substrato da enzima e na inativação através de inibidores betalactâmicos. Baseando-se nesse modelo, as β -lactamases de espectro estendido pertencem ao subgrupo 2be que engloba enzimas com capacidade de hidrolisar penicilinas e oxyimino- β -lactâmicos, porém com

sensibilidade ao ácido clavulânico (BUSH, 1989; BUSH, JAOBY & MEDEIROS, 1995; BUSH e JACOBY, 2010; BUSH, 2013).

Uma terceira classificação foi criada por GISKE *et al.*, (2009) unindo as classificações de Ambler e Bush-Jacoby-Medeiros, dividindo os grupos em classes conforme características fenotípicas e genotípicas. Onde as enzimas de classe A de Ambler e 2be de Bush-Jacoby-Medeiros foram inseridas no grupo ESBLA, enzimas AmpC e OXA em ESBLM e o grupo ESBLCARBA onde estão inseridas as carbapenemases.

3.4.2 β -lactamases classe C

As β -lactamases de classe C são também denominadas AmpC e têm a capacidade de inativar cefalosporinas de terceira geração e penicilinas, causando elevação nos níveis de morbidade e mortalidade em pacientes infectados por enterobactérias produtoras destas enzimas (PATERSON e BONOMO, 2005; JACOBY, 2009). Localizadas no periplasma bacteriano (FELLER *et al.*, 1997), podem ser mediadas por plasmídeos e cromossomos e são induzidas pelo uso de cefoxitina e carbapenêmicos (JACOBY, 2009; BUSH e JACOBY, 2010).

3.4.3 β -lactamases de espectro estendido (ESBLs)

Com a evolução da resistência antimicrobiana surgiram as β -lactamases de espectro estendido (ESBL). Estas enzimas são capazes de inativar a maioria dos antimicrobianos betalactâmicos e são codificadas em plasmídeos transferíveis entre microrganismos (WOERTHER *et al.*, 2013).

As β -lactamases de espectro estendido já foram largamente descritas e estudadas. Localizadas na maioria das vezes em plasmídeos, podem também ter origem cromossomal. As ESBLs têm a capacidade de causar hidrólise na maioria dos betalactâmicos, cefalosporinas de terceira e quarta gerações, além de monobactâmicos, sendo suscetíveis ao ácido clavulânico (BUSH e JACOBY, 2010). As ESBLs são divididas em diversas famílias, sendo as principais SHV, TEM e CTX-M, esta última, a mais prevalente (WOERTHER *et al.*, 2013). Mutações pontuais em β -lactamases de espectro reduzido do tipo TEM-1 e SHV-1 deram origem às ESBLs (DOIT *et al.*, 2010; ARPIN *et al.*, 2009).

Essas alterações agem especificamente no sítio ativo da enzima, modificando-o e elevando seu efeito sobre as cefalosporinas. Então, as enzimas geradas a partir destas mutações, não apenas surtem efeito sobre as cefalosporinas de primeira geração, como também sobre as cefalosporinas de segunda e terceira gerações (STUREMBURG e MACK, 2003). Com este novo agravamento na resistência, a utilização de inibidores de ESBLs, ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam, se fez necessária (WARREN *et al.*, 2008; DHANJI, 2010).

As ESBLs da família TEM fazem parte do grupo molecular A de Ambler (STRATEVA e YORDANOV, 2009), são derivadas de TEM-1 e TEM-2 e foram descritas pela primeira vez em *Escherichia coli* (DATTA e KONTOMICHALOU, 1965). Posteriormente mutações em posições específicas correspondentes a determinados aminoácidos acarretaram no surgimento de variantes que apresentaram poder de inibição sobre as cefalosporinas e foram descritas em estudos pela primeira vez em cepas bacterianas hospitalares de *K. pneumoniae* que continham o gene TEM-3 em meados da década de 1980 (KNOTHE *et al.*, 1983; KLIEBE *et al.*, 1985; BRADFORD, 2001; SHAH, 2004). Estas mutações aumentaram o seu espectro hidrolítico sobre cefalosporinas, monobactâmicos e penicilinas (PATERSON e BONOMO, 2005; BUSH e JACOBY, 2010).

A distribuição desta enzima é notadamente ampla no meio ambiente, sendo relatada em águas, plantas, insetos, animais de corte e mais recentemente também em bacteriófagos distribuídos na natureza (BAQUERO *et al.*, 2008; XI *et al.*, 2009; LU *et al.*, 2010; SHAHID *et al.*, 2014; ANAND *et al.*, 2016; LI *et al.*, 2016).

A variante TEM resistente aos inibidores de ESBL são enzimas provenientes do tipo TEM-1, TEM-2 e SHV-1 e foram primeiramente descritas em isolados Europeus (GUTKIND *et al.*, 2013). São capazes de aumentar a resistência bacteriana frente aos inibidores de ESBL mais comuns como clavulanato, ticarcilina e tazobactam, mas apresentam reduzida ação contra cefalosporinas de amplo espectro (CHIABI *et al.*, 1999; BRADFORD, 2001). Seguindo o processo evolutivo de resistência antimicrobiana, surgiram variantes enzimáticas que têm a capacidade de combinarem as variantes resistentes aos inibidores de ESBL e as variantes ESBL. São conhecidas como CMT (Complex Mutant TEM) e têm capacidade

inibitória sobre o ácido clavulânico e oxamino-cefalosporinas (SIROT *et al.*, 1997; FIETT *et al.*, 2000; POIREL *et al.*, 2004).

Após os primeiros relatos de ESBL do tipo TEM, estas tornaram-se as mais prevalentes entre as famílias de ESBL, mas conforme foram sendo utilizadas cefalosporinas de maior espectro de ação, as enzimas TEM perderam espaço para a família SHV e CTX-M (BUSH e JACOBY, 2005; LALZAMPUIA *et al.*, 2014). A evolução enzimática deste gene gerou diversas variantes através de múltiplos mecanismos em diferentes bactérias. Hiperprodução de penicilinases do tipo TEM-1 e AmpC plasmidial, ultrapassando mais 220 tipos diferentes de enzimas e posteriormente o surgimento da variante TEM resistente aos inibidores de ESBL (CANTÓN *et al.*, 2008; <http://www.lahey.org/studies>). Excetuando-se a TEM-1 e TEM-2, todas variantes são ESBL (GHAFOURIAN *et al.*, 2014).

A β -lactamase do tipo SHV-1 tem localização cromossômica e possui como característica o espectro reduzido, tendo efeito sobre as penicilinas e cefalosporinas de primeira geração e efeito quase nulo sobre as cefalosporinas de terceira geração (STUREMBURG e MACK, 2003). Apresentam menor diversidade do que a família TEM (POIREL *et al.*, 2012) e são constantemente encontradas na *K. pneumoniae*, assim como na família *Enterobacteriaceae* (LIVERMORE e WOODFORD, 2006).

Estas enzimas surgiram de mutações pontuais no gene codificante *bla*_{SHV-1} e a primeira a ser descrita foi a do tipo SHV-2 em isolados clínicos de *K. pneumoniae*. Uma hipótese foi levantada por LIVERMORE *et al.*, (1995) onde sugerem que o gene precursor LEN-1, possuindo localização cromossomal, ao sofrer mutação, tornando-se o gene SHV-1, tenha evoluído e sido incorporado em plasmídeos e assim adquirido a capacidade de se transferir entre espécies.

As variantes do tipo SHV diferem das variantes TEM pois contêm poucas variações de sua enzima originária SHV-1 e sim, surgindo de substituições em posições específicas dos aminoácidos que constituem a enzima (GHAFOURIAN *et al.*, 2014). Quinze anos após o primeiro isolamento desta enzima, encontra-se disseminada por vários países (KNOTHE *et al.*, 1983; BONOMO *et al.*, 2003; ARPIN *et al.*, 2009; DOIT *et al.*, 2010; POIREL *et al.*, 2012).

Já foram descritas mais de 190 variantes destas enzimas, sendo em grande maioria encontradas em isolados clínicos, mas também em águas de rios e lagos, efluentes domiciliares, industriais e hospitalares (BRÉCHET *et al.*, 2014; SOUNA *et al.*, 2014; <http://www.lahey.org/studies/>). Estudos demonstraram haver relação epidemiológica entre variantes enzimáticas da família SHV e TEM através de surtos em diferentes regiões do mundo (BAGATTINI *et al.*, 2006).

A pressão seletiva exercida pela utilização de cefalosporinas de primeira e segunda geração ocasionou o surgimento da enzima CTX-M nos anos iniciais da década de 1990 em cepas de *E. coli* (BAUERFEIND *et al.*, 1990). Logo propagou-se e no início dos anos 2000 já era descrita em outras bactérias (ARPIN *et al.*, 2009) e atualmente é entre as ESBLs, a enzima mais frequentemente encontrada no mundo (WOERTHER *et al.*, 2013).

Em referência à cefotaxima e por hidrolisar preferencialmente este antimicrobiano, a enzima foi denominada CTX-M-1 e primeiramente encontrada na Alemanha (BAUERNFEIND *et al.*, 1990), posteriormente encontrada na Argentina e Uruguai, onde ao ser sequenciada, adotou-se o termo CTX-M-2 (BAUERNFEIND *et al.*, 1996) e nos dias atuais é considerada endêmica (DROPA *et al.*, 2010; RAMOS *et al.*, 2014).

O gene responsável pela síntese desta enzima está localizado em plasmídeos e transposons (D'ANDREA *et al.*, 2013) e confere resistência a todas cefalosporinas de espectro estendido, atuando principalmente contra cefotaxima e ceftriaxona (LIVERMORE *et al.*, 2008;). Sem conter relação com as famílias TEM e SHV, e ao contrário delas, seu surgimento não envolve mutações pontuais e acredita-se que se originou de outra *Enterobacteriaceae* comum na natureza, *Kluyvera* sp., e sua transferência tenha se dado horizontalmente e através de conjugação bacteriana (BRADFORD, 2001; HUMENIUK *et al.*, 2002; OLSON *et al.*, 2005).

No Brasil, as variantes CTXM-2, CTXM-8, CTXM-9 e CTX-M-15 são as mais usualmente relatadas (PICÃO *et al.*, 2009; ANDRADE *et al.*, 2010; CERCOLENOVELLA *et al.*, 2010; CLÍMACO *et al.*, 2010; TOLLENTINO *et al.*, 2011). Surtos relacionados a clones do gene CTXM-15 são descritos no mundo todo, evidenciando a importância epidemiológica desta variante e a disseminação destes clones através

do ambiente para diversos continentes e países (AL-AGHAMI *et al.*, 2009; PEIRANO *et al.*, 2010; FAM *et al.*, 2011; JOHNSON *et al.*, 2012; OLESEN *et al.*, 2013).

3.4.4 Família Carbapenemase

Enzimas versáteis responsáveis por grandes surtos de elevadas taxas de mortalidade, são β -lactamases que apresentam uma amplitude de espectro de ação maior que as ESBL, hidrolisando fármacos betalactâmicos e inibidores de β -lactamases de espectro estendido (LIVERMORE e WOODFORD, 2006; WALTHER-RASSMUSSEN e HOIBY, 2006). Estão distribuídas nos grupos A, B e D de Ambler e nos grupos funcionais 2df, 2f, 3a e 3b de Bush, Jacoby e Medeiros (AMBLER, 1980; QUEENAM e BUSH, 2007; BUSH e FISHER, 2011).

3.4.5 Carbapenemases classe A

As carbapenemases da classe molecular A apresentam serina em sua composição e são denominadas serina carbapenemases, estando inseridas no grupo funcional 2f de BUSH, JACOBY, MEDEIROS. Seu espectro de ação engloba antimicrobianos como as penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e monobactâmicos (AMBLER, 1980; BUSH; JACOBY, 2010; DJAHMI *et al.*, 2014). São as mais encontradas entre todas as classes e largamente distribuídas entre diversos filos (WALTHER-RASSMUSSEN e HOIBY, 2006).

A enzima Guiana Extend-Spectrum (GES) é classificada como carbapenemase de classe A e grupo funcional 2f, tendo ação inibitória contra os fármacos inibidos comumente pelas carbapenemases. Sofre pouca inibição por parte dos antimicrobianos ácido clavulânico e tazobactam, além de ser resistente ao EDTA (AMBLER, 1980; BUSH; JACOBY, 2010; DJAHMI *et al.*, 2014). Proveniente de uma ESBL, GES-1 sofreu mutação dando origem à GES-2. Estudos de cinética demonstraram que a GES-2, mesmo tendo baixo poder hidrolítico sobre o imipenem ainda assim apresenta potência dez vezes maior do que a GES-1 sobre este antimicrobiano (NORDMANN e POIREL, 2010; QUEENAM e BUSH, 2007).

Os genes codificantes destas enzimas se localizam em elementos genéticos móveis contendo sequências de inserção, podendo se localizar em plasmídeos transferíveis ou em regiões não transferíveis (ANDRADE, 2011;

MARTÍNEZ-MARTÍNEZ; GONZÁLEZ-LÓPEZ, 2014). As variantes GES-5, GES-6 e GES-14 são de maior interesse clínico pois apresentam maior capacidade hidrolítica sobre os antimicrobianos da família dos carbapenêmicos (BAE *et al.*, 2007; BONNIN *et al.*, 2011) e os tipos GES-9 e GES-11 apresentam elevada resistência ao aztreonam e ceftazidima (MOBARECK *et al.*, 2009; BOGAERTS *et al.*, 2010).

Os continentes Europeu, Africano e Asiático são os locais com maiores índices de GES, mas surtos de infecções causadas por esta enzima já foram notificados em outras localidades (WALTHER-RASSMUSSEN e HOIBY, 2006).

A enzima *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) é uma carbapenemase de classe A de Ambler e pertence ao subgrupo 2f de BUSH, JACOBY e MEDEIROS e é a mais comum neste grupo. Inibe a ação de antimicrobianos betalactâmicos e carbapenêmicos e se dissemina muito facilmente através de transposons e plasmídeos (POIREL e NORDMANN, 2010; ROBLEDO e AQUINO, 2011). Mais relacionada às cepas de origem nosocomial, esta enzima é transferida entre as enterobactérias que contenham o gene *bla_{KPC}*, o qual também sofreu transferência de cepas de *K. pneumoniae* para outras enterobactérias (NORDMANN *et al.*, 2011; MARSH *et al.* 2015).

O primeiro caso de isolamento deste gene ocorreu em meados da década de 1990 e apresentava resistência para carbapenêmicos como imipenem e meropenem. Desde então, clones e novas cepas, além de outras espécies bacterianas, foram documentados como portadoras do gene *bla_{KPC}*. Mas foi a partir de 2005 que a disseminação do gene *bla_{KPC}* para outros continentes se acentuou e atualmente há endemicidade em diversos países (YIGIT *et al.*, 2001; CUZON *et al.*, 2010). No continente Sul-Americano, a primeira descrição de um isolado de *K. pneumoniae* produtora de KPC-2 aconteceu na Colômbia em 2006 (BEIRÃO *et al.* 2010). No mesmo ano no Brasil, os primeiros casos de KPC-2 foram relatados em pacientes em unidades de tratamento intensivo (MONTEIRO *et al.*, 2009). Essa disseminação atingiu também o meio ambiente, Oliveira *et al.*, 2012 descreveram isolados contendo o gene *bla_{KPC}* em rios de São Paulo.

A primeira variante da KPC-1, foi denominada de KPC-2, variante com diferenças nos níveis de eficiência hidrolítica aos betalactâmicos (NORDMANN *et al.*, 2009; CHEN *et al.*, 2012). O gene *bla_{KPC-2}* está associado a plasmídeos e

transposons com elevadas taxas de replicação (CUZON *et al.*, 2010) e é eficiente contra todas as classes de betalactâmicos (BUSH e FISHER, 2011). SHEN *et al.* (2009) encontraram outra forma de disseminação do gene *bla_{KPC}*. Através de hibridização de diferentes tipos de transposons, observou-se que este gene já consegue ser transferido entre espécies e cepas bacterianas distintas. A variante KPC-2 é a mais disseminada no mundo, assim como no Brasil (MONTEIRO *et al.*, 2009; WALSH *et al.*, 2011; ANDRADE *et al.*, 2011; PEREIRA *et al.*, 2013).

A mortalidade e morbidade associadas à *K. pneumoniae* carbapenemase se tornaram graves nos últimos anos. Bacteremias ligadas à KPC atingem taxas de até 50% em pacientes imunodeprimidos (BEN-DAVID *et al.*, 2012). Por conter altos índices de resistência ao carbapenêmicos, a opção terapêutica para casos de infecção por bactérias que contenham esta enzima são os antimicrobianos polimixina e tigeciclina (PATERSON e BONOMO, 2005), mas estudos já relatam resistência até mesmo a este antimicrobianos (CECARELLI *et al.*, 2013).

3.4.6 Carbapenemase de classe B

As Metallo- β -lactamases (MBL) são enzimas dependentes de Zinco como cofator enzimático e são capazes de degradar betalactâmicos, impedindo que se liguem às subunidades ribossomais. Hidrolisam os anéis betalactâmicos através de ligação de uma hidroxila ao grupo amida, causando inativação de antimicrobianos como penicilinas, cefalosporinas, além de inativar tazobactam, ácido clavulânico e sulbactam, agentes inibidores das β -lactamases (BUSH, 2001; SADER, 2005; GUPTA, 2008; BUSH e JACOBY, 2010).

Os genes responsáveis pela codificação das MBLs têm localização cromossomal e plasmidial, podendo ser intrínsecos ou adquiridos, capacitando a disseminação e transferência destas enzimas (PICÃO, 2006). As MBLs com origem plasmidial têm como principais representantes as enzimas Verona Imipenemase (VIM), Imipenemase (IMP), New Delhi Metallo- β -lactamases (NDM-1) e São Paulo Metallo- β -lactamase (SPM-1) (QUEENAM e BUSH, 2007; FAZELI *et al.*, 2015).

A enzima Imipenemase (IMP) foi a primeira MBL a ser identificada e descrita. Encontrada na Ásia na década de 1980 e denominada de IMP-1 (WATANABE *et al.*, 1991) sofreu modificações, originando a IMP-2 e atingiu

propagação a nível mundial através de cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, tendo sido descritos mais de 23 tipos distintos de IMP (LAHEY, 2007; WALSH *et al.*, 2011; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ; GONZÁLEZ-LÓPEZ, 2014).

Conhecida como MBL Europeia, por ser frequentemente descrita em países deste continente, a Verona imipenemase foi descrita primeiramente em 1997 na cidade de Verona na Itália, rapidamente tornou-se a mais descrita dentre as MBLs (POIREL *et al.*, 2000; DJAHMI *et al.*, 2014). A variante seguinte descoberta foi a VIM-2 e dentre as variantes é mais comumente relatada (MAVROIDI *et al.*, 2000).

A enzima SPM-1 foi originalmente descrita em *P. aeruginosa* e se restringia ao continente Sul-Americano (SADER *et al.*, 2005; SALABI *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2014). Tornou-se endêmica no Brasil devido à clonalidade de um único gene e tem como característica elevadas taxas de resistência à ceftazidima (TOLEMAN *et al.*, 2002; GALES *et al.*, 2003; PICÃO *et al.*, 2009).

Associada ao gene *bla_{spm-1}*, foi sugerido que este gene teria sido transferido de outra bactéria para *P. aeruginosa* por conter vantagens adaptativas e/ou a ocorrência de otimização genética para suprir a necessidade do hospedeiro (GONZÁLEZ *et al.*, 2014).

No final da primeira década dos anos 2000 foi descrita a descoberta de uma nova variante de MBL em uma cepa de *K. pneumoniae*, a New Delhi Metallo- β -lactamase (YONG *et al.*, 2009). Os genes desta enzima podem ser encontrados em cromossomos, como no caso da *A. baumannii*, e em plasmídeos nas enterobactérias (DORTET *et al.*, 2014).

A Índia é o país onde mais são descritos casos envolvendo NDM, onde são ligadas a cepas de *E. coli*, *A. baumannii* e *K. pneumoniae*, mas esta enzima já propagou-se para todos continentes e no Brasil o primeiro caso foi descrito em 2013, no Rio Grande do Sul e por ser clinicamente a mais importante das MBLs, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária se viu forçada a lançar programas e guias de esclarecimento e procedimentos a serem adotados em caso de infecções por NDM (ANDRADE, 2011; DJAHMI *et al.*, 2014; DORTET *et al.*, 2014).

3.4.7 Carbapenemase de Classe D

As enzimas da classe D são semelhantes às enzimas de classe A por conterem serina. Carbapenemases denominadas mais comumente como oxacilinas (OXAs) mas também conhecidas como enzimas hidrolisantes de carbapenêmicos (CHDLs), estão inseridas no grupo funcional 2df, hidrolisando oxacilina ou cloxacilina e carbapenêmicos, mas para estes, quando comparada às demais classes, apresentam baixa capacidade de hidrólise de carbapenêmicos. Os inibidores de β -lactamases ácido clavulânico e tazobactam demonstram resultados variáveis em sua efetividade para as OXAs e sabe-se que o EDTA não apresenta nenhuma atividade inibitória contra elas (AMBLER, 1980; BUSH; JACOBY, 2010; POIREL *et al.*, 2012; DJAHMI *et al.*, 2014).

Já foram descritas 498 variantes desta enzima (<http://www.lahey.org/studies>). Atualmente as enzimas OXA são divididas em seis grupos; tipo *bla*_{OXA-23}, tipo *bla*_{OXA-24/40}, tipo *bla*_{OXA-58}, *bla*_{OXA-143}, *bla*_{OXA-48} e tipo *bla*_{OXA-51} (MERKIER e CENTRON, 2006; EVANS e AMYES, 2014). Apesar do grupo *bla*_{OXA-51} ser o que compreende o maior número de variantes, as enzimas *bla*_{OXA-48} e *bla*_{OXA-23} são a de maior relevância clínica (POIREL *et al.*, 2010; ROZALES *et al.*, 2013; EVANS e AMYES, 2014).

A enzima OXA-48 é a mais clinicamente significativa e foi primeiramente encontrada em *K. pneumoniae* em 2003 na Turquia e a partir daí disseminou-se para o resto da Europa, atingindo todos continentes (POIREL *et al.*, 2004; POIREL *et al.*, 2011; ROZALES *et al.*, 2013). Esta enzima não sofre ação do ácido clavulânico ou tazobactam e tem a capacidade de hidrolisar penicilinas, e de maneira menos eficaz, os carbapenêmicos, aztreonam e cefalosporinas e sua resistência é dependente de mecanismos conjuntos. Dentre as carbapenemases é a que apresenta maior dificuldade de identificação e quando encontradas, geralmente estão associadas a *Acinetobacter* spp., *Pseudomonas aeruginosa* e algumas enterobactérias (POIREL *et al.*, 2010; NORDMANN *et al.*, 2011; DJAHMI *et al.*, 2014).

A OXA-23 é responsável por muitos surtos em nível global e a geração de clones disseminados em ambiente hospitalar no Brasil é preocupante porque esta variante consegue resistir à ação dos carbapenêmicos e sofre pouca inibição dos

antimicrobianos imipinem e meropenem (CARVALHO *et al.*, 2009; MENDES *et al.*, 2009; EVANS e AMYES, 2014). Através de esgotos hospitalares, estas enzimas atingem as águas e se disseminam, contaminando o meio ambiente (FERREIRA *et al.*, 2011; CHAGAS *et al.*, 2014).

3.4.8 Resistência às polimixinas pelo gene *mcr-1*

As polimixinas são atualmente os antimicrobianos considerados a última linha de combate contra enterobactérias resistentes a carbapenêmicos disponíveis no mercado (LI *et al.*, 2006).

O gene *mcr-1* foi recentemente descrito em *Enterobacteriaceae* provenientes de amostras de ração de animais, restrito às bactérias *Escherichia coli* e posteriormente em alimentos e isolados clínicos. Este gene é capaz de produzir uma enzima com a capacidade de alterar o sítio de ligação do antimicrobiano polimixina no lipídio de membrana A através da adição de uma fosfoetanolamina, impedindo que a polimixina atue sobre a bactéria (LIU *et al.*, 2016; NORDMANN e POIREL, 2016).

Estudos atuais já descrevem a transmissão plasmidial do gene *mcr-1* entre espécies e achados de cepas multirresistentes de *K. pneumoniae* abrigando o gene *mcr-1* concomitantemente ao gene KPC, denominado de *mcr-1,2* (DI PILATO *et al.*, 2016). Assim como YAO *et al.* (2016) relataram isolados de *E. coli* portadora do gene *mcr-1* e NDM-9 localizados em plasmídeos provenientes de amostras de frango na China.

A disseminação deste gene a partir de países Asiáticos já demonstra índices globais, havendo descrições de isolados contendo o gene *mcr-1* em diversos continentes e países, agravando ainda mais as taxas de resistência a antimicrobianos e elevando os riscos de utilização desenfreada de antimicrobianos. (HASMAN *et al.*, 2015; ARCILLA *et al.*, 2016; DU *et al.*, 2016; HAENNI *et al.*, 2016; OLAITAN *et al.*, 2016). No Brasil, o gene *mcr-1* já foi descrito em amostras de animais de produção e rações, constatando que a utilização deste antimicrobiano pela indústria veterinária e agropecuária é um fato a ser observado com atenção (LENTZ *et al.*, 2016; FERNANDES *et al.*, 2016).

3.5 PCR em tempo real com curva de desnaturação de alta resolução (HRM)

O PCR real time multiplex é uma técnica de análise molecular que possibilita a detecção simultânea de diversos genes e patógenos. Permite, em tempo real, ciclo a ciclo, a detecção das sequências do DNA alvo com liberação de fluorescência que é mensurada por intensidade, gerando picos de leitura à medida que os produtos são gerados pela reação. Sem necessidade de manuseio posterior à amplificação, os resultados obtidos conforme são encontrados os genes auxiliam na rapidez da análise (VALASEK e REPPA, 2005; KUBISTA *et al.*, 2006).

O HRM possibilita a realização de análises fenotípicas através da leitura de curvas contendo a concentração dos produtos gerados através de lento derretimento dos produtos da amplificação do DNA. A genotipagem não requer a utilização de sondas e marcadores, tornando as variantes das sequências analisadas distinguíveis entre si, baseando-se nas diferenças de temperatura de fusão de cada uma. É considerado um método mais sensível, específico e reprodutível para a quantificação e detecção de DNA e RNA (MENDES *et al.*, 2007; REED *et al.*, 2007; RAMIREZ *et al.*, 2010; CHROMÁ *et al.*, 2011).

A metodologia usada na identificação dos amplicons não se restringe às sequências contendo grandes quantidades de pares de base, mas também para variações em pares de base mínimos como o *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNP). Os dados coletados apresentam maior reprodutibilidade pois são coletados na fase exponencial, onde a variabilidade é menor quando comparada com as outras fases. Além disso, o risco de contaminação é menor se comparado ao PCR tradicional pois os tubos das reações não são abertos durante todo o processo (LOGAN *et al.*, 2009).

3.6 ERIC-PCR (*Enterobacterial repetitive intergenic consensus*)

Versalovic foi o responsável pela criação da técnica de ERIC-PCR em 1991, utilizando-se de oligonucleotídeos específicos para testes em eubactérias através da reação de cadeia da polimerase (PCR).

Sequências curtas e altamente conservadas compõem o *Enterobacterial repetitive intergenic consensus* (ERIC). Encontrada originalmente em *E. coli* e

Salmonella enterica, é uma ferramenta útil para análise de variabilidade e clonalidade genética de cepas bacterianas (VERSALOVIC *et al.*, 1991). As sequências ERIC estão localizadas em regiões intergênicas compostas por palíndromos de 127 pares de base (SHARP, 1997), regiões transcritas e não codificadoras do cromossomo, podendo ocasionalmente ser encontradas em operons com variação de posição em relação à localização do promotor ou terminador nas diferentes repetições, regulando a expressão de genes associados e transcrevendo pequenas partes destas sequências na forma de mRNA, mantendo a estabilidade do mesmo (NEWBURY *et al.*, 1987; SHARPLES e LLOYD, 1990; VERSALOVIC *et al.*, 1991; WILSON e SHARP, 2006).

A técnica de ERIC-PCR é baseada na amplificação destas regiões intergênicas distribuídas ao longo do genoma. Cada bactéria difere pela frequência de repetição destas regiões, gerando padrões característicos de bandas no gel de eletroforese. Os oligonucleotídeos são desenhados para que consigam se ligar a estas regiões e amplificá-las quando submetidos à reação em cadeia de polimerase (HULTON *et al.*, 1991; VERSALOVIC *et al.*, 1994).

Assim, essas análises têm como objetivo o estudo de divergência genética e possíveis agrupamentos de espécies e subespécies dos microrganismos de interesse (SILVA, 2014), além de possibilitar a aplicação em estudos populacionais sem o conhecimento prévio de sequências genômicas e de rápidas investigações de disseminações gênicas em casos de surtos bacterianos (COSTA *et al.*, 2011; HANADA e GARCIA, 2013; MARTINS, 2014; BALSALORE, 2014; CANAL *et al.*, 2016; OLIVEIRA *et al.*, 2016).

3.7 Tipificação por espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser- assistida por matriz MALDI – TOF MS (*Matrix - Assisted Laser Desorption - Ionization Time of Flight Mass Spectrometry*).

A metodologia de espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser- assistida por matriz (MALDI–TOF) é baseada na determinação entre carga e massa (m/z) de moléculas submetidas à ionização em fase gasosa, onde o espectrômetro de massa é composto por uma fonte geradora de íons, analisador e detector de massas e um sistema capaz de captar e processar os dados obtidos. A

fonte que gera a ionização da amostra é a matriz de ionização e dessorção a laser ou MALDI. A técnica é capaz de detectar espectros de proteínas que geram padrões capazes de identificar e quantificar compostos desconhecidos e discriminar gêneros e espécies relacionadas (TANAKA *et al.*, 1988; CANTÚ e CARRILHO, 2008).

Para determinar os espectros de análise, os microrganismos podem ser cultivados em diferentes meios de cultura e duas técnicas de identificação são utilizadas. Na técnica de transferência direta o preparo da placa pode ser realizado com a colônia da bactéria sendo transferida para uma placa de análise do equipamento sem utilização de reagentes e analisada diretamente e na técnica de extração as proteínas ribossomais são extraídas previamente através de um protocolo que utiliza etanol e ácido fórmico, para então serem transferidas para a placa de análise (SENG *et al.*, 2009; CROXATTO *et al.*, 2012; CHEN *et al.*, 2013).

A matriz utilizada nas reações absorve a luz do laser emitido e ocorre a dessorção, Campos elétricos gerados conduzem os íons para o espectrômetro de massa, essa condução iônica é denominada de tempo de voo, e durante esse período ocorrem as separações dos íons conforme suas massas e cargas elétricas (m/z) e então, a quantidade específica de cada íon é medida e transformada em perfis que são comparados com espectros de referência provenientes de bancos de dados, através da criação de algoritmos pertencentes ao software Biotyper (TANAKA *et al.*, 1988; KEYS *et al.*, 2004).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Todos experimentos do presente estudo foram realizados no laboratório 222F do setor de Bacteriologia do departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia localizado no Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

4.1 Meios de cultura e soluções

Os meios de cultura e soluções utilizados nos experimentos deste trabalho estão descritos nos anexos.

4.2 Área de estudo

A laguna de Tramandaí situa-se entre os municípios de Tramandaí e Imbé no litoral norte do estado do Rio Grande do Sul. Com 18,5 Km², pertence à bacia hidrográfica do Rio Tramandaí que abrange uma área aproximada de 2700 km, sendo 115 km de faixa litorânea. A laguna juntamente com o rio formam uma ligação com o mar e em conjunto com a Lagoa do Armazém formam o complexo lagunar Armazém-Tramandaí. Este é subdividido em Sistema Norte e Sul. As águas dos dois sistemas desembocam na laguna Tramandaí e levam consigo nutrientes e sedimentos, tornando o estuário do Rio Tramandaí propício ao crescimento e manutenção de diversas formas microbianas (CASTRO e MELLO, 2013).

As águas da Laguna de Tramandaí são utilizadas principalmente para abastecimento das populações residentes nos municípios de Tramandaí e Imbé, além da produção agrícola e agropecuária. Em tempos de veraneio, a população de Tramandaí que é estimada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) 2016 em 46.000 habitantes, torna-se flutuante e pode atingir 95.000 habitantes. O município de Imbé possui 20.000 habitantes (IBGE, 2016), podendo atingir em alta temporada, 61.000 habitantes (CASTRO e MELLO, 2013; ZUANAZZI e BARTELS, 2016).

Este acréscimo populacional considerável faz uso das águas da laguna e o aumento na urbanização e consequente aumento na liberação de esgotos residenciais traz consigo alterações no meio ambiente lagunar (LANZER *et al.*,

2013). Somando-se a isto, a precariedade das condições de saneamento básico e a atividade agrícola de parte da população adjacente à laguna, auxiliam nos níveis de poluição da Laguna de Tramandaí (LEMOS e TERRA, 2003).

4.3 Pontos de Coleta

As amostragens foram realizadas em agosto de 2014 e em janeiro de 2015. Para a coleta do material foram selecionados quatro pontos distintos (figura 1), com diferentes graus de impacto ambiental:

Ponto 1 (29°58'34.6"S; 50°07'19.0"W), situado junto à desembocadura da laguna e mais próximo do mar e, portanto, com altos níveis de salinidade, junto a um terminal marítimo de exploração de petróleo. É a foz do estuário, apresenta elevado índice de urbanização (1).

Ponto 2 (29°57'52.0"S; 50°08'15.6"W), mais distante da influência das correntes marinhas, mas com alto índice de urbanização, localiza-se próximo a um trapiche localizado na saída de um condomínio residencial de Imbé e contém menor grau de salinidade (2).

Ponto 3 (29°58'00.3"S; 50°09'33.0"W), localizado centralmente à Laguna. Local sem influência de urbanização e confluenta em relação às águas de toda a bacia, contendo baixos níveis de salinidade (3).

Ponto 4 (29°57'52.5"S; 50°08'15.7"W), foi estabelecido próximo às margens onde cresce mata nativa, mas sofre influência de plantações agrícolas e atividade agropecuária. As águas deste ponto apresentam salinidade reduzida (4).

As amostras foram coletadas com o auxílio do barco de coletas do Centro de Estudos Costeiros, Limnológicos e Marinhos (CECLIMAR) da UFRGS. Foram coletados 2L de água em frascos de vidro estéreis através de corda contendo 1 metro de comprimento para possibilitar a captação de amostras de águas subsuperficiais em cada ponto amostral. As amostras foram armazenadas a 4°C até a análise microbiológica, realizada nas 24 horas posteriores às coletas.



Figura 1. Localização dos pontos de coleta de água na Lagoa Tramandaí. **Ponto 1:** foz do estuário, onde há maior salinidade e acentuada urbanização. **Ponto 2:** trapiche de um condomínio de Imbé, ponto interno da lagoa, onde ainda há acentuada urbanização, porém as águas geralmente têm menor salinidade. **Ponto 3:** meio da Lagoa. **Ponto 4:** margem da lagoa e salinidade reduzida.

4.4 Isolamento e Identificação de *Klebsiella* sp.

Para o isolamento das *Klebsiella*, em cada ponto amostral e respectivas coletas, 100 mL das amostras foram coletadas e filtradas com membranas de nitrocelulose com porosidade de 0,45 μm de diâmetro (S&S). Em seguida, as membranas foram depositadas em placas de Petri com Ágar LES M-ENDO (Himedia) e incubadas em estufa por 24 h a 35 °C e 45 °C (MCCARTHY *et al.*, 1961;

EATON *et al.*, 2005 e KIM & FENG, 2001). Foram selecionadas para isolamento bactérias fermentadoras de lactose. Paralelamente, outra parte das membranas foi cultivada em água peptonada por 24 h a 37 °C. Os cultivos foram serialmente diluídos e semeados em Ágar MacConkey (KASVI) por 24 h a 37 °C. As bactérias fermentadoras de lactose também foram selecionadas, isoladas e mantidas em ágar conservação para estudos posteriores.

Para a identificação bioquímica de *Klebsiella* sp. foram feitos os seguintes testes bioquímicos com os isolados lactose positivo:

- Isolamento em ágar eosina azul de metileno (EMB);
- Crescimento em ágar MIO (motilidade, indol, ornitina)
- Ágar ferro lisina (LIA)
- Caldo uréia

4.5 Identificação bacteriana por MALDI – TOF MS (*Matrix - Assisted Laser Desorption - Ionization Time of Flight Mass Spectrometry*).

A partir do ágar conservação, os isolados foram cultivados a 35°C por 24h em caldo BHI para recuperação dos mesmos. No dia seguinte, foram semeados em ágar TSA e incubados a 37°C por 18h. Após, uma única colônia de cada isolado foi retirada do ágar TSA e passou por processo de extração e transferida para os *spots* na placa alvo do MALDI-TOF. Posteriormente, foi adicionado sobre cada *spot* 1 µl de solução matriz HCCA e esperou-se secar a temperatura ambiente. Em seguida a placa foi colocada no Microflex LT/SH (BrukerDaltonics) e a identificação molecular dos isolados foi realizada pelo software MALDI Biotyper 4.0 com base nos perfis gerados. Os isolados foram considerados corretamente identificados ao nível de gênero quando os escores foram $\geq 1,7$ e em nível de espécie, quando os escores foram ≥ 2 .

4.6 Análises de suscetibilidade a antimicrobianos

A resistência a 19 antimicrobianos foi determinada pelo Método disco difusão Kirby-Bauer em ágar Müller-Hinton (CLSI, 2014) (Tabela 1). Os isolados

bacterianos foram suspensos em solução salina 0,9% até atingir a turbidez 0,5 da escala de MacFarland e em seguida semeados em placas de ágar Müller-Hinton.

Tabela 1: Antimicrobianos utilizados para análise de perfil de susceptibilidade

Antimicrobianos	Penicilinas (30 µg)	Cefalosporinas (30 µg)	Monobactâmico (30 µg)	Carbapenêmicos (10 µg)
		Ampicilina Amoxicilina Piperacilina/ tazobactam	Ceftazidima Cefotaxima Cefepima Cefoxitina	Aztreonam
Fluoroquinolonas (10 µg) (Oxoid®)	Ciprofloxacino Norfloxacino			
Aminoglicosídeos (30 µg) (Oxoid®)	Gentamicina Amicacina Espectinomicina			
Tetraciclina (30 µg) (Oxoid®)	Tetraciclina			
Sulfonamidas (25 µg) (Oxoid®)	Cotrimoxazol			
Fenicóis (30 µg) (Oxoid®)	Cloranfenicol			
Polimixinas (10 µg) (Oxoid®)	Polimixina B			

Posteriormente, as placas foram incubadas em estufas a 35C⁰ por 24 horas. Foram utilizados antimicrobianos de 10 classes distintas e isolados resistentes a pelo menos duas classes foram considerados multirresistentes (CSLI, 2014). A leitura dos resultados da susceptibilidade aos antimicrobianos foi realizada medindo-se (em milímetros) o tamanho dos halos de inibição do crescimento bacteriano com uma régua, sendo a cepa bacteriana classificada em resistente, intermediária ou sensível em função do diâmetro da zona de sensibilidade padrão estabelecida para cada antimicrobiano (CLSI, 2014). Foi utilizada a cepa *E. coli* ATCC 25922 como controle.

Os isolados que apresentaram resistência a cefalosporinas de terceira geração foram testados para perfil de ESBLs através da técnica de disco combinado com os antimicrobianos ceftriaxona, ceftazidima, cefotaxima e aztreonam. Estes

discos foram pareados em ágar Muller-Hinton previamente inoculados com os isolados resistentes suspensos em salina 0,9 com turbidez 0,5 de MacFarland. Foram adicionados 10 µL de ácido clavulânico 3% em cada um dos discos de antimicrobianos e na placa foram adicionados e pareados os discos de antimicrobianos com e sem a adição de ácido clavulânico 3% para comparação dos diâmetros dos halos de inibição. Incubação foi procedida a 35°C por 24 horas. A positividade para produção de ESBLs se deu quando os discos de antimicrobianos contendo ácido clavulânico apresentaram halos de inibição 5mm maiores do que os discos sem adição de ácido clavulânico (CARTER, 2000).

4.7 Análises de fatores de virulência

4.7.1 Cápsula polissacarídica (CPS)

Os isolados foram analisados quanto à produção de cápsula, utilizando-se coloração diferencial com tinta Nanquin. A CPS impede que a tinta penetre na célula, formando halos de região clara ao redor da bactéria (MADIGAN *et al.*, 2010).

Primeiramente os isolados foram cultivados em caldo TSB por 24 horas a 37°C. Posteriormente procedeu-se o esfregaço dos isolados utilizando-se tinta Nanquin. Após período de secagem em temperatura ambiente foi adicionada Fucsina de Gram a 1% para coloração da bactéria no interior da cápsula corada.

Os resultados foram observados em microscópio ótico 100x. As bactérias que apresentaram formação de cápsula demonstraram halos claros ao redor da bactéria de coloração rósea. A cepa ATCC *K. pneumoniae* 700603 foi utilizada como controle positivo.

4.7.2 Fímbrias

A expressão de fimbria tipo 1 foi analisada através da utilização de mananoligossacarídeo comercial (MOS) (Actigen/Alltech) que apresenta elevada afinidade por bactérias Gram negativas que contenham fímbrias do tipo 1 devido à presença de manose.

Os isolados de *Klebsiella* foram cultivados em caldo BHI por 3 horas e após este período, semeou-se em ágar CFA por 24 horas a 37°C. As colônias foram retiradas do ágar CFA e suspensas em salina 0,5 de McFarland.

Em placas de 96 poços foram adicionados em cada poço 50 µl da solução de MOS (0,3% em salina) e 50 µl de solução de suspensão bacteriana com 50 µl de salina. Como controle positivo foi utilizada a cepa *E. coli* ATCC 25922 e para o controle negativo 100 µl de salina não inoculada e 50 µl de solução de MOS. Após este procedimento, levou-se à 4^oC por 24 horas. Os resultados foram lidos em microscópio ótico em aumento de 100x. A formação de grumos evidenciou positividade para produção de fímbrias do tipo 1.

4.7.3 Biofilme

A formação de biofilme foi analisada através de espectrofotometria utilizando-se placas de microtitulação de 96 poços e seguindo-se o protocolo de GUIMARÃES *et al.*, 2012. Os isolados de *Klebsiella* foram semeados em ágar TSA por 24 horas e incubados à 37^oC. Posteriormente foram suspensos em solução salina (escala 0,5 de McFarland) e distribuídos em microplacas de 96 poços em octoplicatas contendo 20 µl de salina inoculada e 180 µl de caldo TSB. O controle positivo foi composto por 180 µl de caldo TSB e 20 µl de salina com *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 e o controle negativo com 180 µl de caldo TSB e 20 µl de salina não inoculada. A placa foi incubada a 37^oC por 24 horas.

Após período de incubação, aspirou-se a solução contida em cada poço e lavou-se os poços com salina por 3 vezes. Foram adicionados 200 µl de metanol (P.A.) em cada poço e deixado em temperatura ambiente por 15 minutos. Aspirou-se o metanol, adicionou-se cristal violeta a 1% em cada poço e a placa ficou em repouso por 5 minutos. Após este breve período, lavaram-se os poços com água destilada. Procedeu-se a adição de 160 µl de etanol por poço e novamente deixou-se em repouso por 30 minutos e após aspirou-se o etanol e procedeu-se a leitura em espectrofotômetro EPOCH® utilizando-se comprimento de onda de 570 nm.

Com os resultados obtidos pela leitura do espectrofotômetro foram feitas médias da densidade ótica de cada isolado (MDOI) e comparado com a média da densidade ótica dos controles negativos (MDO (-)). Utilizou-se classificação de grau de formação de biofilme dividida em não formador de biofilme ($MDOI \leq MDO (-)$), fracamente formador ($MDO (-) \leq MDOI \leq 2MDO (-)$), moderadamente formador ($2MDO$

(-) \leq MDOI \leq 4MDO (-) e fortemente formador (4MDO (-) \leq MDOI) (STEPANOVIC *et al.*, 2000; ZIECH, 2015).

4.7.4 Resistência bacteriana ao soro humano

As amostras de sangue utilizado para os testes foram obtidas de indivíduos hígidos e posteriormente à coleta manteve-se em repouso por 15 minutos a 37^oC para coagulação. O sangue foi centrifugado a 4000 rpm por 10 minutos. Retirou-se o soro e levou-se para resfriamento a 4^oC por 1 hora. Foram feitas alíquotas de 2 ml e estocado a -20^oC.

Os isolados foram semeados em caldo TSA por 24 horas a 37^oC. Os isolados foram suspensos em salina na concentração escala McFarland 0,5. Um volume de 100 μ l das suspensões bacterianas foi homogeneizado com 100 μ l de soro humano previamente citado. Em placas de 96 poços foram feitas concentrações de 0,1 a 50%. Incubou-se por 1 hora a 37^oC e posteriormente alíquotas de 10 μ l e 100 μ l foram retiradas e submetidas a espalhamento em placas contendo ágar BHI. Incubou-se novamente a 37^oC por 24 horas. Considerou-se isolado resistente ao soro aquele que não sofreu redução maior que 90% de unidades formadoras de colônia (UFCs) em relação ao controle.

4.7.5 Produção de sideróforos

Para a análise de produção de aerobactina, foi utilizado o protocolo de CARBONETTI e WILLIAMS, (1985). Os isolados foram inoculados com o auxílio de palitos de madeira estéreis em placa contendo 1,3 ml de meio M9 15x com 2,2 bipyridina 200 μ M e 20 ml de ágar-ágar 2%, seguido de incubação por 24 horas a 37^oC.

Após indução da produção de aerobactina, as colônias foram repicadas para outra placa contendo os mesmos reagentes com a inclusão de 0,1ml de cultura indicadora *E. coli* 2470. As leituras dos resultados foram realizadas após 24 horas de incubação a 37^oC. A positividade para produção de aerobactina foi estabelecida pelo crescimento da amostra *E. coli* 2470 ao redor da inoculação dos isolados.

4.7.6 Amplificação dos genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} e *bla*_{CTX-M} através de PCR

O processo de extração do DNA seguiu o protocolo estabelecido por COOMBS *et al.* (1999) com adaptações. Os isolados foram semeados em ágar TSA por 24 horas a 37°C anteriormente ao processo de extração. Para cada isolado foram utilizados microcubos que continham 200 µL de Chelex 100 com a adição de 2 µL de proteinase K. Suspendeu-se os isolados em Chelex 100 em escala 0,5 McFarland. Incubou-se a 56°C por 1 hora em banho-maria. Posteriormente, homogeneizou-se por 10 segundos em vórtex e colocou-se em fervura a 100°C por 10 minutos. Centrifugou-se por 3 minutos a 12.000 rotações por minuto (rpm). Retirou-se 100 µL do sobrenadante e armazenou-se a -20°C.

Os isolados que apresentaram multirresistência foram submetidos à análise pela técnica de reação da cadeia da polimerase utilizando-se gel de agarose 1,5% e corante Gel RED QuatroG, o marcador utilizado foi LADDER 100KB (Invitrogen) e os oligonucleotídeos utilizados estão descritos na Tabela 2:

Tabela 2: Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para pesquisa de genes de resistência nos isolados de *Klebsiella* multirresistentes.

Gene Alvo	Primer (5'-3')	Pares de base	Anelamento	Referência
<i>bla</i> _{TEM}	TCGGGGAAATGTGCGCG TGCTTAATCAGTGAGGACCC	850	54C°	TALUKDAR <i>et al.</i> 2013
<i>bla</i> _{SHV}	CACTCAAGGATGTATTGTG TTAGCGTTGCCAGTGCTCG	861	59 C°	TALUKDAR <i>et al.</i> 2013
<i>bla</i> _{CTX-M}	ACCGCGATATCGTTGGT CGCTTTGCGATGTGCAG	550	54C°	RASHEED <i>et al.</i> , 1997

Os genes de resistência foram pesquisados em volume de reação final de 25µL, sendo 2 µL de DNA (50ng de DNA) e 35 ciclos de amplificação, conforme Tabela 4. Os componentes das reações estão citados na Tabela 3:

Tabela 3: Concentração final dos reagentes para as reações de PCR para os genes *bla* dos isolados multirresistentes de *Klebsiella*

	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>bla</i> _{SHV}	<i>bla</i> _{TEM}
Tampão (INVITROGEN)	1x	1x	1x
MgCl₂ (INVITROGEN)	5,5mM	5,5mM	1,5mM
dNTP (LUDWIG)	200µM	300µM	100 µM
Oligo F (IDT)	1 µM	1 µM	1 µM
Oligo R (IDT)	1 µM	1 µM	1 µM
Taq (QUATRO G)	2U	1U	2U
Água	15,1 µL	15,05 µL	16,85 µL
DNA	2 µL	2 µL	2 µL

Tabela 4: Ciclos de amplificação dos genes *bla* dos isolados de *Klebsiella* multirresistentes

	<i>bla</i> _{SHV}	<i>bla</i> _{TEM}	<i>bla</i> _{CTXM}
Desnaturação inicial	95°C 5 min.	94°C 5 min.	94°C 7 min.
Desnaturação	95°C 1 min.	94°C 45 segs.	94°C 30 segs.
Anelamento	59°C 45 segs.	54°C 30 segs.	54°C 45 segs.
Extensão	72°C 1 min.	72°C 1 min.	72°C 1 min.
Extensão final	72°C 7 min.	72°C 5 min.	72°C 7 min.

Para os genes produtores de *bla*_{IMP}-type, *bla*_{VIM}-type, *bla*_{NDM-1}-type, *bla*_{KPC}-type, *bla*_{GES}-type, *bla*_{OXA-48}-type e do gene *mcr-1* aplicou-se a técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real, fazendo-se uso de curva de desnaturação por multiplex (*Multiplex HRM Real Time PCR*) de MONTEIRO *et al.* (2012) com modificações.

O equipamento utilizado para a reação foi Real Time PCR StepOne® (Applied Biosystems®). Utilizou-se as seguintes ATCCs como controle positivo, cedidos pelo Laboratório Especial de Microbiologia Clínica (LEMC) da Escola Paulista de Medicina: *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) A28008 (KPC+), *P. aeruginosa* 395 (IMP+), *P. aeruginosa* 81-11963A (VIM+), *K. pneumoniae* NCTC

BAA2146 (NDM-1+), *P. aeruginosa* 48-8896A (GES+) e *K. pneumoniae* 68-5227A (OXA-48+) *P. vulgaris* ATCC 49132(MCR-1). Para controle negativo foi utilizada água ultrapura.

A extração do DNA procedeu-se através de lise térmica e os componentes e volumes do mix da reação contendo 25 µL são: 12.5 µL de MeltDoctor™ HRM Master. 1 µL de primer para os genes *bla*_{VIM}-type, *bla*_{NDM-1}-type, *bla*_{KPC}-type, *bla*_{GES}-type, *bla*_{OXA-48}-type, 6 para *bla*_{IMP}-type e 0,25 de *mcr-1*, com 1µL de DNA. A tabela 5 descreve os parâmetros de amplificação para os genes de carbapenemases através de real time PCR.

Tabela 5: Curva de desnaturação (*Melt curve step*) de 65°C com incremento de 0,1°C/s até 95°C, com aquisição de fluorescência a cada 1s.

Etapa	Tempo	Ciclos	Temperatura (C°)
Desnaturação inicial	5 (Min.)		95
Desnaturação	20 (Seg.)	35	95
Anelamento	45 (Seg.)	35	54
Extensão	30 (Seg.)	35	72

Os oligonucleotídeos iniciadores para a reação de PCR Real Time são descritos na tabela 6.

Tabela 6: Oligonucleotídeos utilizados na amplificação dos genes de carbapenemases.

Oligonucleotídeo	Sequencia (5'-3')	Concentração Primer (μM)	Referência
KPC-F KPC-R	TCGCTAAACTCGAACAGG TTACTGCCCCGTTGACGCCCAATCC	0.2	MONTEIRO <i>et al.</i> , 2009
NDM-F NDM-R	TTGGCCTTGCTGTCCCTG ACACCAGTGACAATATCACCG	0.2	MONTEIRO <i>et al.</i> , 2012
GES-F GES-R	CTATTACTGGCAGGGATCG CCTCTCAATGGTGTGGGT	0.2	MONTEIRO <i>et al.</i> , 2012
OXA-48-F OXA-48-R	TGTTTTTGGTGGCATCGAT GTAAMRATGCTTGGTTCGC	0.2	MENDES <i>et al.</i> , 2007
IMP-F IMP-R	GAGTGGCTTAATTCTCRATC AACTAYCCAATAYRTAAC	1.2	MENDES <i>et al.</i> , 2007
VIM-F VIM-R	GTTTGGTCGCATATCGCAAC AATGCGCAGCACCAGGATAG	0.2	MENDES <i>et al.</i> , 2007
MCR-1-F MCR-1-R	CTCATGATGCAGCATACTTC CGAATGGAGTGTGCGGTG	0.2	LIU <i>et al.</i> , 2016

4.7.7 Amplificação das sequências ERIC através da técnica de PCR

As reações de ERIC-PCR foram baseadas no protocolo de CANAL (2016), adaptado para *Klebsiella* sp. Os oligonucleotídeos iniciadores ERIC1 e ERIC2 utilizados na reação são os descritos por VERSALOVIC (1991). As reações continham 6,0 mM de MgCl_2 , 200 μM de dNTPs, F 5'ACC GCG ATA TCG TTG GT '3 E R 5'CGC TTT GCG ATG TGC AG '3 e 1U de *Taq polimerase*, 1x tampão de reações da *Taq polimerase* e 5 μL de DNA bacteriano, totalizando um volume final de 25 μL .

As reações de amplificação foram realizadas no aparelho termociclador PROFLEX com os seguintes parâmetros: desnaturação inicial a 94°C por 7 minutos,

seguidos de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 49° C por 1 minuto e extensão a 72°C por 3 minutos. Extensão final a 72°C por 15 minutos. Para eletroforese foram utilizados géis de agarose 2% e marcador gel RED QuatroG.

Em todas as reações foram utilizadas a cepa controle *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 para confirmação do funcionamento da reação.

4.7.8 Análise dos fragmentos de ERIC-PCR e MALDI-TOF

A análise do tamanho das bandas dos fragmentos amplificados do ERIC-PCR, índices de similaridade e dendrogramas foram realizados no software GelCompar 6.6.11. Para a análise dos fragmentos, o marcador utilizado foi LADDER 1KB (Invitrogen) e a partir de uma matriz binária (presença/ausência de fragmentos), foi calculado o coeficiente DICE de similaridade dos isolados. O dendrograma foi gerado a partir destes índices pelo método UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages).

Os critérios de interpretação de similaridades utilizados na interpretação do dendrograma foram os critérios criados por TENOVER *et al.* (1995) e dividem os níveis de similaridade em 4 grupos. Intimamente relacionados quando o índice de similaridade é > 70% ou no máximo contendo 3 bandas diferentes entre os isolados, possivelmente relacionados entre 40% a 70% ou até seis bandas distintas entre os isolados, diferentes ≤ 40% ou contendo sete ou mais bandas discordantes entre si e indistinguíveis quando há 100% de similaridade ou o mesmo número de bandas.

A identificação em nível de gênero e espécie foi realizada através do aparelho Microflex Bruker® e os isolados foram submetidos ao software Biotyper 4.0 para as análises de similaridade.

5. Resultados

5.1 Isolamento e identificação de *Klebsiella* sp.

Dentre os 272 isolados obtidos, 37 (13,60%) foram identificados como *Klebsiella* sp. O ponto 1 foi o que apresentou maior incidência de *Klebsiella* com 16 isolados dos 37 identificados, seguido dos pontos 4 com nove isolados, ponto 2 com sete isolados e ponto 3 com cinco isolados de *Klebsiella spp.*

Os isolados foram submetidos a identificação através da técnica de espectrometria de massa pelo uso do MALDI-TOF para confirmação dos achados nos testes microbiológicos e bioquímicos. Todos 37 isolados foram confirmados como *Klebsiella* sp., sendo 27 *K. variicola*, seis isolados confirmados como *K. pneumoniae* e quatro *K. oxytoca*. A Tabela 7 descreve as porcentagens de isolados encontrados divididos em espécie e pontos de coleta.

Tabela 7: distribuição de espécies de *Klebsiella* sp. por ponto de coleta

Espécies	<i>K. variicola</i> n (%)	<i>K. pneumoniae</i> n (%)	<i>K. oxytoca</i> n (%)	Total
Ponto 1	13 (48,1)	2 (33,3)	1 (25)	16
Ponto 2	3 (11,1)	2 (33,3)	2 (50)	7
Ponto 3	3 (11,1)	2 (33,3)	-	5
Ponto 4	8 (29,7)	-	1 (25)	9
Total	27 (100)	6 (100)	4 (100)	37

5.2 Susceptibilidade a antimicrobianos e genes de resistência

5.2.1 Perfil de resistência

Todos isolados de *Klebsiella* sp. foram submetidos a testes de susceptibilidade a antimicrobianos através do método de disco-difusão. Todos foram suscetíveis ao imipenem, ertapenem, piperacilina/tazobactam e polimixina B. As maiores porcentagens de resistência encontradas foram para os antimicrobianos ampicilina e amoxicilina, seguidas de cefoxitina e tetraciclina e as menores para cefotaxima, cefepima, norfloxacino, amicacina, cloranfenicol, ceftazidima, aztreonam

e ciprofloxacino (Tabela 8). Os pontos 1 e 4 apresentaram as maiores porcentagens de resistência e o ponto 1 apresentou a maior porcentagem média.

Tabela 8: Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos dos isolados de *Klebsiella* sp.

Antimicrobianos	Suscetíveis (%)	Resistentes (%)
Ampicilina	32,4	77,6
Amoxicilina	51,3	48,7
Piperacilina/tazobactam	100	-
Ceftazidima	94,6	5,4
Cefotaxima	97,3	2,7
Cefepima	97,3	2,7
Cefoxitina	81,1	18,9
Aztreonam	94,6	5,4
Imipinem	100	-
Ertapenem	100	-
Ciprofloxacino	94,6	5,4
Norfloxacino	97,3	2,7
Gentamicina	94,6	5,4
Amicacina	97,3	2,7
Espectinomicina	91,9	8,1
Tetraciclina	86,4	13,6
Cotrimoxazol	97,3	2,7
Cloranfenicol	97,3	2,7
Polimixina B	100	-

5.2.3 Produção de ESBL

Para os isolados que apresentaram perfil fenotípico de ESBL, resistentes à cefalosporinas de terceira geração foi realizado teste de disco combinado para análise de produção β -lactamases de espectro estendido. Nenhum isolado mostrou-se positivo para produção de ESBL.

Tabela 9: Resistência a antimicrobianos dos isolados de *Klebsiella* sp. por ponto de coleta.

Antimicrobianos	Ponto 1 (%)	Ponto 2 (%)	Ponto 3 (%)	Ponto 4 (%)
Ampicilina	19,3	7,7	7,7	15,4
Amoxicilina	34,6	7,7	7,7	19,3
Ceftazidima	3,8	-	-	3,8
Cefotaxima	3,8	-	-	-
Cefepima	-	-	-	3,8
Cefoxitina	11,5	7,7	3,8	3,8
Ceftriaxona	7,7	3,8	-	-
Aztreonam	3,8	-	-	3,8
Ciprofloxacino	3,8	-	-	3,8
Norfloxacino	3,8	-	-	-
Gentamicina	-	-	-	7,7
Amicacina	-	-	-	3,8
Tetraciclina	3,8	7,7	3,8	7,7
Cotrimoxazol	3,8	-	-	-
Cloranfenicol	-	-	-	3,8
Total	99,7%	34,6%	23%	76,7%
Resistencia média	66,47%	23,07%	15,33%	51,13%

5.2.4 Presença de genes de resistência

Dezesseis (43%) dos 37 isolados analisados apresentaram algum gene de ESBL. O gene *bla_{SHV}* foi o mais recorrente com 11 isolados, constituindo 68,8% dos genes encontrados. O gene *bla_{CTX-M}* correspondeu ao segundo gene de ESBL mais encontrado com cinco (31,3%) dos 16 isolados de ESBL. O gene *bla_{TEM}* foi encontrado em apenas um isolado (*K. variicola* 394) dos 16 que apresentaram genes ESBL. Um dos isolados (*K. pneumoniae* 118) apresentou dois genes de resistência, *bla_{SHV}* e *bla_{CTX-M}*, sendo que este isolado foi fenotipicamente resistente apenas a ampicilina. Três isolados de *K. variicola*, sensíveis a todos os antimicrobianos testados, apresentaram gene *bla_{CTX-M}*. Os genes responsáveis pela síntese das enzimas carbapenemases (*bla_{KPC}*, *bla_{GES}*, *bla_{IMP}*, *bla_{VIM}*, *bla_{NDM}* e *bla_{OXA}*) não foram encontrados em nenhum isolado através da técnica de PCR em tempo real.

Na tabela 10 é possível visualizar a relação entre os perfis de resistência encontrados por ponto de coleta e os genes de resistência nos isolados analisados através da técnica de PCR. Nos pontos 1 e 2 foram observados os genes *bla_{SHV}*, e

*bla*_{CTX-M}. No ponto 3 foi observado o gene *bla*_{SHV} apenas. No ponto 4 foram observados os três genes.

Tabela 10: Relação entre teste de disco-difusão, disco combinado e PCR de genes de resistência por ponto de coleta.

Local	Isolados	Perfil de susceptibilidade	<i>bla</i> _{SHV}	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>bla</i> _{TEM}
Ponto 1	<i>K. variicola</i> 82	Susceptível	-	+	-
	<i>K. variicola</i> 88	Susceptível	+	-	-
	<i>K. variicola</i> 323	AMP	-	+	-
	<i>K. variicola</i> 346	AMP, AMO	-	+	-
	<i>K. pneumoniae</i> 75	AMP	+	-	-
	<i>K. pneumoniae</i> 76	AMP	+	-	-
Ponto 2	<i>K. variicola</i> 255	Susceptível	+	-	-
	<i>K. pneumoniae</i> 22	TET, CFO, AMP, AMO	+	-	-
	<i>K. pneumoniae</i> 118	AMP	+	+	-
	<i>K. oxytoca</i> 30	AMP	+	-	-
Ponto 3	<i>K. variicola</i> 394	AMP, AMO	-	-	+
	<i>K. pneumoniae</i> 139	AMP	+	-	-
Ponto 4	<i>K. variicola</i> 431	AMP, AMO	+	-	-
	<i>K. variicola</i> 442	Susceptível	-	+	-
	<i>K. variicola</i> 444	Susceptível	+	-	-
	<i>K. variicola</i> 460	AMP, AMO	+	-	-
Total			11	5	1

Todos 37 isolados analisados apresentaram formação de cápsula polissacarídica. Destes, 21 (57,8%) demonstraram presença de fímbrias do tipo 1 e foram formadores de biofilme. Foram encontrados 29 (78,4%) dos 37 isolados resistentes ao soro e 7 (21,6%) demonstraram sensibilidade ao soro com redução menor que 90%. Em relação ao processo de captação de ferro, 30 (81,1%) dos 37 isolados apresentaram positividade para presença de sideróforos (Tabela 11). Somente um isolado (*K. variicola* 297) apresentou apenas um fator de virulência e o restante dos isolados apresentaram mais de um fator e destes, 11 apresentaram todos os cinco fatores de virulência analisados. Entre as espécies, *K. pneumoniae* foi a que mais apresentou fatores de virulência, seguido de *K. oxytoca* (Tabela 11). Em relação aos pontos de coleta, o ponto 2 apresentou as maiores percentagens de isolados com fatores de virulência (Tabela 12). O ponto 1 foi onde ocorreu a maior

concentração de isolados com mais de um fator de virulência, 16 dos 37 isolados estudados.

Tabela 11: Fatores de virulência dos isolados de *Klebsiella* distribuídos por espécies.

Espécie (n)	CPS	Fímbrias 1	Biofilme	Resistência sérica	Sideróforos
<i>K. variicola</i> (27)	27(100%)	13(48,1%)	16(59,3%)	20(74,1%)	21(77,8%)
<i>K. pneumoniae</i> (6)	6(100%)	6(100%)	4(66,7%)	6(100%)	5(83%)
<i>K. oxytoca</i> (4)	4(100%)	2(50%)	1(25%)	3(75%)	4(100%)
Total (37)	37(100%)	21(56,8%)	21(56,8%)	29(78,4%)	30(81,1%)

Tabela 12: Relação de fatores de virulência encontrados por ponto de coleta.

Ponto (n)	CPS	Fímbrias 1	Biofilme	Resistência sérica	Sideróforos
P1 (16)	16(100%)	8(50%)	12(75%)	12(75%)	12(75%)
P2 (7)	7(100%)	5(71,4%)	2(28,6%)	6(85,7%)	7(100%)
P3 (5)	5(100%)	3(60%)	3(60%)	5(100%)	4(80%)
P4(9)	9(100%)	5(55,6%)	4(44,4%)	4(44,4%)	7(77,8%)

As espécies *K pneumoniae* e *K variicola* apresentaram as maiores percentagens para formação de biofilme. As intensidades de formação de biofilme são descritas na tabela 13. O ponto 1 apresentou a maior incidência de isolados formadores de biofilme com 12 (75%) dos 16 isolados analisados. As relações entre os fatores e virulência encontrados e os pontos de coleta analisados estão descritas na tabela 12. Diferentes níveis de intensidade de formação de biofilmes foram observados, sendo que a maioria dos isolados foram classificados como fraco ou moderado (Tabela 13). Apenas um isolado localizado no ponto 1 (*K. variicola* 340) mostrou-se forte produtor de biofilme.

Tabela 13: Resultados de formação de biofilmes por ponto de coleta.

Classificação	P1	P2	P3	P4	Total
Fraco	7	-	2	3	12
Moderado	4	2	1	1	8
Forte	1	-	-	-	1
Não produtor	4	5	2	5	16
Total	16	7	5	9	37

5.3 Análise de similaridade dos isolados de *Klebsiella* sp.

5.3.1 ERIC-PCR

A análise de similaridade através da técnica de ERIC-PCR gerou padrões de banda que demonstraram baixa relação clonal e grande diversidade entre os isolados. Quatro isolados de *K. variicola* (297, 323, 346 e 460) não entraram na análise por ERIC-PCR pois não foi possível realizar a amplificação. A análise do dendrograma formado a partir do coeficiente de similaridade de DICE, possibilitou identificar seis agrupamentos com similaridade entre 24,3% e 44,4%(Figura 2). Não foram observados agrupamentos por pontos ou espécie. Os isolados de *K. pneumoniae* foram encontrados na maioria dos grupos, exceto II e V e o agrupamento IV se destacou por ter a maior concentração desta espécie. Os grupos II e IV demonstraram predominância de isolados de *K. variicola*. Importante destacar que o agrupamento II em sua totalidade composto por isolados de *K. variicola*. Já os isolados de *K. oxytoca* mostraram-se disperso entre os agrupamentos. Os agrupamentos com maiores índices de similaridade, entre 57,1% e 66,7% foram compostos em sua maioria por isolados da mesma espécie (grupos A a G), com exceção dos grupos D e E.

Todos agrupamentos apresentaram ao menos uma cepa portadora de gene de resistência. Os grupos I e V foram os que apresentaram maior concentração de genes de resistência sem haver uma predominância de quaisquer famílias nos agrupamentos.

Nos dendrogramas separados por espécies (Figura 3), pode-se observar que *K. variicola* apresentou os maiores índices de similaridade e cinco agrupamentos foram formados tanto com similaridade maior que 30% (1 a 5) e como maior que 55% (A a E). O grupo 3 apresentou isolados de todos os pontos e os grupos 4 e 5 dos pontos 1/4 e 1/2, respectivamente. Entre as *K. pneumoniae*, foram

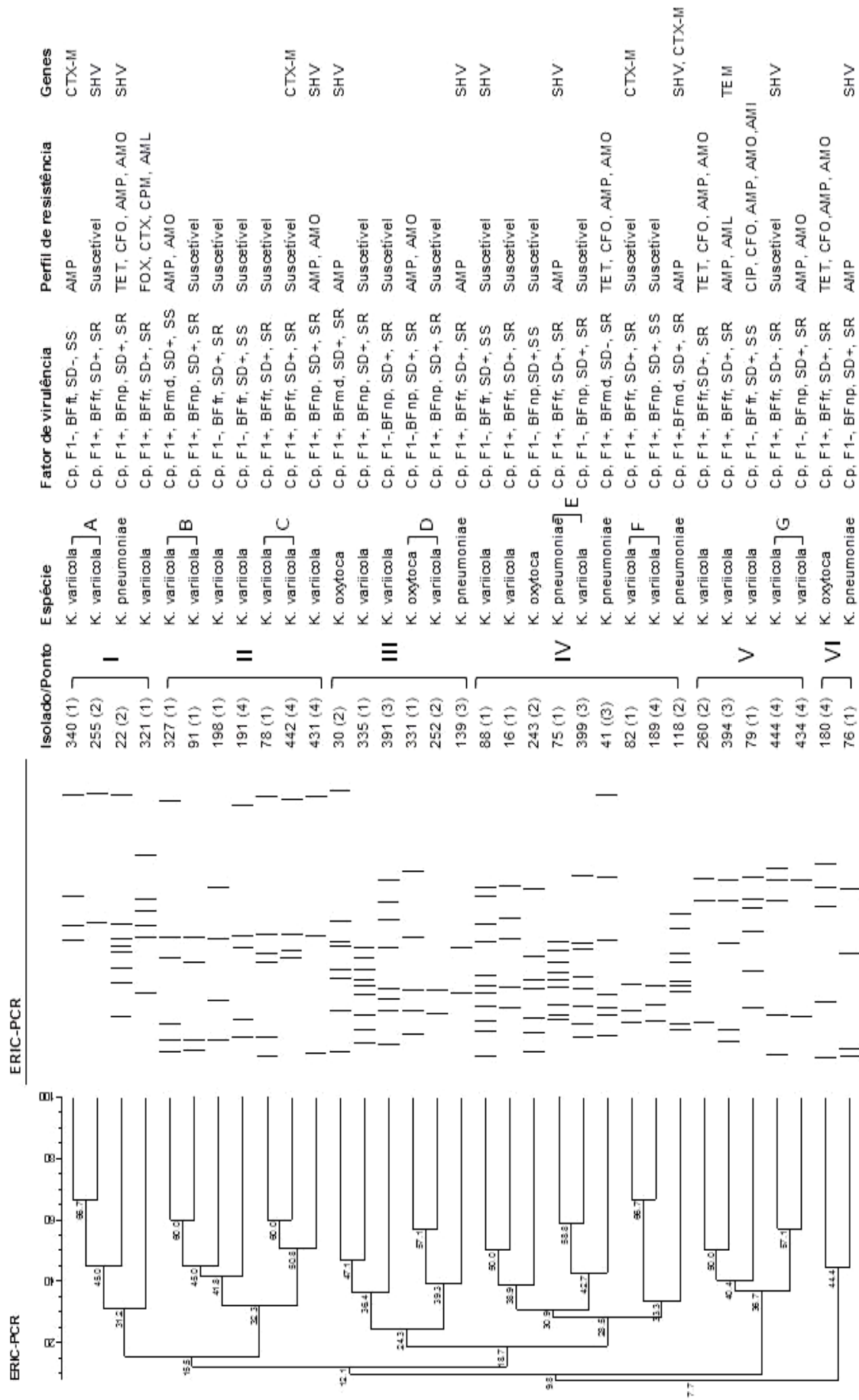


Figura 2 Dendrograma dos isolados de Klebsiella da Laguna de Tramandai tipificados por ERIC-PCR, analisados por índice de similaridade de Dice e agrupamento por UPGMA. Cp cápsula, F1 fimbria tipo 1, BF produção de biofilme, SD, sideróforo, SR, resistência ao soro. AMP - Ampicilina, AMO, amoxicilina, CFO, cefoxitina, CTX, cefotaxima, CPM, cefepima, AMI, amicacina, CLO cloranfenicol, TET, tetraciclina

observado dois agrupamentos com similaridade maior que 30% e os isolados foram sempre de pontos de coleta distintos. Entre as *K. oxytoca*, somente um agrupamento com similaridade maior de 30% foi observado e os isolados eram provenientes do ponto 1 e 2.

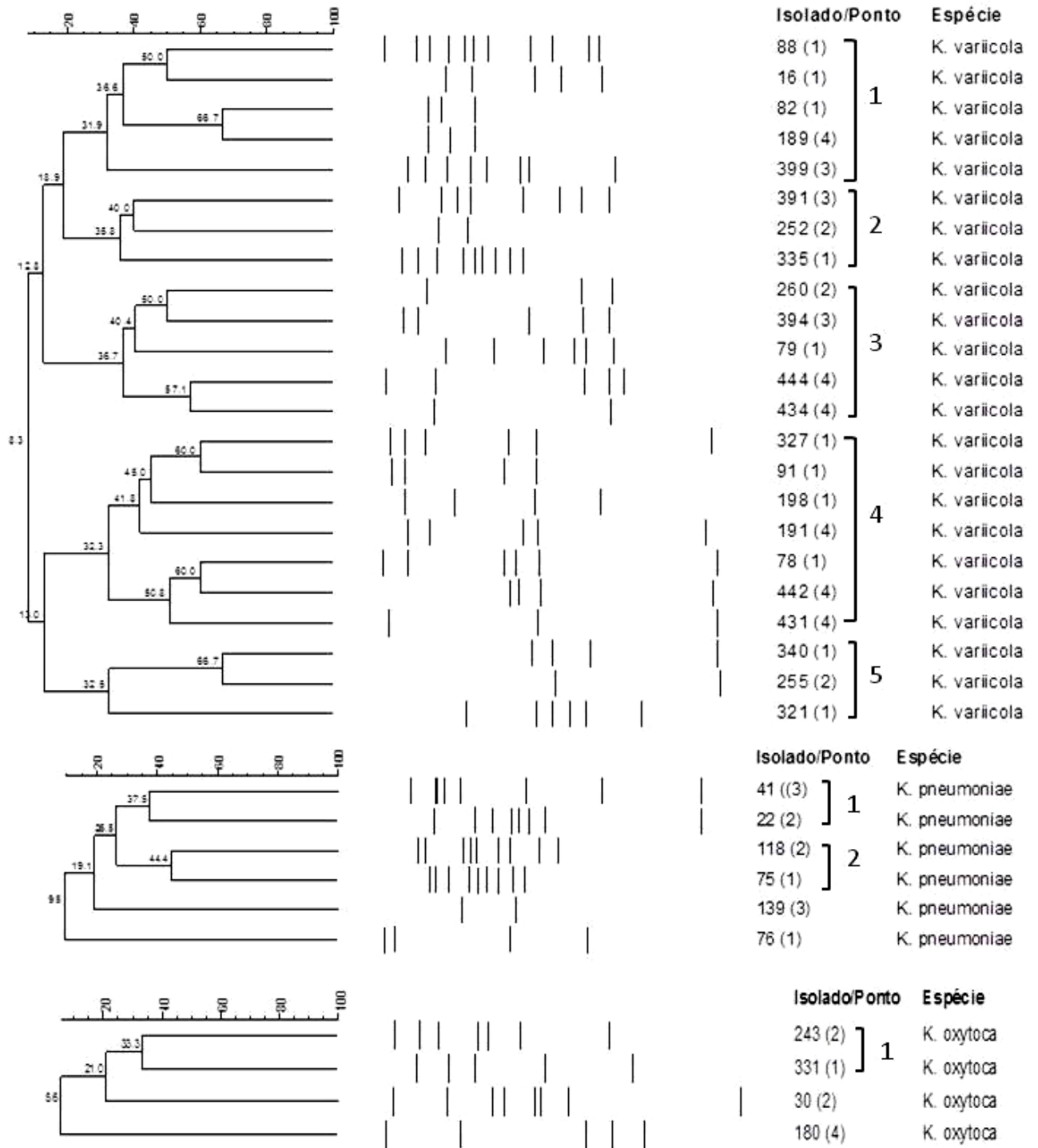


Figura 3 - Dendrogramas por espécies de *Klebsiella* isoladas da Laguna de Tramandaí, tipificadas por ERIC-PCR, analisadas por índice de similaridade de Dice e agrupadas por UPGMA

6. DISCUSSÃO

Em outro estudo relacionado ao mesmo projeto (dados não publicados), foram realizadas análises físico químicas e microbiológicas dos pontos de coleta (Tabela 14). Estas indicaram que os pontos 1 e 2 apresentaram altas concentrações de nutrientes, com altas concentração de nitrogênio amoniacal em pelo menos uma as coletas e alto conteúdo de fósforo. Estes pontos também apresentaram altas contagens de bactérias mesófilas heterotróficas e coliformes termotolerantes. Estas observações corroboram com o aspecto visual destes pontos, que sinalizam locais urbanizados e impactados.

Sabendo-se que a *Klebsiella* sp. faz parte da microbiota humana (REYNOLDS, 2013; FREIRE, 2015), é esperado que em uma área onde a densidade demográfica é elevada, os níveis deste microrganismo também sejam altos e por consequência, estejam presentes nos esgotos residenciais. Portanto, o número elevado de isolados do ponto 1 pode estar associado ao maior nível de urbanização e consequente maior quantidade de dejetos liberados (NASCIMENTO e ARAÚJO, 2013).

O ponto 4, onde era esperado menor índice de contaminação por conter baixa urbanização e características físico químicas e microbiológicas não associados ao local impactado, é o segundo ponto de maior índice de isolados encontrados. Este resultado pode ser devido à existência de populações ribeirinhas residentes no local que se utilizam de plantações e criações de animais para fins econômicos e de subsistência, fazendo com que o número de contaminantes no solo e nas águas se eleve (SCAPIN *et al.*, 2012; ELIAS, 2013; CASTRO e MELLO, 2013; BATISTA *et al.*, 2016; BENTO *et al.*, 2016; SIQUEIRA, 2016).

A baixa salinidade do ponto 4 também pode explicar essa ocorrência. A salinidade eleva o poder de autodepuração das águas, como neste trecho da lagoa há baixo nível de sal, ocorre maior surgimento e proliferação de microrganismos. Outro fator são os pulsos de marés que impedem a formação de sedimentos que propiciam a multiplicação de microrganismos (OLIVEIRA *et al.*, 2012; CASTRO e MELLO, 2013).

Os resultados da identificação de espécies demonstraram predominância da *K. variicola*. Esta bactéria, diferentemente das bactérias *K. pneumoniae* e *K.*

oxytoca que se apresentam relacionadas a amostras clínicas, tem como habitat natural vegetações, onde simbioticamente coloniza plantas, frutas e vegetais, auxiliando na captação de nitrogênio. Os locais de coleta destas amostras estão localizados em meio a vasta vegetação que circunda e insere-se nas águas lagunares e sustentam diversas plantas aquáticas, propiciando um ecossistema propício ao desenvolvimento e multiplicação da *K. variicola* (ROSEMBLUETH *et al.*, 2004; ALVES, 2006; FOUTS *et al.*, 2008; PINTO-TOMAS *et al.*, 2009; SEKI *et al.*, 2013).

Portanto, o baixo índice de *K. pneumoniae* e *K. oxytoca* é explicado por sua relação com o âmbito clínico, restringindo as taxas de isolados encontrados no ambiente. Excetuando-se os pontos de *input* de contaminantes, o esperado é uma menor taxa de identificação destas espécies (ABDULLAH *et al.*, 2015).

Analisando os resultados da análise de susceptibilidade a antimicrobianos entre os isolados de *Klebsiella* sp. todos foram de uma maneira geral sensíveis a maioria dos antimicrobianos testados e os resultados encontram-se em concordância com outros estudos (BERALDO-MASSOLI *et al.*, 2012; de SANTANA *et al.*, 2012; RAMOS, 2014). A resistência aos antimicrobianos ampicilina e amoxicilina explica-se por ser conhecida como especificamente intrínseca para *K. pneumoniae* e *K. oxytoca* (KOCK *et al.*, 2008; de SANTANA *et al.*, 2012; BERRAZEG *et al.*, 2013).

A resistência à cefoxitina, observada principalmente no ponto 1 foi a terceira maior neste estudo, e pode estar associada à produção de enzimas β -lactamases, uma vez que este antimicrobiano classificado como cefalosporina de segunda geração, se torna inativo perante enzimas β -lactamases. Para as demais cefalosporinas, os isolados foram susceptíveis, levando a supor que os mesmos não sejam capazes de sintetizar ESBL (BUSH e JACOBY, 2010).

A resistência à tetraciclina, igualmente observada em maior percentagem no ponto 1, também está de acordo com outros trabalhos (BAHRAMI *et al.*, 2012, RATHER *et al.*, 2012, RYSZ *et al.*, 2013, SULLIVAN *et al.*, 2013) que encontraram resultados semelhantes, demonstrando que a resistência, apesar de baixa para este antimicrobiano, está disseminada tanto em isolados ambientais quanto clínicos.

Os maiores índices de sensibilidade foram encontrados para os antimicrobianos polimixina B, ertapenem, imipenem e piperacilina/tazobactam com 100% de efetividade. O imipenem, assim como o ertapenem, já são utilizados como principais terapias para Gram negativos, principalmente *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBL (NORDMANN *et al.*, 2009). A combinação piperacilina/tazobactam é altamente ativa no tratamento contra *Klebsiella* sp., devido a eficiência na ligação e inibição das enzimas ESBL. Sendo assim, este antimicrobiano se mostra mais potente e os resultados encontrados são condizentes com a literatura (STREIT *et al.*, 2004; PATERSON e BONOMO, 2005; PETERSON, 2008).

O fato de nenhum isolado analisado no teste de disco combinado ter apresentado fenótipo para ESBL levaria a concluir que estes isolados seriam incapazes de sintetizar estas enzimas por não terem em seu genoma os genes necessários para isso, todavia, estes resultados podem ocorrer mesmo com a presença destes genes de resistência caso estes não tenham sofrido estímulos necessários que induzissem a expressão dos genes de resistência (JAIN e MONDAL, 2008).

LOPES, (2009) também encontrou diferenças significativas entre os resultados de análises de fenótipo de ESBL e a presença de genes responsáveis pela produção destas enzimas. Outra questão a ser considerada é a variabilidade fenotípica que as ESBL apresentam e conferem afinidade por uma ou outra droga especificamente, tornando a leitura dos resultados mais suscetível a equívocos (SOARES, 2013), podendo gerar falso positivos e falso negativos para determinados antimicrobianos, fazendo-se necessário a utilização de métodos auxiliares de identificação (KAISER *et al.*, 2016).

A baixa relação entre os resultados do teste de disco-difusão e disco combinado para detecção de fenótipos de ESBL pode ser explicada quando a bactéria expressa genes que levem à falsos positivos. O gene *bla_{OXY}* quando hiperproduzido, acarreta na detecção de ESBL por diminuição da sensibilidade às cefalosporinas de terceira geração (DIAS, 2009; EFSA, 2011). Outros autores utilizando-se de técnicas iguais e distintas as deste estudo e isolados provenientes de fontes clínicas, também encontraram divergências entre os resultados dos testes

de triagem e confirmatórios, demonstrando haverem limitações nas técnicas de detecção fenotípica, fazendo-se necessários mais testes para conclusões satisfatórias, pois a variabilidade genética das ESBL pode levar a resultados divergentes (KAISER *et al.*, 2016, SÁ, 2010 e SOARES, 2013).

Todavia ao analisar os isolados através da amplificação dos genes para ESBL, os isolados que não apresentaram fenótipos para ESBL, apresentaram genes de resistência relacionados às β -lactamases de espectro estendido. Ou como o isolado 118 que, por outro lado, apresentou os genes *bla_{SHV}* e *bla_{CTX-M}*, e foi resistente somente a ampicilina. Isto pode ser explicado pelo fato destes genes não estarem sendo expressos nestas condições. Também deve-se ter em mente que a presença de *bla_{TEM}* e *bla_{SHV}* não implica necessariamente em produção de ESBL, pois apenas as variantes a partir da SHV-3 e TEM-3 são responsáveis por este fenótipo, sendo necessário o sequenciamento dos genes amplificados. (PATERSON e BONOMO, 2005; STRATEVA e YORDANOV, 2009; BUSH e JACOBY, 2010).

ZAMPARETTE, (2014) correlacionou a existência de enzimas TEM e SHV de baixo espectro e resultados falsos negativos para os testes fenotípicos. Esta limitação do teste de disco combinado foi explicada devido às enzimas ESBL poderem apresentar baixos níveis de resistência e assim gerar falsos negativos *in vitro*, exigindo que se procure métodos auxiliares e para comprovação mais exata, fazendo-se necessário o sequenciamento destes genes para identificação exata dos subtipos (CHEVALIER *et al.*, 2008).

Aproximadamente 40% das bactérias que apresentam resistência a antimicrobianos utilizam bombas de efluxo para inativar os antimicrobianos (CHEVALIER *et al.*, 2008). Algumas cepas de *K. pneumoniae*, assim como outras espécies, são capazes de superprodução de bombas de efluxo, gerando resistência às β -lactamases sem necessariamente conter genes de resistência comuns a estas enzimas (NORDMANN *et al.*, 2009; BLAIR *et al.*, 2015; BIALEK-DAVENE *et al.*, 2015; PHILIPPE *et al.*, 2015). Portanto outros mecanismos de resistência devem ser levados em consideração quando fenótipos como os dos isolados 41, 79, 180, os quais foram resistentes e não apresentaram genes para ESBL, são encontrados. Nestes casos também é possível deduzir que outros genes senão aqueles

pesquisados neste trabalho, possam ser os responsáveis por estes fenótipos (JELLEN-RITTER e KERN, 2001; NISHINO *et al.*, 2003).

As percentagens para presença do gene *bla_{SHV}* são elevadas na América latina e no Brasil. Os mais descritos são as variantes SHV-2, SHV-5, SHV-12 e SHV-4 (VILLEGAS *et al.*, 2008). A β -lactamase SHV-1 foi a primeira descrita e é cromossômica na *K. pneumoniae*, atribuindo resistência a ampicilina, amoxicilina, carbenicilina e ticarcilina (BUSH *et al.*, 1995; LIVERMORE, 1995). O gene *bla_{SHV}* foi o mais encontrado no presente estudo dentre os três genes mais comumente descritos. Os portadores deste foram sensíveis a todos os antimicrobianos testados (*K. variicola* 444, 255 e 88) ou resistentes pelo menos a AMP e AMO, ou a AMP, AMO e CFO. Nas duas primeiras situações, podem estar associados ao fato de serem SHV-1 ou SHV-11 que não codificam ESBL e na última pode ser uma das variantes associadas a produção de ESBL, necessitando seu sequenciamento. A espécie de *Klebsiella* sp. que mais apresentou genes *bla_{SHV}* foi a *K. pneumoniae*. Segundo autores, a *K. pneumoniae* apresenta este gene intrinsecamente em seu genoma e, portanto, os resultados encontrados neste trabalho concordam com os achados na literatura prévia (BABINI e LIVERMORE, 2000; TOLENTINO, 2009, PEREIRA *et al.* 2016).

Os pontos de coleta com maior incidência deste gene foram os pontos 1 e 2, locais de maior concentração urbana e conseqüente maior liberação de esgotos domiciliares nas águas da laguna. Assim como AMINE, (2013) em seu estudo, trabalhando com águas de efluentes de esgoto no Egito, encontrou o gene *bla_{SHV}* como predominante em *Klebsiella*.

HENRIQUES *et al.* (2006), estudando águas estuarinas, e CHAGAS, (2011) ao estudar efluentes de hospitais que eram liberados no meio ambiente, encontraram o gene *bla_{SHV}* como segundo maior em incidência dentre os isolados de ESBL. HELT, (2012) estudou os níveis de genes *bla_{SHV}* em águas de lagoas tratadas e não tratadas e constatou que mesmo havendo redução na contaminação das águas pelo gene *bla_{SHV}*, este não é totalmente eliminado, mantendo a disseminação destes genes no ambiente.

A espécie de *Klebsiella* sp. que apresentou mais genes *bla_{SHV}* foi a *K. pneumoniae*. Segundo autores, a *K. pneumoniae* conteria este gene intrinsecamente

em seu genoma e, portanto, os resultados encontrados neste trabalho concordam com os achados na literatura prévia (BABINI e LIVERMORE, 2000; TOLENTINO, 2009; PEREIRA *et al.*, 2016).

FONTES, (2012) em seu trabalho pesquisando águas de rios em São Paulo, encontrou 33% dos isolados considerados ESBL positivos, contendo o gene *bla_{CTX-M}*, porcentagem semelhante ao encontrado neste estudo. Mesma porcentagem encontrada por MARINESCU *et al.* (2015) em seu trabalho onde analisava águas de efluentes hospitalares na Romênia. Já TISSERA e LEE (2013), encontraram índices muito maiores de *bla_{CTX-M}* em seu estudo (86%), mas isso se deve à liberação direta de lixo e esgoto doméstico sem tratamento nas águas dos rios estudados pelos autores. Mesmo com esta divergência, isto se dá porque o gene *bla_{CTX-M}* é considerado prevalente na família *Enterobacteriaceae*, sendo descrito constantemente em vários estados do Brasil e outros países (TOLENTINO *et al.*, 2010; CHAGAS, 2011; FONTES, 2012; ALOUACHE *et al.*, 2013; ANSSOUR *et al.*, 2016).

A espécie analisada com maior incidência do gene *bla_{CTX-M}* foi a *K. variicola*, sendo que dois isolados (*K. variicola* 442 e 82) foram sensíveis a todos os antimicrobianos. O esperado seria encontrar estes genes associado a bactérias de proveniência clínica como *K. oxytoca* e *K. pneumoniae*, mas demonstrando a capacidade de transferência genética entre espécies, estes genes já são encontrados em bactérias relacionadas ao ambiente, como *K. variicola* (ZHANK *et al.*, 2016).

Novamente o ponto 1 foi o que apresentou maior número de isolados identificados contendo o gene *bla_{CTX-M}*, demonstrando relação estrita entre os níveis de urbanização e a contaminação das águas próximas a estes centros.

As enzimas β -lactamases do tipo TEM apresentam importância clínica elevada (NASS *et al.*, 2008). Diversos estudos já comprovaram a disseminação dos genes *bla_{TEM}* no meio ambiente (LU *et al.*, 2010; ANKITA *et al.*, 2013). CHAGAS, (2011) encontrou larga predominância de genes *bla_{TEM}* em águas de esgoto hospitalar. ANKITA *et al.* (2013) ao pesquisarem águas sem influência de urbanização, encontraram resultados semelhantes ao presente estudo para o gene

*bla*_{TEM}, o que seria esperado se os achados relacionados aos genes *bla*_{SHV} e *bla*_{CTX-M} também fossem baixos ou nulos, o que não se sucedeu no presente estudo.

Uma hipótese para estes resultados poderia ser mencionada tendo em consideração os locais e origens dos isolados, mas também pode ser considerado um decréscimo nos índices do gene *bla*_{TEM}, sendo substituído pela elevação dos genes *bla*_{CTX-M} e sua correlação com amostras clínicas (FALAGAS e KARAGEORGOPOULOS, 2009; HIROI *et al.*, 2011; FONTES, 2012; ALOUACHE *et al.*, 2013; WOERTHER *et al.*, 2013; RAMOS *et al.*, 2014). Outros autores como PATERSON e BONOMO (2005), relataram a prevalência de genes *bla*_{TEM} em território Norte Americano e baixa prevalência em países da América do Sul, dados também encontrados por VILELA, (2009).

Os estudos anteriormente citados tiveram maiores índices de resistência a carbapenêmicos e isso provavelmente ocorre porque os autores obtiveram suas amostras diretamente de esgotos brutos ou com tratamento primário e mais criticamente em esgotos hospitalares. No presente estudo, alguns pontos de coleta eram em locais mais afastados de áreas com grande urbanização ou liberação de dejetos. O gene *bla*_{TEM} foi observado em *K. variicola* isolada do ponto 3, situado no meio da Laguna e que apresentou as menores percentagens de resistência. O isolado foi resistente a AMP e AMO, fenótipo que pode não estar associado a ESBL.

Mesmo levando em conta as fontes distintas dos isolados entre os trabalhos, deve-se considerar a ampla distribuição destes genes, já que o alto índice de isolados contendo genes de resistência em esgotos hospitalares seria presumivelmente mais elevado do que os isolados ambientais (KÜMMERER e HENNINGER, 2003), no entanto isto não ocorreu, levando a considerar a disseminação bacteriana e seus genes através de dejetos no ambiente, emergente e preocupante. Estes estudos corroboram com este trabalho e os dados são compatíveis entre si devido à elevada utilização de antimicrobianos como as cefalosporinas de terceira geração, ao constatar que o uso excessivo de antimicrobianos pela população e a liberação de dejetos no meio ambiente são fontes de disseminação de genes de resistência (HENRIQUES *et al.*, 2006; CHAGAS, 2011; PEREIRA, 2016).

A cápsula polissacarídica é considerada o principal fator de virulência da *Klebsiella* sp., sendo produzida por todas espécies e subespécies deste gênero (SCHEMBRI *et al.*, 2005; CRESS *et al.*, 2013; PAN, 2013). As fímbrias do tipo 1 podem estar presentes tanto em bactérias patogênicas quanto não patogênicas (MARQUES, 2011) e são conhecidas por fazerem parte da composição das *Enterobacteriaceae*s incluindo a *Klebsiella* sp. (PODSCHUN e ULLMANN, 1998; MARTINS, 2014). Têm papel fundamental na manutenção e propagação do microrganismo (RAMOS *et al.*, 2014; PEREIRA, 2016) e em *Klebsiella* sp. podem ser induzidas em situações de estresse (MACIEL, 2012). SCHEMBRI *et al.* (2005) relacionaram em seu estudo a presença de CPS e a capacidade de adesão de bactérias através das fímbrias do tipo 1, constatando que microrganismos sem cápsula produziram aglutinação em maior escala e mais rapidamente que os microrganismos encapsulados e a presença de cápsula, então, viria a atrasar a síntese de fímbrias do tipo 1. Na sua ausência, a velocidade da síntese de fímbrias do tipo 1 se elevaria, portanto, a presença de CPS dificultaria a detecção das mesmas. Todos os isolados no presente estudo foram produtores de cápsula, explicando a baixa incidência de produtores de fímbria tipo 1 entre os isolados.

As altas taxas de mortalidade e morbidade atingidas pela *Klebsiella* sp. se devem em muito a sua capacidade de anular os efeitos farmacológicos dos antimicrobianos, vindo a causar diversas patologias associadas à sua capacidade de produção de biofilmes (BARRETO *et al.*, 2009; SINGHAI *et al.*, 2012; NIVEDITHA *et al.*, 2012). Diversos autores mostraram a limitação de antimicrobianos em penetrar nessas estruturas e eliminar os microrganismos e mesmo que os isolados ambientais apresentem na maioria dos estudos, menor porcentagem de formação de biofilme, os números ainda são preocupantes (MAGESH *et al.*, 2013; TRENTIN *et al.*, 2013; NAPARSTEK *et al.*, 2014).

Sabendo-se que fímbrias do tipo 1 são estruturas importantes na formação de biofilmes e que estas são comuns entre as *Klebsiella* sp. (SCHEMBRI *et al.*, 2005; MARQUES, 2011; STAHLUT *et al.*, 2012; MARTINS, 2014), os achados do presente estudo sugerem uma associação entre as taxas de formação de biofilme e a produção de fímbrias do tipo 1, já que os percentuais encontrados se assemelham. Alguns autores indicam o contrário, afirmando que exclusivamente as

fímbrias do tipo 3 são capazes de formar biofilmes (STRUVE *et al.*, 2009; SCHROLL *et al.*, 2010). Mesmo fazendo-se necessário a constatação da presença de fímbrias do tipo 3 nos isolados analisados, os resultados do presente estudo contradizem estes autores, assim como o trabalho de SCHEMBRI *et al.*, 2005, onde constataram não haver impedimento na formação de biofilmes e a presença de fímbrias do tipo 1. Talvez o tipo de fimbria tenha influenciado na intensidade do biofilme formado entre os isolados de *Klebsiella* sp. da Laguna de Tramandaí, uma vez que o isolado forte formador de biofilme foi negativo para fimbria tipo 1 (*K. variicola* 340), neste caso ele poderia ser portador de fimbria tipo 3.

Alguns estudos atribuíram a baixa capacidade de formação de biofilme com a presença de cápsula polissacarídica, sugerindo que microrganismos encapsulados conteriam menos adesinas (FAVRE-BONTE *et al.*, 1999), se aderindo fracamente ao epitélio e tendo menor poder de penetração (SAHLY *et al.*, 2000). Cabe salientar que a grande maioria dos isolados do presente estudo foram não produtores ou fracos formadores de biofilme.

Outra hipótese relacionando estes fatores aponta que a CPS impediria a formação de biofilmes através das fímbrias do tipo 1 já que ao se anular a síntese da CPS ocorre um aumento na funcionalidade fimbrial (SCHEMBRI *et al.*, 2005). Estes dados estão em discordância com os dados encontrados no presente estudo, onde 100% dos isolados apresentaram cápsulas polissacarídica e mais de 50% apresentaram formação de biofilmes e presença de fímbrias. Além disso, seria contraditório associar esse fato a *Klebsiella* sp. uma vez que esta espécie é sabidamente encapsulada e apresenta fímbrias do tipo 1 e 3 (CRESS *et al.*, 2013; PAN, 2013; MARQUES, 2011; MARTINS, 2014).

Quanto a resistência sérica, os resultados do presente estudo estão de acordo com outro estudo que observou que mais de 60% dos isolados analisados apresentaram esta característica (TURRI, 2003). Uma das hipóteses para este elevado nível de resistência é o alto número de isolados contendo CPS, pois os lipopolissacarídeos contidos nela impedem o reconhecimento pelo fator C3b através da liberação de ácido siálico (PODSCHUN e ULLMANN, 1998), assim como concluiu TURRI, (2003).

A *Klebsiella* sp. é capaz de produzir sideróforos, substâncias quelantes capazes de manter um influxo de ferro para o interior da bactéria utilizando-se do ferro ligado à transferrina e que é essencial para o crescimento bacteriano e suas taxas de letalidade (KRISTOPHER *et al.*, 2012; EL FERTAS-AISSANI *et al.*, 2013). Alguns autores mesmo em acordo ao que se refere a presença de sideróforos como fator de virulência da *Klebsiella* sp., citam que fenótipos positivos para aerobactina em *Klebsiella* sp. são raros, todavia a enterobactina é mais frequente (PODSCHUN *et al.*, 2001; EL FERTAS-AISSANI *et al.*, 2013). No presente estudo 81% dos isolados foram produtores de sideróforos do tipo enterobactina, entre as espécies encontradas variou de 100% (*K. oxytoca*) a 77% (*K. variicola*) dos isolados e entre os pontos de coleta variou de 100% (Ponto 2) a 75% (Ponto 1).

É importante citar que os fatores de virulência tiveram maior incidência no ponto 2 de coleta, que também apresenta alto nível de urbanização e impacto ambiental entre os quatro pontos coletados. Isso constata a importância de contato dos esgotos domiciliares com o ambiente onde são liberados. Esses fatores de virulência contidos nos isolados do ponto 1 evidenciam a maior virulência das bactérias residentes nestes locais de contato direto com os contaminantes. O ponto 3, sendo o mais distante dos locais com alta urbanização ou agricultura e agropecuária, mostrou isolados menos virulentos do que todos outros pontos, constatando mais uma vez a interferência de contaminantes sobre as bactérias residentes nas águas da laguna de Tramandaí.

A análise da similaridade através de ERIC-PCR demonstra uma extensa diversidade entre os isolados. Os baixos índices de similaridade encontrados entre os isolados podem estar associados aos diferentes corpos d'água que a laguna recebe, trazendo consigo diferentes populações microbianas que também sofrem influência dos diferentes pulsos de maré (OLIVEIRA *et al.*, 2012; CASTRO e MELLO, 2013).

A variedade de pontos de coleta e as múltiplas fontes de contaminantes liberados nas águas da laguna de Tramandaí foram determinantes para estes resultados. A taxa de similaridade máxima foi de 66,7%, sem formação de grupos entre pontos distintos, ratificando que os pontos de coleta tornaram os isolados geneticamente distintos uns dos outros.

Os dendrogramas compostos pelas espécies *K. pneumoniae* e *K. oxytoca* respectivamente obtiveram níveis de similaridade entre 30 e 45%, demonstrando que os isolados destas espécies foram geneticamente mais distintos que os isolados de *K. variicola*, com similaridades entre 30% e 66,7%. Sugerindo que populações desta última espécie estejam se mantendo neste ambiente, contribuindo para manutenção e disseminação de genes *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}* e *bla_{CTX-M}*, uma vez que todos eles foram observados.

A capacidade de formação de biofilme está cada vez mais associada a manutenção da bactéria nos mais diversos ambientes e sua resistência a antimicrobianos (SINGHAI *et al.*, 2012; STAHLHUT *et al.*, 2012; SUBRAMANIAM *et al.*, 2012). Portanto, um isolado que apresente características que propiciem tal processo apresenta uma vantagem que garante sua sobrevivência e permanência no ambiente. No presente estudo foram encontrados isolados das três espécies identificadas de *Klebsiella* que apresentaram vários dos fatores de virulência analisados, capacidade de formação de biofilme e genes de resistência associados a fenótipos de resistência antimicrobiana.

Entre *K. variicola* destacou-se o isolado 340, o qual foi forte produtor de biofilme, apesar de não produtor de fimbria tipo1, e portador do gene *bla_{CTX-M}*. Entre *K. pneumoniae*, foram observados os isolados 118, positivo para todos os fatores de virulência, produtor de biofilme moderado e portador dos genes *bla_{SHV}* e *bla_{CTX-M}* e o isolado 41, multirresistente, produtor dos fatores de virulência analisados com exceção dos sideróforos, e formador de biofilme moderado. Finalmente entre *K. oxytoca*, o isolado 30, positivo para todos os fatores de virulência analisados, produtor de biofilme moderado e portador do gene *bla_{SHV}*.

7. CONCLUSÃO

Os isolados de *Klebsiella* sp. encontrados no presente estudo apresentaram diversos fatores de virulência e genes responsáveis por resistência antimicrobiana. O estudo constatou:

1. Foram encontradas três espécies distintas de *Klebsiella* sp. (*K. variicola*, *K. pneumoniae* e *K. oxytoca*) nas amostras coletadas nos quatro pontos da Laguna de Tramandaí, das quais *K. variicola* foi a mais frequente.
2. Os isolados foram todos susceptíveis aos antimicrobianos imipenem, ertapenem, piperacilina/tazobactam e polimixina B. As maiores porcentagens de resistência encontradas foram para os antimicrobianos ampicilina e amoxicilina. Somente um isolado de *K. pneumoniae* apresentou fenótipo de multirresistência e nenhum foi produtor de ESBL no teste fenotípico.
3. Todas espécies analisadas foram capazes de produzir os fatores de virulência testados (cápsula polissacarídica, fímbrias, biofilmes, sideróforos, resistência sérica). Muitos dos isolados possuem características que facilitam sua permanência tanto no ambiente como em possíveis hospedeiros.
4. Os genes responsáveis pela resistência antimicrobiana, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} e *bla*_{CTX-M} foram encontrados em todas as espécies distribuídas entre os quatro pontos de coleta da laguna. O gene *bla*_{SHV} foi o mais frequente entre os isolados.
5. Os índices de similaridade e a clonalidade entre os isolados analisados através de ERIC-PCR foram baixos, constatando elevada diversidade genética entre as espécies encontradas no presente estudo

provenientes das águas da laguna de Tramandaí, o que pode estar relacionado com e fontes de contaminação deste ambiente.

No presente estudo pode-se concluir que as fontes de contaminação e as águas da laguna de Tramandaí devem ser monitoradas, visando impedir a manutenção e disseminação destes microrganismos potencialmente patogênicos.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS AK, LICHTMAN AH: 2003. Cellular and Molecular Immunology. 6th ed. Saunders.

ABDULLAH, FE. AKBER, SS. ANIS, W. SYEDAIN, F. Identification of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* in urine specimens from a laboratory in Karachi.

AGLADZE K, WANG X, ROMEO T. 2005. Spatial periodicity of *Escherichia coli* K-12 biofilm microstructure initiates during a reversible, polar attachment phase of development and requires the polysaccharide adhesin PGA. *J Bacteriol* 187(24):8237-46.

AHMAD, TA. EL-SAYED, LH. HAROUN, M., HUSSEIN, AA. EL SAYED, H. 2012. Development of immunization trials against *Klebsiella pneumoniae*. *Vaccine*, 30(14), 2411-2420.

AHMED D, ISLAM MS, BEGUM YA, JANZON A, QADRI F. 2012 Presence of enterotoxigenic *Escherichia coli* in biofilms formed in water containers in poor households coincides with epidemic seasons in Dhaka. *Journal of Applied Microbiology*.

ALOUACHE, S., ESTEPA, V., MESSAI, Y., RUIZ, E., TORRES, C., & BAKOUR, R. 2014. Characterization of ESBLs and associated quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from an urban wastewater treatment plant in Algeria. *Microbial Drug Resistance*, 20(1), 30-38.

ALVES MS, RUBENS CSD, CASTRO ACD, RILEY LW, MOREIRA BM. 2006. Identification of Clinical Isolates of Indole-Positive and Indole-Negative *Klebsiella* spp. 2006 *Journal of Clinical Microbiology* 44(10): 3640–46.

AMBLER, RP. 1980. The Structure of beta Lactamases. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 289(1036), 321-331.

AMINE, AEK. 2013. Extended Spectrum Beta-Lactamase Producing Bacteria in Waste Water Alexandria, Egypt. *International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics*, 3(6), 605.

ANAND, T., BERA, B. C., VAID, R.K., BARUA, S., RIYESH, T., VIRMANI, N. TRIPATHI, BN. 2016. Abundance of antibiotic resistance genes in environmental bacteriophages. *Journal of General Virology*, 97(12), 3458-3466.

ANDERSON, KF. 2007. Evaluation of methods to identify the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase in *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol*, v. 45, n. 8, p. 2723-5.

ANDRADE, LN., MINARINI, LAR. PITONDO-SILVA, A., CLIMACO, EC., PALAZZO, ICV. MEDEIROS, MIC. DARINI, ALC. 2010. Determinants of β -lactam resistance in

meningitis-causing *Enterobacteriaceae* in Brazil. *Canadian journal of microbiology*, 56(5), 399-407.

ANDRADE LN, CURIAO T, FERREIRA JC, LONGO JM, CLÍMACO EC, MARTINEZ R, RODRIGUES F, BASILE-FILHO A, EVARISTO MA, DEL PELOSO PF, RIBEIRO VB, BARTH AL, PAULA MC, BAQUERO F, CANTÓN R, DARINI AL, COQUE TM. 2011. Dissemination of *bla*KPC-2 by the spread of *Klebsiella pneumoniae* clonal complex 258 clones (ST258, ST11, ST437) and plasmids (IncFII, IncN, IncL/M) among *Enterobacteriaceae* species in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*. Jul;55(7):3579-83.

ANKITA, R. NANDITA, D. KRISHNA RAJA, M. GHOSH, AR. 2013. PCR Assisted Detection of ESBL Genes among Lake-water Bacterial Isolates. *International Journal of Applied Engineering Research*, 8(19).

ARAKAWA, Y., OHTA, M. KIDO, N. MORI, M. ITO, H. KOMATSU, T. FUJII, Y. KATO. N. 1989. Chromosomal β -lactamase of *Klebsiella oxytoca*, a new class A enzyme that hydrolyzes broad-spectrum-lactam antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother*. 33:63–70.

ARCILLA, MS, VAN HATTEM, JM, MATAMOROS, S. 2016. Dissemination of the *mcr-1* colistin resistance gene. *Lancet Infect Dis*. 16: 147–149

ANSSOUR, L. MESSAI, Y. ESTEPA, V. TORRES, C. BAKOUR, R. 2016. Characteristics of ciprofloxacin-resistant *Enterobacteriaceae* isolates recovered from wastewater of an Algerian hospital. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 10(07), 728-734.

ANUKOOL, U, GAZE WH, WELLINGTON EM. In situ monitoring of streptothricin production by *Streptomyces rochei* F20 in soil and rhizosphere. *Appl Environ Microbiol* 2004; 70: 5222–28.

ARPIN, C, QUENTIN C, GROBOST F, CAMBAU E, ROBERT J, DUBOIS V, COULANGE L, ANDRÉ C. 2009. Scientific Committee of ONERBA. Nationwide survey of extended β -spectrum beta β -lactamase- producing *Enterobacteriaceae* in the French community setting. *J Antimicrob Chemother*. 63:1205 -14.

BABINI, GS, LIVERMORE DM. 2000. Are SHV beta-lactamases universal in *Klebsiella pneumoniae*? *Antimicrob Agents Chemother*. Aug;44(8):2230.

BACHMAN, MA, OYLER JE, BURNS SH, CAZA M, LÉPINE F, DOZOIS CM, WEISER JN. 2011. *Klebsiella pneumoniae* yersiniabactin promotes respiratory tract infection through evasion of lipocalin 2. *Infect. Immun*. 79: 3309 –3316

BAE, IK., LEE, YN. JEONG, SH., HONG, SG., LEE, JH., LEE, SH., YOUN, H. 2007. Genetic and biochemical characterization of GES-5, an extended-spectrum class A β -lactamase from *Klebsiella pneumoniae*. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 58(4), 465-468.

- BAGATTINI, M, CRIVARO, V, DI POPOLO A, GENTILE F, SCARCELLA A, TRIASSI M, VILLARI P, ZARRILLI R. 2006. Molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal intensive care unit. *J Antimicrob Chemother.* May; 57(5):979-82.
- BAHAROGLU, Z. MAZEL, D. 2011. *Vibrio cholerae* triggers SOS and mutagenesis in response to a wide range of antibiotics: a route towards multiresistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 2438–2441.
- BAHRAMI, FL. MORRIS, DH. POURGHOLAMI, M. 2012. Tetracyclines: drugs with huge therapeutic potential. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 12(1), 44-52.
- BAQUERO, F. MARTINEZ, JL. CANTON. R. 2008. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Curr. Opin. Biotechnol.* 19:260–265.
- BATISTA, GVF. SILVA, GC. Pessoa, GT., de SÁ RRP. da SILVA Barbosa, MAP. PINTO, M. 2016. Análise microbiológica da água do rio Poti no perímetro urbano do município de Teresina, Piauí. *PUBVET*, 10(6), 470-476
- BARRETO, S, ZAMBRANO, M. 2009. Phenotypic variations of susceptibility in *Klebsiella pneumoniae* strains of nosocomial origin and their association with biofilm formation]. *PubMed Commons. Invest Clin*, v. 50, n. 2, p. 221–229.
- BARROSO, H., SILVESTRE, A., TAVEIRA, N. 2014. *Microbiologia Médica*, volume 1, Editora Lidel, ISBN 978-989-752-057-0.
- BAUER AW, KIRBY EM. 1966. Antibiotic Susceptibility Testing by Standardized Single Disk Method. *Am J Clin Pathol.* 45 (4):493-6.
- BAUERNFEIND, A. GRIMM, H. SCHWEIGHART, S. 1990. A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Infection*, v.18, n.5, p.294-298.
- BAUERNFEIND, A.; STEPLINGER, I.; JUNGWIRTH, R.; ERNST, S.; CASELLAS. JM. 1996. Sequences of beta-lactamase genes encoding CTX-M-1 (MEN-1) and CTX-M-2 and relationship of their amino acid sequences with those of other beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother*, v.40, n.2, p.509–513.
- BEN-DAVID, D. 2012. Outcome of carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections. *Clinical Microbiology and Infection*, [S.l.], v. 18, n.1, p. 54-60.
- BENITE, A. MACHADO, S. 2002. Sideróforos: uma resposta dos microorganismos. *Química Nova*. 25. 1155-1164
- BENTO, WO. VIEIRA, LDJA. SANTOS, PC. 2016. Determinação dos Parâmetros Físicos-químicos e Microbiológicos Nas Águas do Rio Mearim na Cidade de Bacabal-MA. VII Congresso Brasileiro de Gestão Ambiental Campina Grande/PB.

BERALDO-MASSOLI, MC. NARDI, CPP. MAKINO, LC. SCHOCKEN-ITURRINO. RP. 2012. Prevalência de infecções urinárias em pacientes atendidos pelo sistema único de saúde e sua suscetibilidade aos antimicrobianos. *Medicina (Ribeirao Preto. Online)*, 45(3), 318-321.

BERRAZEG, M. DIENE, SM. DRISSI, M. KEMPF, M. RICHEL, H. LANDRAUD, L., ROLAIN, JM. 2013. Biotyping of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates from France and Algeria using MALDI-TOF MS. *PLoS One*,8(4), e61428.

BERRY, GJ. LOEFFELHOLZ, MJ. WILLIAMS-BOUYER, N. 2015. An investigation into laboratory misidentification of a bloodstream *Klebsiella variicola* infection. *Journal of clinical microbiology*, 53(8), 2793-2794.

BLAIR, JM, WEBBER, MA, BAYLAY, AJ, OGBOLU, DO, PIDDOCK, LJ. 2015 Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol* 13:42–51.

BOGAERTS, P., NAAS, T., EL GARCH, F., CUZON, G., DEPLANO, A., DELAIRE, T. GLUPCZYNSKI, Y. 2010. GES extended-spectrum β -lactamases in *Acinetobacter baumannii* isolates in Belgium. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 54(11), 4872-4878.

BONNIN, RA., NORDMANN, P., POTRON, A., LECUYER, H., ZAHAR, JR., POIREL, L. 2011. Carbapenem-hydrolyzing GES-type extended-spectrum β -lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 55(1), 349-354.

BRADFORD, PA. 2001. Extended spectrum betalactamase in the 21 century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistant threat. *Clinical Microbiol Rev*, 14, 933-51.

BRÉCHET, C., PLANTIN, J., SAUGET, M., THOUVEREZ, M., TALON, D., CHOLLEY, P. BERTRAND, X. 2014. Wastewater Treatment Plants Release Large Amounts of Extended-Spectrum β -Lactamase–Producing *Escherichia coli* Into the Environment. *Clinical Infectious Diseases*.

BRISSE, S., VERHOEF, J. 2001. Phylogenetic diversity of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* clinical isolates revealed by randomly amplified polymorphic DNA, *gyrA* and *parC* genes sequencing and automated ribotyping. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 51(3), 915-924.

BRYERS JD. Medical biofilms. 2008. *Biotechnol Bioeng* May 1;100(1):1-18.

BUSH, K. 1989. Excitement in the beta-lactamase arena. *J Antimicrob Chemother*, v.24, n.6, p.831-836.

BUSH K. 2001. New beta-lactamases in gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. *Clin Infect Dis*.;32: 1085–1089.

BUSH, K. 2013. Proliferation and significance of clinically relevant β -lactamases. Ann N Y Acad Sci, v.1277, p.84-89.

BUSH, K. COURVALIN, P. DANTAS, G. 2011. Tackling antibiotic resistance. Nat Rev Microbiol. 2; 9 (12):894-6.

BUSH, K. JACOBY, GA. 2010. Updated functional classification of betalactamases. Antimicrob Agents Chemother, v.54, n.3, p.969-976.

BUSH, K. JACOBY, GA.; MEDEIROS, AA. 1995. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrob Agents Chemother, v.39, n. 6, p.1211-1233.

BUSH K, FISHER JF. 2011. Epidemiological expansion, structural studies, and clinical challenges of new beta-lactamases from gram-negative bacteria. Annual review of microbiology. 65:455-78.

CAMPOS, MA. VARGAS, MA. BALEARES, I. MALLORCA, PDE. 2004. Capsule Polysaccharide Mediates Bacterial Resistance to Antimicrobial Peptides. , v. 72, n. 12, p. 7107–7114.

CANAL, N. 2016. Characterization of the variable region in the class 1 integron of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* isolated from surface water. Braz. J. Microbiol. São Paulo, v. 47, n. 2, p. 337-344.

CANALIS, RF., AND L. ZAMBONI. 2001. An interpretation of the structural changes responsible for the chronicity of rhinoscleroma. Laryngoscope 111: 1020–1026.

CANTÓN, R. MOROSINI, MI. DE LA MAZA, OM. DE LA PEDROSA, EG. 2008. IRT and CMT-lactamases and inhibitor resistance. Clin. Microbiol. Infect. 14(Suppl. 1):53–62.

CANTON R, MOROSINI MI. 2011. Emergence and spread of antibiotic resistance following exposure to antibiotics. FEMS Microbiol Rev; 35(5):977-91.

CARBONETTI, NH. WILLIAMS, PH. 1985. Detection of synthesis of the hydroxamate siderophore aerobactina by pathogenic isolates of *Escherichia coli*. In: Sussman M. (Ed). The virulence of *Escherichia coli*. Reviews and Methods. Orland: Acad. Press. Inc. Orland, Cpa. 22. P. 419-424.

CARTER, MW. 2000. Detection of extended-spectrum β -lactamases in *Klebsiella* with the oxoid combination disk method. J Clin Microbiol, v. 38, n. 11, p. 4228- 32.

CASTRO, D. MELLO, RSP. 2013 Atlas Ambiental da Bacia Hidrográfica do Rio Tramandaí. Porto Alegre: Via Sapiens; Maquiné/RS: ANAMA.

CHAGAS, TPG. 2011. Detecção de bactérias multirresistentes aos antimicrobianos em esgoto hospitalar no Rio de Janeiro Tese de Doutorado, Instituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, Brasil.

CHAGAS TPG, CARVALHO KR, DE OLIVEIRA SANTOS IC, CARVALHO-ASSEF APD, ASENSI MD. 2014. Characterization of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Brazil (2008-2011): countrywide spread of OXA-23-producing clones (CC15 and CC79). 1999. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 79(4):468–72.

CHEN, FJ. CHAN, CH. HUANG, YJ. 2011. Structural and mechanical properties of *Klebsiella pneumoniae* type 3 Fimbriae. *Journal of bacteriology*, v. 193, n. 7, p. 1718–25

CHEN, LF. ANDERSON, DJ. PATERSON, DL. 2012. Overview of the epidemiology and the threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPC) resistance. *Infect Drug Resist.* v. 5:133-41.

CHEN JH, HO PL, KWAN GS, SHE KK, SIU GK, CHENG VC, YUEN KY, YAM WC. 2013. Direct bacterial identification in positive blood cultures by use of two commercial matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry systems. *J Clin Microbiol.*; 51: 1733-9.

CHEVALIER, J, MULFINGER C, GARNOTEL E, NICOLAS P, DAVIN-REGLI A, PAGÈS JM. 2008. Identification and evolution of drug efflux pump in clinical *Enterobacter aerogenes* strains isolated in 1995 and 2003. *PLoS One* 3:e3203.

CHROMÁ, M, HRICOVÁ K, KOLÁØ M, SAUER P, KOUKALOVÁ D. 2011. Using newly developed multiplex polymerase chain reaction and melting curve analysis for detection and discrimination of -lactamases in *Escherichia coli* isolates from intensive care patients. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 71:181–191.

CIURANA, B. TOMÁS. JM. 1987. Role of lipopolysaccharide and complement in susceptibility of *Klebsiella pneumoniae* to nonimmune serum. *Infect. Immun.* 55:2741-2746.

CLÍMACO, EC., MINARINI, LA. DA COSTA DARINI, AL. 2010. CTX-M–producing *Klebsiella spp.* in a Brazilian hospital: what has changed in 6 years?. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 68(2), 186-189.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI) 2010. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility testing: Twentieth informational supplement. January 2010; Clinical And Laboratory Standards Institute, Wayne, PA CLSI document M100-S20, 30(1), replaces M100-S19,29(3).

COOMBS, NJ., GOUGH, AC., PRIMROSE, JN. 1999. Optimisation of DNA and RNA extraction from archival formalin-fixed tissue. *Nucleic Acids Research*, 27(16), e12-i.

COSTA, JL. NUNES, IA. FRANÇA, L. 2011. Determinação dos Perfis de ERIC-PCR de *Escherichia coli* e *E. coli* o157:h7 Isoladas em Meias-carcaças Bovinas. Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos, [S.l.], v. 29, n. 1, ago. ISSN 19839774.

COURA, JR. 2013. Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias. 2. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

CRESS, BF. ENGLAENDER, JA. KASPER W. LINHARDT RJ. KOFFAS MA. 2013. Masquerading microbial pathogens: capsular polysaccharides mimic host-tissue molecules. FEMS Microbiol Rev. In press.

CROXATTO, A, PROD`HOM G, GREUB G. Applications of MALDI-TOF 2012 mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. FEMS Microbiol Rev. Mar; 36(2): 380-407.

CUZON, G, NAAS T, TRUONG H, VILLEGAS MV, WISELL KT, CARMELI Y. 2010. Worldwide diversity of *Klebsiella pneumoniae* that produce β -lactamase *bla*_{KPC-2} gene. Emerg Infect Dis.16:1349–56.

DATTA, N.; KONTOMICHALOU, P. 1965. Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in *Enterobacteriaceae*. Nature, v. 208, n. 5007, p. 239-41.

DE CHAMPS, C., VELLIN, J. F., DIANCOURT, L., BRISSE, S., KEMENY, J. L., GILAIN, L., & MOM, T. 2005. Laryngeal Scleroma Associated with *Klebsiella pneumoniae* subsp. *ozaenae*. *Journal of clinical microbiology*, 43(11), 5811-5813.

DECRÉ D, BURGHOFFER B, GAUTIER B, PETIT JC, ARLET G 2004. Outbreak of multi-resistant *Klebsiella oxytoca* involving strains with extended-spectrum beta-lactamases and strains with extended-spectrum activity of the chromosomal beta-lactamase. J Antimicrob Chemother. 2004;54:881–8 10.1093/jac/dkh440

DEL PELOSO, P. 2010. Antibiograma: NCCLS, Kirby -Bauer e Automação. Uma visão crítica. Sociedade Brasileira de Patologia clínica.

DHANJI, H. MURPHY, NM. DOUMITH, M. DURMUS, S. LEE, SS. HOPE, R. LIVERMORE, DM. 2010. Cephalosporin resistance mechanisms in *Escherichia coli* isolated from raw chicken imported into the UK. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 65(12), 2534-2537.

DHO-MOULIN, M. FAIRBROTHER. JM. 1999. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). Vet Res. 30(2-3): 299–316.

DI PILATO, V., ARENA, F., TASCINI, C., CANNATELLI, A., DE ANGELIS, LH., FORTUNATO, S., ROSSOLINI, GM. 2016. *mcr-1.2*, a new *mcr* variant carried on a transferable plasmid from a colistin-resistant KPC carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* strain of sequence type 512. Antimicrobial agents and chemotherapy, 60(9), 5612-5615.

DIAGO-NAVARRO, E., CHEN, L., PASSET, V., BURACK, S., ULACIA-HERNANDO, A., KODIYANPLAKKAL, RP. FRIES, BC. 2014. Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* exhibit variability in capsular polysaccharide and capsule associated virulence traits. *Journal of Infectious Diseases*, 210(5), 803-813.

DIAS, DJA. 2009. Estudo dos principais mecanismos de resistência aos antibióticos β -lactâmicos em bactérias patogênicas de Gram negativo Tese de Doutorado, FCT-UNL.

DIENSTMANN, R.; PICOLI, S. U.; MEYER, G.; SCHENKEL, T.; STEYER, J. 2010. Avaliação fenotípica da enzima *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) in *Enterobacteriaceae* de Ambiente Hospitalar. J. Bras. Patol. Med. Laboratório. Rio de Janeiro, v.46, n. 1, fevereiro.

DOIT C, MARIANI -KURKDJIAN P, BINGEN E. 2010. Extended –spectrum beta - lactamase producing *Enterobacteriaceae*. Arch Pediatr.;17 Suppl 4:S140 -4.

DORTET, L.; POIREL, L.; NORDMANN, P. 2014. Worldwide dissemination of the NDM-type carbapenemases in Gram-negative bacteria. BioMed Research International.

DRANCOURT, M. BOLLET, C. CARTA, A. ROUSSELIER, P. 2001. Phylogenetic analyses of *Klebsiella* species delineate *Klebsiella* and *Raoultella* gen. nov., with description of *Raoultella ornithinolytica* comb. nov., *Raoultella terrigena* comb.nov., *Raoultella planticola* comb.nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, v. 51, p. 925-932.

DRAWZ, SM. BONOMO, RA. 2010. Three decades of beta-lactamase inhibitors. Clin Microbiol Rev. 23(1):160-201.

DROPA, M. BALSALOBRE, LC. LINCOPAN, N. 2010. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* carrying the novel extended-spectrum beta-lactamase gene variants *bla*(SHV-40), *bla*(TEM-116) and the class 1 integron-associated *bla*(GES-7) in Brazil. Clin Microbiol Infect. Jun;16(6):630-2.

DU, H., CHEN, L., TANG, YW., KREISWIRTH, BN. 2016. Emergence of the *mcr-1* colistin resistance gene in carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. The Lancet infectious diseases, 16(3), 287-288.

DUNKELBERGER, JR, SONG WC 2010. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. Cell Res. 20: 34-50.

DWYER, DJ. KOHANSKI, MA. COLLINS, JJ. 2009. Role of reactive oxygen species in antibiotic action and resistance. Curr. Opin. Microbiol. 12, 482–489.

EL FERTAS-AISSANI, R, MESSAI Y, ALOUACHE S, BAKOUR R. 2013. Virulence profiles and antibiotic susceptibility patterns of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from different clinical specimens. *Pathol Biol* 61: 209-216,

ELIAS, TRDC. 2013. Avaliação da contaminação da água subterrânea de poços escavados em residências no Bairro Lagomar, Município de Macaé/RJ

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, (EFSA). 2011. Scientific opinion on the public health risks of bacterial strains producing extended-spectrum β -lactamases and/or AmpC β -lactamases in food and food-producing animals. *EFSA J.* 9(8):2322.

EUSÉBIO, A. ARAÚJO, ANDRADE, M. DUARTE, A. 2016. *Escherichia coli* nas infecções urinárias da comunidade: comensal ou patogénica? *Acta Urológica Portuguesa* Volume 33, Issue 2, May–August 2016, Pages 37–42.

EUZÉBY, JP. 2016. List of Prokaryotic Names With Standing In Nomenclature: Family *Enterobacteriaceae*. Disponível em: <http://www.bacterio.net>. Acessado em: 25/03/2017

EVANS, B, AMYES, SGB 2014. OXA β -lactamases. *Clinical Microbiology Reviews.* 27(2):241–63.

EVERAGE, TJ. BOOPATHY, R. NATHANIEL, R. LAFLEUR, G. DOUCET, J. 2014. A survey of antibiotic-resistant bacteria in a sewage treatment plant in Thibodaux, Louisiana, U. S. A. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 95, 2e10.

EVARD I, GRUYER X, DESSE P, FRANCOIS A, MARIE JP, DEHESDIN D, ANDRIEU-GUITRANCOURT J. 1998. Spheno-ethmoidal rhinoscleroma. Report of a case and review of the literature. *Ann Otolaryngol Chir Cervicofac.* May; 115(2):85-8.

FALAGAS, ME. KARAGEORGOPOULOS, DE. 2009 Extended-spectrum beta lactamase producing organisms. *The Journal of Hospital Infection* 73: 345–354.

FAM N, LEFLON-GUIBOUT V, FOUAD S, ABOUL-FADL L, MARCON E, DESOUKY D, EL-DEFRAWY I, ABOU-AITTA A, KLENA J, NICOLAS-CHANOINE MH. 2011. CTX-M-15-producing *Escherichia coli* clinical isolates in Cairo (Egypt), including isolates of clonal complex ST10 and clones ST131, ST73, and ST405 in both community and hospital settings. *Microb Drug Resist.* Mar; 17(1):67-73.

FAVRE-BONTE, S. JOLY, B. FORESTIER, C. 1999. Consequences of reduction of *Klebsiella pneumoniae* capsule expression on interactions of this bacterium with epithelial cells. *Infection and immunity*, v. 67, n. 2, p. 554–61.

FAZELI, H., NOROUZI-BAROUGH, M., AHADI, AM., SHOKRI, D., SOLGI, H. 2015. Detection of New Delhi Metallo-Beta-Lactamase-1 (NDM-1) in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolated from a university hospital in Iran. *Hippokratia*, 19(3), 205.

FELLER G., ZEKHNINI Z., LAMOTTE-BRASSEUR J., GERDAY C. 1997. Enzymes from cold-adapted microorganisms. The class C beta-lactamase from the antarctic psychrophile *Psychrobacter immobilis* A5. *Eur. J. Biochem.* 244 186–191

FERNANDES MR, MOURA Q, SARTORI L, SILVA KC, CUNHA MP, ESPOSITO F. 2016. Silent dissemination of colistin-resistant *Escherichia coli* in South America could contribute to the global spread of the *mcr-1* gene. *Euro Surveill.* 21(17):30214

FERREIRA, AE. MARCHETTI, DP., DE OLIVEIRA, LM., GUSATTI, CS., FUENTEFRIA, DB., CORÇÃO, G. 2011. Presence of OXA-23-producing isolates of *Acinetobacter baumannii* in wastewater from hospitals in southern Brazil. *Microbial Drug Resistance*, 17(2), 221-227.

FIETT, J., A. PALUCHA, B. MIACZYNSKA, M. STANKIEWICZ, H. PRZONDOMORDARSKA, W. HRYNIEWICZ, AND M. GNIADKOWSKI. 2000. A novel complex mutant -lactamase, TEM-68, identified in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from an outbreak of extended-spectrum -lactamase-producing klebsiellae. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44:1499–1505.

FONTES. LC. 2012. Monitoramento da resistência aos Antibacterianos. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. São Paulo. Brasil.

FORTALEZA, CMCB. CALDEIRA, SM., MOREIRA, RG., AKAZAWA, RT., CORRENTE, JE., DE SOUZA, LDR., DA CUNHA, AR. 2014. Tropical healthcare epidemiology: weather determinants of the etiology of bloodstream infections in a Brazilian hospital. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 35(1), 85-88.

FOUTS DE, TYLER HL, DEBOY RT, DAUGHERTY S, REN Q, BADGER JH. 2008. Complete genome sequence of the N₂-fixing broad host range endophyte *Klebsiella pneumoniae* 342 and virulence predictions verified in mice. *PLoS Genet.*;4:e1000141.

FREITAS, ALPD, MACHADO DP, SOARES FDSC. BARTH AL. 2003. Beta-lactamases de espectro ampliado em *Klebsiella* spp e em *Escherichia coli* obtidas em um hospital escola brasileiro: detecção, prevalência e tipagem molecular. *Brazil. J. Microbiol.* 34: 344-348.

FREITAS F, MACHADO E, RIBEIRO TG, NOVAIS A, PEIXE L. 2014 Long-term dissemination of acquired AmpC β -lactamases among *Klebsiella* spp. and *Escherichia coli* in Portuguese clinical settings. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 33:551–558.

FREIRE, TAS. 2015 Águas não Tratadas no Norte de Portugal. Qualidade microbiológica e Resistência aos Antibióticos. Repositório aberto da Universidade Do Porto- Faculdade de Farmácia. Dissertação de Mestrado. Portugal

GALES, AC., JONES, RN. GORDON, KA., SADER, HS., WILKE, WW., BEACH, ML. DOERN, GV. 2002. The SENTRY Study Group Latin America. Activity and spectrum of 22 antimicrobial agents tested against urinary tract infection pathogens in

hospitalized patients in Latin America: report from the second year of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1998). *J Antimicrob Chemother*, 45, 295-303.

GALES, AC., MENEZES, LC., SILBERT, S. SADER, HS. 2003. Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo- β -lactamase. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52(4), 699-702.

GARZA-RAMOS, U. SILVA-SÁNCHEZ, J. MARTÍNEZ-ROMERO, E. TINOCO, P., PINA-GONZALES, M. BARRIOS, H. TELLEZ-SOSA, J. 2015. Development of a multiplex-PCR probe system for the proper identification of *Klebsiella variicola*. *BMC microbiology*, 15(1), 64.

GAO, Q. WANG, X. XU, H. XU, Y. LING, J. ZHANG, D. GAO, S. LIU, X. 2012. Roles of iron acquisition systems in virulence of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: salmochelin and aerobactin contribute more to virulence than heme in a chicken infection Model. *BMC Microbiology*. 12(143), 1-12.

GHAFOURIAN, S., SADEGHIFARD, N., SOHEILI, S., SEKAWI, Z. 2014. Extended spectrum beta-lactamases: definition, classification and epidemiology. *Extended Spectrum Beta-lactamases*.

GISKE, CG. SUNDSFJORD, AS. KAHLMETER, G. 2009. Redefining extended-spectrum beta-lactamases: balancing science and clinical need. *J Antimicrob Chemother.*; 63(1):1-4.

GONZÁLEZ, LJ. MORENO, DM., BONOMO, RA., VILA, AJ. 2014. Host-specific enzyme-substrate interactions in SPM-1 metallo- β -lactamase are modulated by second sphere residues. *PLoS Pathog*, 10(1), e1003817.

GOODMAN & GILMAN: As Bases Farmacológicas da Terapêutica. 2012. 12^a ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill. Pg. 891

GUIMARÃES, G. FRANÇA, CAD. KRUG, FDS. PEIXOTO, RDM. KREWER, CDC. LAZZARI, AM. COSTA, MMD. 2012. Caracterização fenotípica, produção de biofilme e resistência aos antimicrobianos em isolados de *Staphylococcus spp.* obtidos de casos de mastite em bovinos e bubalinos. *Revista Pesquisa Veterinária Brasileira, Seropédica*, 32(12), 1219-1224.

GUPTA, V. 2008. Metallo beta lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species. *Expert Opin Investing Drugs*, v. 17, n. 2, p. 131-43.

GUTKIND, G., DI CONZA, J., POWER, P., RADICE, M. 2013. β -lactamase-mediated resistance: A biochemical, epidemiological and genetic overview. *Current pharmaceutical design*, 19(2), 164-208.

HAENNI, M., POIREL, L., KIEFFER, N., CHÂTRE, P., SARAS, E., MÉTAYER, V., MADEC, JY. 2016. Co-occurrence of extended spectrum β lactamase and *mcr-1* encoding genes on plasmids. *The Lancet infectious diseases*, 16(3), 281-282.

HALL-STOODLEY, L. COSTERTON, J. W. STOODLEY, P. 2004. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature reviews. Microbiology*, v. 2, n. 2, p. 95–108.

HANDKE, L, CONLON K, SLATER S. 2004. Genetic and phenotypic analysis of biofilm phenotypic variation in multiple *Staphylococcus epidermidis* isolates. *Journal of Medical Microbiology* 53, 367- 374.

HANSEN, DS. AUUCKEN, HM., ABIOLA, T., PODSCHUN, R. 2004. Recommended test panel for differentiation of *Klebsiella* species on the basis of a trilateral interlaboratory evaluation of 18 biochemical tests. *Journal of clinical microbiology*, 42(8), 3665-3669.

HASMAN, H, HAMMERUM, AM, HANSEN, F. 2015. Detection of *mcr-1* encoding plasmid-mediated colistin-resistant *Escherichia coli* isolates from human bloodstream infection and imported chicken meat, Denmark 2015. *Euro Surveill.* 20: 30085

HAYDEN, MK, LIN MY, LOLANS K, WEINER S, BLOM D, MOORE NM. 2015. Prevention of colonization and infection by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in long-term acute-care hospitals. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America.* 60:1153-61.

HARRISON, F. BUCKLING, A. 2009. Siderophore production and biofilm formation as linked social traits. *The ISME journal*, v. 3, p. 632–634.

HASTAK, K. 2008. DNA Synthesis From Unbalanced Nucleotide Pools Causes Limited DNA Damage That Triggers ATR-CHK1-dependent p53 Activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105.17

HELT, C. 2012. Occurrence, fate, and mobility of antibiotic resistant bacteria and antibiotic resistance genes among microbial communities exposed to alternative wastewater treatment systems.

HENRIQUES, IS., FONSECA, F., ALVES, A., SAAVEDRA, MJ., CORREIA, A. 2006. Occurrence and diversity of integrons and β -lactamase genes among ampicillin-resistant isolates from estuarine waters. *Research in microbiology*, 157(10), 938-947.

HIDER. RC. KONG. X. 2010 Chemistry and biology of siderophores. *Nat Prod Rep* 27: 637- 657

HIROI, M, HARADA T, KAWAMORI F, TAKAHASHI N, KANDA T. 2011 A survey

of beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in farm animals and raw retail meat in Shizuoka Prefecture, Japan. Japanese Journal of Infectious Diseases 64: 153–155.

HOLT, KE, WERTHEIM H, ZADOKS RN, BAKER S, WHITEHOUSE CA, DANCE D, JENNEY A, CONNOR TR, HSU LY, SEVERIN J, BRISSE S, CAO H, WILKSCH J, GORRIE C, SCHULTZ MB. 2015. Genomic analysis of diversity, population structure, virulence, and antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae*, an urgent threat to public health. Proc Natl Acad Sci USA 112:E3574–E3581

HOLVOET, K, SAMPERS I, CALLENS B, DEWULF J, UYTENDAELE M 2013. Moderate Prevalence of antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolates from lettuce, irrigation water, and soil. Applied and Environmental Microbiology, 79(21): 6677- 83.

HULTON, CS, HIGGINS CF, SHARP PM. 1991. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. Mol Microbiol. 5(4):825–34

HUMENIUK, CG. ARLET. 2002. Beta-lactamases of *Kluyvera ascorbata*, probable progenitors of some plasmid-encoded CTX-M types. Antimicrob Agents Chemother, v.46, n.9, Sep, p.3045-9.

ILLMER, P. BUTTINGER, R. 2006 Interactions between iron availability, aluminium toxicity and fungal. Biometals 19:367-377

JACOBY, GA. 2009. AmpC beta-lactamases. Clin. Microbiol. Rev. 22: 161-182.

JAIN, A., & MONDAL, R. 2008. TEM & SHV genes in extended spectrum [beta]-lactamase producing *Klebsiella* species & their antimicrobial resistance pattern. *Indian Journal of Medical Research*, 128(6), 759.

JAYARAMAN, A, WOOD, TK. 2008. Bacterial quorum sensing: signals, circuits, and implications for biofilms and disease. Annu Rev Biomed Eng 10:145-67.

JELLEN-RITTER, AS., KERN, WV. 2001. Enhanced expression of the multidrug efflux pumps AcrAB and AcrEF associated with insertion element transposition in *Escherichia coli* mutants selected with a fluoroquinolone. Antimicrobial agents and chemotherapy, 45(5), 1467-1472.

JOHNSON, JR, URBAN, C, WEISSMAN, SJ, JORGENSEN, JH, LEWIS, JS, HANSEN, G. 2012. Molecular epidemiological analysis of *Escherichia coli* sequence type ST131 (O25:H4) and blaCTX-M-15 among extended-spectrum-beta-lactamase-producing E. coli from the United States, 2000 to 2009. Antimicrob. Agents Chemother. 56:2364-2370

JURY, KL, VANCOV T, STUETZ RM, KHAN SJ. 2010 Antibiotic resistance dissemination and sewage treatment plants. Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology - A. Méndez-Vilas Ed. Formatex p.509-519

KAISER, TDL. SANTIAGO, DD., MENDES, EMT, MATOS, BV. 2016. Detecção de Betalactamase de Espectro Estendido Em Isolados de Enterobactérias Provenientes de um Hospital da Região de Santa Teresa-ES. Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR, 20(1).

KEMPER, C, ATKINSON JP. 2007. T-cell regulation: with complement from innate immunity. Nat Rev Immunol 9-18.

KEYS, CJ, DARE DJ, SUTTON H, WELLS G, LUNT M, MCKENNA T, MCDOWALL M, SHAH HN. 2004. Compilation of a MALDI-TOF mass spectral database for the rapid screening and characterisation of bacteria implicated in human infectious diseases. Infect Genet Evol.; 4:221-42.

KLIEBE, CBA. NIES, JF. MEYER, RM. Wiedemann B. 1985. Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins. Antimicrob. Agents Chemother. 28:302-307.

KNOTHE, H., SHAH, P., KRCMERY, V., ANTAL, M., MITSUHASHI, S. 1983. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection*, 11(6), 315-317.

KREWULAK, KD. VOGEL, HJ. 2011. TonB or not TonB: is that the question? Biochem. Cell. Biol. Apr;89(2):87-97.

KUBISTA, M, ANDRADE JM, BENGTSSON M, FOROOTAN A, JONAK J, LIND K. 2006. The real-time polymerase chain reaction. Mol Aspects Med. 27:95-125.

KUEN, MJ. 1994. Genetic, biochemical and structural studies of biogenesis of adhesive pill in bacteria. Meth and Enzyme. v. 236, p. 282-306.

LAHEY CLINIC. 2007. Amino Acid Sequences for TEM, SHV and OXA Extended-Spectrum and Inhibitor Resistant β -Lactamases. <http://www.lahey.org/studies>.

LALZAMPUIA, H., DUTTA, TK., WARJRI, I., CHANDRA, R. 2014. Detection of extended-spectrum β -lactamases (*bla*CTX-M-1 and *bla*TEM) in *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., and *Klebsiella pneumoniae* isolated from poultry in North Eastern India. Veterinary World, 7(11), 1026-1031.

LANZER, RM. RAMOS, CBV. MARCHETT, CA. 2013. Impactos ambientais do turismo em lagoas costeiras do Rio Grande do Sul. *Caderno Virtual de Turismo*, 13(1).

LECHEVALLIER, MW. BABCOCK TM. LEE RG. 1987. Examination and Characterization of Distribution System Biofilms. Applied and Environmental Microbiology, 53. 2714-24.

LEE,GC. BURGESS, DS. 2012 Treatment of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) infections: a review of published case series and case reports. Ann Clin Microbiol Antimicrob, 11:32.

LENTZ, SA., DE LIMA-MORALES, D., CUPPERTINO, VM., DE S NUNES, L., DA MOTTA, AS., ZAVASCKI, AP., MARTINS, AF. 2016. Letter to the editor: *Escherichia coli* harbouring *mcr-1* gene isolated from poultry not exposed to polymyxins in Brazil. Eurosurveillance, 21(26).

LI, J, NATION, RL, TURNIDGE, JD. 2006 Colistin: the re-emerging antibiotic for multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. Lancet Infect Dis. 6: 589–601

LI, S. ZHAO, M. LIU, J. ZHOU, Y. MIAO, Z. 2016. Prevalence and Antibiotic Resistance Profiles of Extended-Spectrum β -Lactamase–Producing *Escherichia coli* Isolated from Healthy Broilers in Shandong Province, China. Journal of Food Protection, 79(7), 1169-1173.

LI W, SUN G, YU Y, LI N, CHEN M, JIN R, JIAO Y, WU H. 2014. Increasing occurrence of antimicrobial-resistant hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae* isolates in China. Clin Infect Dis 58:225–232.

LIMA, MRS., SOARES, NDS., MASCARENHAS, MDM., AMARAL, EJLDS. 2014. Intervenção em surto de *Klebsiella pneumoniae* produtora de betalactamase de espectro expandido (ESBL) em unidade de terapia intensiva neonatal em Teresina, Piauí, 2010-2011. Epidemiologia e Serviços de Saúde, 23(1), 177-182.

LIU, YY. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. 2016. The Lancet infectious diseases, 16(2), 161-168.

LIU. Y. WANG, JY. JIANG, W. 2013. An Increasing Prominent Disease of *Klebsiella pneumoniae* Liver Abscess: Etiology, Diagnosis, and Treatment. Gastroenterology research and practice.

LIU YY, WANG Y, WALSH TR, YI LX, ZHANG R, SPENCER J, DOI Y, TIAN G, DONG B, HUANG X, YU LF, GU D, REN H, CHEN X, LV L, HE D, ZHOU H, LIANG Z, LIU JH, SHEN J. 2016. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism *mcr-1* in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. Lancet Infect Dis 16:161–168

LIU Y, LI XY, WAN LG, JIANG WY, YANG JH, LI FQ. 2014. Virulence and transferability of resistance determinants in a novel *Klebsiella pneumoniae* sequence type 1137 in China. Microb Drug Resist 20:150 –155

LIVERMORE, DM. 1995. Beta-lactamases in clinical and laboratory resistance. Clinical Microbiology Reviews 8:557-584.

LIVERMORE, DM. WOODFORD, N. 2006. The β -lactamase threat in Enterobacteriaceae, Pseudomonas and Acinetobacter. Trends Microbiol. 14:413-420.

LIVERMORE, MD.; MUSHTAQ, S.; WARNER, M.; MIOSSEC, C.; WOODFORD, N. 2008. combinations versus Enterobacteriaceae with CTX-M extended spectrum β -lactamases and carbapenemases. J Antimicrob Chemother, v.62, n.5, p.1053-1056.

LOCATELLI, MAF. SODRÉ, FF. JARDIM, WF. 2011. Determination of antibiotics in Brazilian surface waters using liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. Archives of environmental contamination and toxicology, 60(3), 385-393.

LOGAN, JM., EDWARDS, KJ. SAUNDERS, NA. 2009. Real-time PCR: current technology and applications. Horizon Scientific Press.

LLOBET, E. TOMÁS, JM. BENGOCHEA, JA. 2008. Capsule polysaccharide is a bacterial decoy for antimicrobial peptides. Microbiology (Reading, England), v. 154, n. Pt 12, p. 3877–86.

LOPES, CDB. 2009. Infecção do trato urinário em crianças de um hospital público do Pará-Brasil: perfil clínico-epidemiológico e genotipagem dos uropatógenos Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Pará.

LU, SY. ZHANG, YL. GENG, SN. LI, TY. YE, ZM. ZHANG, DS. ZHOU, HW. 2010. High diversity of extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria in an urban river sediment habitat. Applied and environmental microbiology, 76(17), 5972-5976.

MAATALLAH, M. VADING, M. KABIR, MH. BAKHROUF, A. KALIN, M., NAUCLÉR, P. GISKE, CG. 2014. Klebsiella variicola is a frequent cause of bloodstream infection in the Stockholm area, and associated with higher mortality compared to K. pneumoniae. PLoS One, 9(11), e113539.

MACEDO, GL de. FALCÃO, LFR. 2011. Farmacologia Aplicada em Medicina Intensiva. São Paulo: Editora Roca.

MADIGAN, MT. MARTINKO, JM. PARKER, J. 2010. Microbiologia de Brock. 10. ed. São Paulo, SP: Prentice Hall Brasil. Pag. 110.

MAGESH, H. KUMAR, A. ALAM, A. 2013. Identification of natural compounds, which inhibit biofilm formation in clinical isolates of Klebsiella pneumoniae. PubMed Commons. Indian Journal of Experimental Biology (IJEB), v. 51, n. 9, p. 764–772

MALOWANY, MS., CHESTER, B., ALLERHAND, J. 1972. Isolation and microbiologic differentiation of Klebsiella rhinoscleromatis and Klebsiella ozaenae in cases of chronic rhinitis. American journal of clinical pathology, 58(5), 550-553.

MARQUES, MA. 2011. Caracterização de fatores de virulência e do perfil de resistência antimicrobiana de *Escherichia coli* uropatogênica (UPEC) oriunda da comunidade de São Luís-MA. Dissertação de Mestrado. Centro Universitário do Maranhão- Uniceuma

MARTINEZ, JL. 2009. Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environmental Pollution*, Amsterdam, v. 157, n. 11, p. 2893-2902.

MARTINS, CFG. 2014. Caracterização fenotípica e genotípica de bactérias do ácido acético isoladas de alimentos.

MARTINS, WMBDS. 2014. Estudo de mecanismos de resistência e virulência em isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtores de carbapenemase Tese de doutorado, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães.

MARINESCU, F. MARUTESCU, L. SAVIN, I. LAZAR, V. 2015. Antibiotic resistance markers among Gram-negative isolates from wastewater and receiving rivers in South Romania. *Romanian Biotechnological Letters*, 20(1), 10055-10069.

MAVROIDI, A.; TSAKRIS, A.; TZELEPI, E.; POURNARAS, S.; LOUKOVA, V.; TZOUVELEKIS, LS. 2000. Carbapenem-hydrolysing VIM-2 metallo- β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* from Greece. *J. Antimicrob. Chemother.*, v.46, n. p.1037-1046.

MAVROIDI, A. LIAKOPOULOS, A.; GOUNARIS, A. 2014. Successful control of a neonatal outbreak caused mainly by ST20 multidrug-resistant SHV-5-producing *Klebsiella pneumoniae*, Greece. *BMC Pediatric*. 14:105,

MCBAIN, AJ. 2009. Chapter 4 In Vitro Biofilm Models. p. 99–132.

MEDELL, M.; HART, M.; MARRERO, O. 2012. Clinical and microbiological characterization of pneumonia in mechanically ventilated patients. *The Brazilian journal of infectious diseases: an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases*, v. 16, n. 5, p. 442–7. Elsevier Editora Ltda.

MEDINA, L, BENAZZO M, BERTINO G, MONTECUCCO CM, DANESINO C, MARTINETTI M, MIRA E. 2003 Clinical, genetic and immunologic analysis of a family affected by ozena. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. Aug; 260(7):390-4.

MENDES, RE, KIYOTA KA, MONTEIRO J. 2007. Rapid detection and identification of metallo- β -lactamase-encoding genes by multiplex real-time PCR assay and melt curve analysis. *J Clin Microbiol*; 45: 544–7.

MENDES, RE., J.M. BELL, JD. TURNIDGE, M. CASTANHEIRA, RN. Jones. 2009. Emergence and widespread dissemination of OXA-23, -24/40 and -58 carbapenemases among *Acinetobacter spp.* in Asia-Pacific nations: report from the SENTRY Surveillance.

- MENDONÇA, M. L., VOEGELS, R. L., SENNES, L. U., BUTUGAN, O. 2000. Tratamento cirúrgico da rinite atrófica. Arquivos Internacionais de Otorrinolaringologia. Vol. 4. Disponível em: http://www.arquivosdeorl.org.br/conteudo/acervo_port_print.asp?id=113. Acessado em 16/06/2017
- MERINO, S. CAMPRUBÍ, S. ALBERTÍ, S. BENEDÍ, VJ. TOMÁS. JM. 1992. Mechanisms of *Klebsiella pneumoniae* resistance to complement-mediated killing. Infect. Immun. 60:2529-2535.
- MERKIER, AK, CENTRON D. 2006. *bla* (OXA-51)-type beta-lactamase genes are ubiquitous and vary within a strain in *Acinetobacter baumannii*. Int J Antimicrob Agents 28: 110–113.
- MIETHKE, M. MARAHIEL, MA. 2007. Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. Microbiology and molecular biology reviews : MMBR, v. 71, n. 3, p. 413– 51.
- MOCELLIN, L. 2007. A Rinite Atrófica Fétida em Nossos Dias. Disponível em: http://arquivosdeorl.org.br/conteudo/acervo_port.asp?id=424. Acessado em: 16/06/2017.
- MOORE, R. O'SHEA, D. GEOGHEGAN, T. MALLON, PWG. SHEEHAN, G. 2013. Community-acquired *Klebsiella pneumoniae* liver abscess: an emerging infection in Ireland and Europe. Infection, v. 41, n. 3, p. 681–6.
- MONTEIRO, J, SANTOS AF, ASENSII MD. 2009. First report of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. Antimicrob Agents Chemother; 53: 333–4.
- MONTEIRO, J., WIDEN, RH., PIGNATARI, AC., KUBASEK, C., SILBERT, S. 2012. Rapid detection of carbapenemase genes by multiplex real-time PCR. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 67(4), 906-909.
- MORANTA, D. REGUEIRO, V. MARCH, C. 2010. *Klebsiella pneumoniae* capsule polysaccharide impedes the expression of beta-defensins by airway epithelial cells. Infection and immunity, v. 78, n. 3, p. 1135–46.
- MOREIRA, VC, FREIRE D. 2011. *Klebsiella pneumoniae* e sua resistência a antibióticos [monografia]. Goiás (GO): Univ. Católica de Goiás.
- MURRAY, P., ROSENTHAL, KS., PFALLER, MA. 2015. *Microbiología médica*. Elsevier Brasil.
- NAPARSTEK, L. CARMELI, Y. NAVON-VENEZIA, S. BANIN, E. 2014. Biofilm formation and susceptibility to gentamicin and colistin of extremely drug-resistant KPC producing *Klebsiella pneumoniae*. The Journal of Antimicrobial Chemotherapy, p. 1–8.

NASCIMENTO, VFS, ARAÚJO MFF. 2013. Ocorrência de Bactérias Patogênicas Oportunistas Em Um Reservatório do Semiárido do Rio Grande do Norte, Brasil. Revista de ciências ambientais. Dissertação de Doutorado.

NEWBURY. SF. SMITH NH. ROBINSON. EC., HILES. ID. HIGGINS CF. 1987 Stabilization of translationally active mRNA by prokaryotic REP sequences. Cell. Jan 30; 48(2): 297–310.

NISHINO, K., YAMADA, J., HIRAKAWA, H., HIRATA, T., YAMAGUCHI, A. 2003. Roles of TolC-dependent multidrug transporters of *Escherichia coli* in resistance to β -lactams. Antimicrobial agents and chemotherapy, 47(9), 3030-3033.

NIVEDITHA, S. PRAMODHINI, S. UMADEVI, S. KUMAR, S. STEPHEN, S. 2012. The Isolation and the Biofilm Formation of Uropathogens in the Patients with Catheter Associated Urinary Tract Infections (UTIs). Journal of clinical and diagnostic research : JCDR, v. 6, n. 9, p. 1478–82.

NORDMANN, P, CUZON, G, NAAS, T. 2009. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase- producing bacteria. Lancet Infect Dis 9:228–236.

NORDMANN, P; NAAS, T; POIREL, L. 2011. Global spread of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. Emerg Infect Dis.

NORDMANN P, POIREL L. 2016. Plasmid-mediated colistin resistance: an additional antibiotic resistance menace. Clin Microbiol Infect 22:398 – 400

OLAITAN, AO, CHABOU, S, OKDAH, L, MORAND, S, ROLAIN, JM. 2016. Dissemination of the *mcr-1* colistin resistance gene. Lancet Infect Dis. 16: 147

OLESEN, B., HANSEN, DS. NILSSON, F., FRIMODT-MØLLER, J., LEIHOF, R. F., STRUVE, C. JOHNSON, JR. 2013. Prevalence and characteristics of the epidemic multi-resistant *Escherichia coli* ST131 clonal group among extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *E. coli* in Copenhagen. Journal of clinical microbiology, JCM-00346.

OLIVEIRA, DRP. de CASTRO, ACL., SOARES, LS., NASCIMENTO, AR., PORTO, HLR. 2012. Avaliação do grau de contaminação microbiológica do estuário do Rio Paciência, Estado do Maranhão. Arquivos de Ciência do Mar,45(1).

OLIVEIRA, LA. FERNANDES, OC., JESUS, MA. BENTES, JLS. ANDRADE, SL., SOUZA, AQL. SANTOS, C. 2016. Diversidade microbiana da Amazônia. Diversidade microbiana da Amazônia, 1-436.

OLSON, AB. SILVERMAN. M. 2005. Identification of a progenitor of the CTX-M-9 group of extended-spectrum beta-lactamases from *Kluyvera georgiana* isolated in Guyana. Antimicrob Agents Chemother, v.49, n.5, May, p.2112-5.

OSBORN, AM, BOLTNER D. 2002. When phage, plasmids, and transposons collide: genomic islands, and conjugative- and mobilizable transposons as a mosaic continuum. *Plasmid*; 48: 202–12.

PAN, YJ. 2013. Capsular Types of *Klebsiella pneumoniae* Revisited by wzc Sequencing. *PLoS One*, [S.I.], v8, n.12.

PATERSON, DL. BONOMO, RA. 2005. Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update. *Clin. Microbiol.Rev.* 18, 657–686.

PEIRANO, G, RICHARDSON, D, NIGRIN, J, MCGEER, A, LOO V, 2010. High prevalence of ST131 isolates producing CTX-M-15 and CTX-M-14 among extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* on June 21, 2017

PEREIRA, PS. 2016. Caracterização molecular de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de carbapenemases do tipo KPC-2, NDM-1 e OXA-370 isoladas no Brasil. Tese de doutorado.

PEREIRA, LDO. 2013. Perfil de resistência aos antimicrobianos em coliformes isolados do Sistema Municipal de Abastecimento de Água de São José do Rio Preto-SP.

PERNA, TDGS., PUIATTI, MA., PERNA, DH., MARTINS, NM., PEREIRA, MGC., FERREIRA, CMD. 2015. Prevalência de infecção hospitalar pela bactéria do gênero klebsiella em uma Unidade de Terapia Intensiva. Qualidade de vida e variáveis associadas ao envelhecimento patológico, 13(2), 119-23.

PETERSON, LR. 2008. Antibiotic policy and prescribing strategies for therapy of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: the role of piperacillin–tazobactam. *Clinical Microbiology and Infection*, 14(s1), 181-184.

PHILIPPE, N, MAIGRE, L, SANTINI, S, PINET, E, CLAVERIE, JM, DAVIN-REGLI, A, PAGÈS, JM, MAIS, M. 2015. *In vivo* evolution of bacterial resistance in two cases of *Enterobacter aerogenes* infections during treatment with imipenem. *PLoS One* 10:e0138828.

PICÃO, RC. 2006. Metallo- β -lactamase detection: comparative evaluation of double-disk synergy versus combined disk tests for IMP-, GIM-, SIM-, SPM-, or VIM-producing isolates. *J Clin Microbiol*, v. 46, n. 6, p. 2028-37.

PICÃO, RC. POIREL, L. GALES, AC. NORDMANN, P. 2009. Diversity of β -lactamases produced by ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates causing bloodstream infections in Brazil. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 53(9), 3908-3913.

PINTO-TOMAS, AA, ANDERSON MA, SUEN G, STEVENSON DM, CHU FS, CLELAND WW. 2009. Symbiotic nitrogen fixation in the fungus gardens of leaf-cutter ants. *Science*.326:1120–3.

- PODDER, MP. ROGERS, L., DALEY, PK., KEEFE, GP., WHITNEY, HG., TAHLAN, K. 2014. *Klebsiella* species associated with bovine mastitis in Newfoundland. PloS one, 9(9), e106518.
- PODSCHUN, R.; FISCHER, A.; ULLMAN, U. 1998. Characterization of *Klebsiella terrigena* strains from humans: haemagglutinins, serum resistance, siderophore synthesis, and serotypes. Epidemiology and Infection, v. 125, n. 1, p. 71-78.
- PODSCHUN R, PIETSCH S, HOLLER C, ULLMANN U. 2001 Incidence of *Klebsiella* species in surface waters and their expression of virulence factors. Appl Environ Microbiol. 67: 3325-3327, doi: 10.1128/AEM.67.7.3325-3327.2001
- PODSCHUN, R.; ULLMANN, U. 2000. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. Clinical Microbiology Reviews, v. 11, n. 4, p. 589-603.
- POIREL, L, BONNIN, RA, NORDMANN, P. 2012. Genetic support and diversity of acquired extended spectrum β -lactamases in Gram-negative rods. Infect Genet Evol. 12(5):883-93.
- POIREL L, LEBESSI E, CASTRO M, FEVRE C, FOUSTOUKOU M, NORDMANN P. 2004 Nosocomial outbreak of extended-spectrum β -lactamase SHV-5-producing isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Athens, Greece. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 48(6):2277-9.
- POIREL L, NAAS T, NORDMANN P. 2010. Diversity, epidemiology, and genetics of class D beta-lactamases. Antimicrob Agents Chemother 54: 24–38.
- POIREL, L.; NAAS, T.; NICOLAS, D.; COLLET, L.; BELLAIS, S.; CAVALLO, JD.; NORDMANN, P. 2000. Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo- β -lactamase and its plasmid-and integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 44, n. 4, p. 891-897.
- PORAT, R. JOHNS. MA. MCCABE. WR. 1987. Selective pressures and lipopolysaccharide subunits as determinants of resistance of clinical isolates of gram-negative bacilli to human serum. Infect. Immun. 55:320-328.
- QUEENAM, AM, BUSH K. 2007. Carbapenemases: the versatile β -lactamases. Clin Microbiol Rev; 20(3):440-458.
- RAMIREZ, MV. COWART, KC., CAMPBELL, PJ., MORLOCK, G. P., SIKES, D., WINCHELL, J. M., POSEY, JE. 2010. Rapid detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by use of real-time PCR and high-resolution melt analysis. Journal of clinical microbiology, 48(11), 4003-4009.
- RAMOS, PIP. 2014. Comparative analysis of the complete genome of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* Kp13 reveals remarkable genome plasticity and a

wide repertoire of virulence and resistance mechanisms. *BMC genomics*, London, v. 15, p. 54.

RASHEED, JK, JAY, C, METCHOCK, B, BERKOWITZ, F, WEIGEL, L, CRELLIN, J, STEWARD, C, HILL, B, MEDEIROS, AA, TENOVER, FC. 1997. Evolution of Extended-Spectrum β -Lactam Resistance (SHV-8) in a strain of *Escherichia coli* during Multiple Episodes of Bacteremia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 41: 647-653.

RATHER, MA. AULAKH, RS. GILL, JPS. MIR, AQ. HASSAN, MN. 2012. Detection and sequencing of plasmid encoded tetracycline resistance determinants (tetA and tetB) from food-borne *Bacillus cereus* isolates. *Asian Pacific journal of tropical medicine*, 5(9), 709-712.

REED, GH, KENT JO, WITWER CT. 2007. High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. *Pharmacogenomics.*, 8 (6): 597-608. 10.2217/14622416.8.6.597.

REGUÉ, M. HITA, B. PIQUÉ, N. 2004. A Gene, *uge*, Is Essential for *Klebsiella pneumoniae* Virulence A Gene, *uge*, Is Essential for *Klebsiella pneumoniae* Virulence.

REICHARD, PU. 2005. Effects of microbial and plant siderophore ligands on the dissolution of iron oxides. Swiss Federal Institute of Technology, Zurich.

REISS, I. BORKHARDT, A. FÜSSLE, R. SZIEGOLIT, A. GORTNER, L. 2000. Disinfectant contaminated with *Klebsiella oxytoca* as a source of sepsis in babies. *The Lancet*, 356(9226), 310.

REYNOLDS, K. 2013. Newly Released Review on Drinking Water Outbreak Causes. Water Conditioning & Purification.

RIZZO, L, MANAIA, C, MERLIN, C, SCHWARTZ, T, DAGOT, C, PLOY, MC, MICHAEL, I FATTA-KASSINOS, D. 2013 Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: a review. *Sci Total Environ* 447: 345–360.

RYAN, KJ., RAY, CG. SHERRIS, JC. 2010. *Sherris medical microbiology*. New York, McGraw Hill Medical.

RYSZ, M. MANSFIELD, WR. FORTNER, JD. ALVAREZ, PJ. 2013. Tetracycline resistance gene maintenance under varying bacterial growth rate, substrate and oxygen availability, and tetracycline concentration. *Environmental science & technology*, 47(13), 6995-7001.

ROBERT, J, PANTEL, A, MERENS, A, LAVIGNE, JP, NICOLAS-CHANOINE, MH, GROUP ONSCRS 2014. Incidence rates of carbapenemase-producing

Enterobacteriaceae clinical isolates in France: a prospective nationwide study in 2011–12. *J Antimicrob Chemother* 69:2706–2712.

RODRIGUEZ, MTT. 2015. Streptococcus e Enterococcus isolados de águas marinhas e de galerias pluviais na costa de Fortaleza: perfil de resistência a antibióticos. 2015. 143 f. Tese (Doutorado em Ciências Marinhas Tropicais) - Instituto de Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

ROBLEDO, IE, AQUINO EE, VAZQUEZ GJ. 2011. Detection of the KPC gene in *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter baumannii* during a PCR-based nosocomial surveillance study in Puerto Rico. *Antimicrob Agents Chemother* 55: 2968–2970.

RODRÍGUEZ-ROJAS, A., RODRÍGUEZ-BELTRÁN, J., COUCE, A. BLÁZQUEZ, J. 2013. Antibiotics and antibiotic resistance: A bitter fight against evolution. *Int. J. Med. Microbiol.* v. 303, 293-297.

ROSEN, DA. PINKNER, JS. WALKER, JN. ELAM, JS. JONES, JM. HULTGREN, S. J. 2008. Molecular variations in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* fimH affect function and pathogenesis in the urinary tract. *Infection and Immunity*, v. 76, n. 7, p. 3346-3356.

ROSENBLUETH M, MARTINEZ L, SILVA J, MARTINEZ-ROMERO E. 2004. *Klebsiella variicola*, a novel species with clinical and plant-associated isolates. *Syst Appl Microbiol.* 27:27–35.

SÁ, CMF. 2010. ESBL em enterobactérias no Centro Hospitalar Póvoa de Varzim/Vila do Conde. Tese de Doutorado - Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro, Portugal.

SADER, HS, 2005. IMPs, VIMs and SPMs: the diversity of metallo-beta-lactamases produced by carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian hospital. *Clin Microbiol Infect*, v. 11, n. 1, p. 73-6.

SHAHID, M., KHAN, HM. SOBIA, F., SINGH, A., KHAN, F., SHAH, M. KHAN, IM. 2014. Molecular of various antibiotics resistance genes, including bla_{NDM-1}, in Indian environmental and clinical bacterial isolates: A comparative study. *New Zealand Journal of Medical Laboratory Science*, 68(1), 9.

SAHLY, H.; NAVON-VENEZIA, S.; ROESLER, L.; HAY, A.; CARMELI, Y.; PODSCHUN, R.; HENNEQUIN, C.; FORESTIER, C.; OFEK, I. 2008. Extended-spectrum β -lactamase production is associated with an increase in cell invasion and expression of fimbrial adhesins in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 52, n. 9, p. 3029-3034.

SAHLY H, AUCKEN H, BENEDÍ VJ. 2004. Increased Serum Resistance in *Klebsiella pneumoniae* Strains Producing Extended-Spectrum β -Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.;48 (9):3477-3482.

SALABI, AE, TOLEMAN MA, WEEKS J, BRUDERER T, Frei R. 2010. First report of the metallo- β -lactamase SPM-1 in Europe. *Antimicrob Agents Chemother* 54: 582.

SANTANA, TCFS. PEREIRA, EDMM. MONTEIRO, SG. do CARMO. MS. TURRI, RDJG. FIGUEIREDO, PDMS. 2012. Prevalência e resistência bacteriana aos agentes antimicrobianos de primeira escolha nas infecções do trato urinário no município de São Luís-MA. *Revista de Patologia Tropical*, 41(4).

SAUER, K, CAMPER AK, EHRLICH GD. 2002. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J Bacteriol* 184(4):1140-54. 17.

SCAPIN, D. ROSSI, EM. ORO, D. 2012. Qualidade microbiológica da água utilizada para consumo humano na região do extremo oeste de Santa Catarina, Brasil. *Rev. Inst. Adolfo Lutz (Impr.)*, São Paulo, v. 71, n. 3.

SCHEMBRI, MA. BLOM, J.; KROGFELT, KA.; KLEMM, P. 2005. Capsule and Fimbria Interaction in *Klebsiella pneumoniae*. *American Society for Microbiology*, v. 73, n. 8, p. 4626–4633.

SEKI, M, GOTOH, K, NAKAMURA, S, AKEDA, Y, YOSHII, T, MIYAGUCHI, S, INOHARA, H. 2013. Fatal sepsis caused by an unusual *Klebsiella* species that was misidentified by an automated identification system. *Journal of Medical Microbiology*. 62, 801–8.

SENG, P, DRANCOURT, M, GOURIET, F, LA SCOLA, B, FOURNIER PE, ROLAIN JM, RAOULT D. 2009. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrixassisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin. Infect. Dis.* 49: 543-51.

SHARP, PM. 1997. Insertions within ERIC sequences. *Mol Microbiol.* 1314-1315

SHARPLES, GJ. LLOYD. RG. 1990. A novel repeated DNA sequence located in the intergenic regions of bacterial chromosomes. *Nucleic Acids Res.* Nov 25; 18(22): 6503–6508.

SHEN, P, WEI Z, JIANG Y, DU X, JI S, YU Y. 2009. Novel genetic environment of the carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC-2 among *Enterobacteriaceae* in China. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 53(10):4333-8.

SHON, AS, BAJWA RPS, RUSSO TA. 2013. Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*: a new and dangerous breed. *Virulence* 4:107–118.

SILVA, PIAP, CARVALHO. JA. MOURA-COSTA. LF. DOMINGUEZ. GF. CARVALHO, MRB. ORGE, MD. VALE, VLC. 2014 Condições sanitárias e ambientais das águas de irrigação de hortas e de *Lactuca sativa* (alface) nas cidades de Catu e Alagoinhas – Bahia, Brasil. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas.*

SINGHAI, M. MALIK, A; SHAHID, M. MALIK, M. A. GOYAL, R. 2012. A study on device-related infections with special reference to biofilm production and antibiotic resistance. *Journal of global infectious diseases*, v. 4, n. 4, p. 193–8.

SIQUEIRA, FG. 2016. Avaliação da qualidade microbiológica da água em poços artesianos da comunidade rural Rajadinha Distrito Federal.

SIROT, D., C. RECULE, E. B. CHAIBI, L. BRET, J. CROIZE, C. CHANAL-CLARIS, R. LABIA, AND J. SIROT. 1997. A complex mutant of TEM-1 β -lactamase with mutations encountered in both IRT-4 and extended-spectrum TEM-15, produced by an *Escherichia coli* clinical isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41:1322–1325.

SOWMIYA, M. UMASHANKAR, V. MUTHUKUMARAN, S. MADHAVAN, HN. MALATHI, J. 2012. Studies on New Delhi Metallo-Beta-Lactamase-1 producing *Acinetobacter baumannii* isolated from donor swab in a tertiary eye care centre, India and structural analysis of its antibiotic binding interactions. *Bioinformation*, 8(10), 445.

SOARES, SF. 2013. Epidemiologia de estirpes produtoras de ESBL em ITU. 2013. Tese de Doutorado - Departamento de Química, Universidade de Aveiro, Portugal.

SOUNA, D., AMIR, A. S., BEKHOUCHA, S. N., BERRAZEG, M., DRISSI, M. 2014. Molecular typing and characterization of TEM, SHV, CTX-M, and CMY-2 β -lactamases in *Enterobacter cloacae* strains isolated in patients and their hospital environment in the west of Algeria. *Médecine et maladies infectieuses*, 44(4), 146-152.

STAHLHUT, SG.; STRUVE, C.; KROGFELT, KA; REISNER, A. 2012. Biofilm formation of *Klebsiella pneumoniae* on urethral catheters requires either type 1 or type 3 fimbriae. *FEMS immunology and medical microbiology*, v. 65, n. 2, p. 350–9.

STEPANOVIC, S. VUKOVIC, D. DAKIC, I. SAVIC, B. SVABIC-VLAHOVIC, MA 2000. Modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of microbiological methods*, v. 40, n. 2, p. 175–9.

STOREY, SP, BOGHOZIAN, R, LITTLE, JL, LOWMAN, DW e CHAKRABORTY, R 2006. Characterization of 'Schizokinen'; a dihydroxamate-type siderophore produced by *Rhizobium leguminosarum* IARI 917. *Biometals* 19: 637-649

STRATEVA, T, YORDANOV D. 2009. *Pseudomonas aeruginosa* - a phenomenon of bacterial resistance. *J Med Microbiol. Sep*; 58(Pt.9):1133- 48.

STREIT, JM, JONES, RN, SADER, HS, FRITSCH, TR. 2004. Assessment of pathogen occurrences and resistance profiles among infected patients in the intensive care unit: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (North America, 2001). *Int J Antimicrob Agents* 24: 111–118

STRUVE, C. BOJER, M. KROGFELT, KA. 2009. Identification of a conserved chromosomal region encoding *Klebsiella pneumoniae* type 1 and type 3 fimbriae and assessment of the role of fimbriae in pathogenicity. *Infection and Immunity*, v. 77, n. 11, p. 5016-5024.

SUBRAMANIAN, P.; SHANMUGAM, N.; SIVARAMAN, U.; KUMAR, S.; SELVARAJ, S. 2012. Antibiotic resistance pattern of biofilm-forming uropathogens isolated from catheterised patients in Pondicherry, India. *The Australasian medical journal*, v. 5, n. 7, p. 344–8.

SULLIVAN, BA. GENTRY, T. KARTHIKEYAN, R. 2013. Characterization of tetracycline-resistant bacteria in an urbanizing subtropical watershed. *Journal of applied microbiology*, 115(3), 774-785.

TALUKDAR, PK. RAHMAN. M. RAHMAN. M. NABI. A. ISLAM. I. HOQUE. M. HUBERT P. 2013. Antimicrobial Resistance, Virulence Factors and Genetic Diversity of *Escherichia coli* Isolates from Household Water Supply in Dhaka, Bangladesh.

TANAKA, K., IDO Y., AKITA, S., YOSHIDA, Y., YOSHIDA T. 1988. Development of Laser Ionization Time of Flight Mass Spectrometer IV — Generation of Quasi Molecular Ions from High Mass Organic Compound 35-kai Shitsuryo Bunseki Rengo Toronkai, Yoshishu, pp.22–23.

TANG, LM, CHEN, ST. 1994 *Klebsiella ozaenae* meningitis: report of two cases and review of the literature. *Infect*;22:58-61.

TELLO, A. AUSTIN, B. TELFER, T. 2012. Selective pressure of antibiotic pollution on bacteria of importance to public health. *Environmental Health Perspectives*, 120(8), 1100-1106.

TENOVER, FC., ARBEIT, RD., GOERING, RV., MICKELSEN, PA., MURRAY, BE., PERSING, DH., SWAMINATHAN, B. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *Journal of clinical microbiology*, 33(9), 2233.

THI, TD. LOPEZ, E. RODRIGUEZ-ROJAS, A., RODRIGUEZ-BELTRAN, J. COUCE, A. GUELFO, JR. CASTANEDA-GARCIA, A., BLAZQUEZ, J. 2011. Effect of *recA* inactivation on mutagenesis of *Escherichia coli* exposed to sublethal concentrations of antimicrobials. *J. Antimicrob. Chemother.* 66, 531–538.

TISSERA, S. LEE, SM. 2013. Isolation of Extended Spectrum β -lactamase (ESBL) Producing Bacteria from Urban Surface Waters in Malaysia.

TOLEMAN, MA. SIMM, AM., MURPHY, TA., GALES, AC., BIEDENBACH, DJ., JONES, RN. WALSH, TR. 2002. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo- β -lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 50(5), 673-679.

TOLLENTINO, F. M., POLOTTO, M., NOGUEIRA, M. L., LINCOPAN, N., NEVES, P., MAMIZUKA, E. M. NOGUEIRA, MC. 2011. High Prevalence of *bla* CTX-M Extended Spectrum Beta-Lactamase Genes in *Klebsiella pneumoniae* Isolates from a Tertiary Care Hospital: First report of *bla* SHV-12, *bla* SHV-31, *bla* SHV-38, and *bla* CTX-M-15 in Brazil. *Microbial Drug Resistance*, 17(1), 7-16.

TOKAJIAN, S, EISEN JA, JOSPIN G, FARRA A, COIL DA. 2015. Whole genome sequencing of extended-spectrum -lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from a patient in Lebanon. *Front Cell Infect Microbiol* 5:32.

TSAI, MH. CHU, SM. HSU, JF. 2014. Risk Factors and Outcomes for Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacteremia in the NICU. *Pediatrics*.

TRENTIN, DS. SILVA, DB. AMARAL, MW. 2013. Tannins possessing bacteriostatic effect impair *Pseudomonas aeruginosa* adhesion and biofilm formation. *PloS one*, v. 8, n. 6, p. e66257.

TRIPATHY, RS. SEN SK. PADHI S. MOHANTY. NK. 2014. Upregulation of transcripts for metabolism in diverse environments is a shared response associated with survival and adaptation of *Klebsiella pneumoniae* in response to temperature extremes. *Maiti Springer-Verlag Berlin Heidelberg*, Pag. 591-604 .

VALASEK, MA, REPA JJ. 2005 The power of real-time PCR. *Adv Physiol Educ*. 200529:151-9.

VELÁZQUEZ, E., MENÉNDEZ, E., JUANES, FS., DAZA, N. V., YÉPEZ, JP., BARRIOS, ML., BUITRAGO, JMG. 2016. Identification of Human Pathogenic Bacteria in Plant Roots by Using MALDI-TOF MS Methodology. In *Biological Nitrogen Fixation and Beneficial Plant-Microbe Interaction* (pp. 3-12). Springer, Cham.

VERSALOVIC, J, KOEUTH T, LELUPSBI JR.1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res* 19: 6823–6831.

VERSALOVIC J, SCHNEIDER M, De BRUIJN FJ, LUPSKI JR. 1994. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in molecular and cellular biology*. ;5(1):25–40.

VILELA, MA. 2009. Caracterização molecular de isolados bacterianos apresentando mecanismos de resistência a antimicrobianos que atuam na parede celular. Universidade Federal do Pernambuco. Tese de Doutorado. Recife, Pernambuco. Brasil.

VILLEGAS, MV. KATTAN, JN., QUINTEROS, MG., CASELLAS, JM. 2008. Prevalence of extended-spectrum β -lactamases in South America. *Clinical Microbiology and Infection*, 14(s1), 154-158.

WALSH, TR. STUNT, RA. NABI, JA.; MACGOWAN, AP.; BENNETT, PM. 2011. Distribution and expression of beta-lactamase genes among *Aeromonas* spp. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 40, n. 2, p. 171-178.

WARREN, RE. HARVEY, G. CARR, R. WARD, D. DOROSHENKO, A. 2008. Control of infections due to extended-spectrum β -lactamase-producing organisms in hospitals and the community. *Clinical Microbiology and Infection*, 14(s1), 124-133.

WELLINGTON, EM, BOXALL, AB, CROSS, P, FEIL, EJ, GAZE, WH, HAWKEY, PM, JOHNSON-ROLLINGS, AS. 2013. The role of the natural environment in the emergence of antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Lancet Infectious Disease*. 13(2):155-165

WILSON, LA. SHARP, PM. 2006. Enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) sequences in *Escherichia coli*: Evolution and implications for ERIC-PCR. *Mol Biol Evol*. Jun; 23(6): 1156–1168.

WITKOWSKA, D. MIESZAŁA, M. GAMIAN, A. 2005. Major structural proteins of type 1 and type 3 *Klebsiella* fimbriae are effective protein carriers and immunogens in conjugates as revealed from their immunochemical characterization. *FEMS immunology and medical microbiology*, v. 45, n. 2, p. 221–30.

WU, CC. HUANG, YJ. FUNG, CP. PENG, HL. 2010. Regulation of the *Klebsiella pneumoniae* *Kpc* fimbriae by the site-specific recombinase *Kpcl*. *Microbiology*, v. 156, n. 7, p. 1983-1992.

XI, C., Y. ZHANG, C. F. MARRS, W. YE, C. SIMON, B. FOXMAN, AND J. NRIAGU. 2009. Prevalence of antibiotic resistance in drinking water treatment and distribution systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:5714–5718.

YANG, H, CHEN, H, YANG, Q, CHEN, M, WANG, H. 2008. High Prevalence of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Genes *qnr* and *aac(6′)-Ib-cr* in Clinical Isolates of *Enterobacteriaceae* from Nine Teaching Hospitals in China. *Antimicrob Agents chemother*; 52: 4268-73.

YAO, X., DOI, Y., ZENG, L., LV, L. LIU, JH. 2016. Carbapenem-resistant and colistin-resistant *Escherichia coli* co-producing NDM-9 and *mcr-1*. *The Lancet infectious diseases*, 16(3), 288-289.

YIGIT, H., QUEENAN, AM., ANDERSON, GJ., DOMENECH-SANCHEZ, A., BIDDLE, JW., STEWARD, CD. TENOVER, FC. 2001. Novel carbapenem-hydrolyzing β -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 45(4), 1151-1161.

YONG, D.; TOLEMAN, MA.; GISKE, CG.; CHO, HS.; SUNDMAN, K.; LEE, K.; WALSH, TR. 2009. Characterization of a new metallo- β -lactamase gene, *bla*NDM-1, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in

Klebsiella pneumoniae sequence type 14 from India. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 53, n. 12, p. 5046-5054.

ZAMPARETTE, CB. 2014. Determinação fenotípica e genotípica de beta-lactamases de espectro estendido em *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *enterobacter spp.* de pacientes internados no Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago (HU/UFSC).

ZÁRATE, MS, GALES AC, PICÃO RC, PUJOL GS, LANZA A, SMAYEVSKY J. 2008. Outbreak of OXY-2-producing *Klebsiella oxytoca* in a renal transplant unit. *J Clin Microbiol.*46:2099–101 10.1128/JCM.00194-08.

ZHANG, XX, ZHANG T & FANG HH 2009 Antibiotic resistance genes in water environment. *Appl Microbiol Biotechnol* 82: 397–414.

ZIECH, RE. 2015. Caracterização de *Salmonella* sp. Isolada de Indústrias de Aves Baseada na Formação de Biofilmes, Tolerância a Sanitizantes e Resistência a Antimicrobianos. Dissertação de mestrado Universidade Federal do Paraná, Brasil.

ZUANAZZI, PT. BARTELS, M. 2016. Estimativas para a população flutuante do Litoral Norte do RS. Porto Alegre: FEE.

ZURFLUH, K. POIREL, L. NORDMANN, P. KLUMPP, J. STEPHAN, R. 2015. First detection of *Klebsiella variicola* producing OXA-181 carbapenemase in fresh vegetable imported from Asia to Switzerland. *Antimicrobial resistance and infection control*, 4(1), 38.

9. ANEXOS

9.1 Antimicrobianos

Ampicilina
Amoxicilina
Ceftazidima
Cefotaxima
Cefepima
Cefoxitina
Aztreonam
Imipinem
Ertapenem
Ciprofloxacino
Norfloxacino
Gentamicina
Amicacina
Espectinomicina
Tetraciclina
Cotrimoxazol
Cloranfenicol
Polimixina B
Tazobactam
Ácido clavulânico

9.2 Meios de Cultura

Ágar Conservação

Extrato de levedura – 3g
Peptona – 10g
NaCl – 8g
Fosfato de sódio bibásico – 2g
Ágar – 15g
Água destilada– 1L

Ágar MacConkey

Digestão pancreática de gelatina – 17g

Peptona – 3g

Lactose – 10g

Sais biliares – 1,5g

Cloreto de sódio – 5g

Vermelho Neutro:0,03g

Cristal violeta – 0,001g

Ágar – 15g

Água destilada – 1L

Ágar marinho

Peptona de carne – 5g

Extrato de levedura – 1g

Citrato de ferro – 0,1g

Cloreto de sódio – 19,45g

Sulfato de sódio – 3,24g

Bicarbonato de sódio – 0,16g

Silicato de sódio – 0,004g

Fluoreto de sódio – 0,0024g

Fosfato dissódico – 0,008g

Cloreto de cálcio – 1,8g

Cloreto de magnésio – 8,8g

Cloreto de potássio – 0,55g

Brometo de potássio – 0,08g

Cloreto de estrôncio – 0,03g

Nitrato de amônio – 0,0016g

Ácido bórico – 0,02g

Ágar – 15g

Água destilada – 1L

Ágar Muller-Hinton

Extrato de carne – 2g
Ácidos casamínos – 17,5g
Amido – 1,5g
Ágar – 17g
Água destilada – 1L

Ágar TSA

Hidrolisado enzimático de caseína – 15g
Peptona de soja – 5g
Cloreto de sódio – 5g
Ágar – 15g
Água destilada – 1000 ml

Ágar Les-Endo

Tecido animal digerido por enzimas peptídicas - 10g
Lactose – 10g
Fosfato dipotássico – 3,5g
Sulfito de sódio – 2,5g
Fucsina básica – 0,5g
Ágar-ágar – 15g
Água destilado 1000mL
Suspende 41,5g em 1000mL de água destilada e autoclavar por 15 minutos a 121°C com pH final a 7,5.

Ágar eosina azul de metileno

Tecido animal digerido por enzimas peptídicas - 10g
Fosfato dipotássico – 2,0g
Lactose – 5,0g
Sacarose – 5,0g
Eosina-y - 0,4g
Azul de metileno – 0,065g

Ágar-ágar- 13,5g

Suspender 36,5g em 1000mL de água destilada e autoclavar por 15 minutos a 121C° com pH final a 7,2.

Ágar CFA

Casaminoácido – 10g

Extrato de levedura – 1,5g

MgSO₄ – 0,05g

MnCl₂ – 0,005g

Ágar bacteriológico – 20g

Água destilada – 1000mL

Autoclavar por 15 minutos a 121C° com pH final a 7,4.

Meio mínimo M9 15x

Na₂HPO₄ – 6,0g

KH₂PO₄ – 3,0g

NaCl – 0,5g

NH₄Cl – 1,0g

Acertar pH para 7,4 e autoclavar por 15 minutos a 121C°. Após esterilização adicionar casaminoácido 0,5%, glicose 0,2%, triptofano 20mg/mL e tiamina 5mg/ML.

Caldo BHI

Infusão de cérebro de vitelo – 200g

Infusão de coração bovino – 250g

Peptona proteose – 10g

Dextrose – 2,0g

Cloreto de sódio – 5,0g

Fosfato dissódico – 2,5g

Água destilada – 1000mL

Suspender 37g de pó em 1000mL de água destilada e autoclavar por 15 minutos a 121C° com pH final a 7,4.

Caldo TSB

Peptona de caseína – 17g
Peptona de soja – 3,0g
Dextrose – 2,5g
Cloreto de sódio – 5,0g
Fosfato bibásico de potássio – 2,5g
Água destilada – 1000mL

Meio MIO (motilidade, indol ornitina)

Dextrose – 1,0g
Extrato de levedura – 3,0g
Peptona – 10g
Tripeteína – 10g
Cloridrato de L-ornitina – 5,0g
Ágar – 2,0g
Púrpura de bromocresol – 0,02g
Suspender 31g de pó em 1000mL de água destilada e autoclavar por 15 minutos a 121C°.

Ágar Lisina Ferro (LIA)

Digestão peptídica de tecido animal – 5,0g
Extrato de levedura – 3,0g
Dextrose – 1,0g
L-lisina – 10g
Citrato férrico de amônio – 0,5g
Tiosulfato de sódio – 0,04g
Púrpura de bromocresol – 0,02g
Ágar – 15g

9.3 Soluções

Hidróxido de potássio

Hidróxido de potássio – 3g

Água destilada – 100 mL

Catalase

Peróxido de hidrogênio – 3g

Água – 100mL

Tampão TE

Tris-HCl 1M pH 8,0 – 1mL [10mM]

EDTA 0,5M pH 8,0 – 2mL [1mM]

Água destilada q.s.p. – 100mL

Gel de agarose a 2%

Agarose – 2,0g

Tampão TBE – 100mL

Gel de agarose a 1,5%

Agarose – 1,5g

Tampão TAE – 100mL

Tampão TBE 5x

Tris-base – 54g

Ácido bórico – 27,5g

EDTA 0,5M pH 8,0 – 20mL

Água destilada – 1000mL

Tampão TBE 0,5x

Tampão TBE 5X – 100mL

Água destilada- 900mL

Tampão TAE 50X

Tris-Base – 242g

Ácido acético glacial- 57,1mL

EDTA 0,5M pH 8,0 – 100mL
Água destilada – 1000mL

Tampão TAE 1X

Tampão TAE 50x – 20mL
Água destilada – 980ml

Tabela 14: Características físicas e químicas de quatro pontos de amostragem da Laguna Tramandaí no inverno (agosto de 2014) e no verão (janeiro de 2015).

	Ponto1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4	Media ± SD	Amplitude
Temperatura						
<i>Inverno</i>	15,7	16,2	15,5	17,2	16,15 ± 0,66	1,1
<i>Verão</i>	24,8	26,5	24,6	25,1	25,25 ± 0,74	1,07
Salinidade						
<i>Inverno</i>	9,22	0,1	10,05	12,11	7,87 ± 4,6	121,1
<i>Verão</i>	64,98	31,42	22,36	11,97	32,68 ± 19,87	5,42
Oxigênio (O₂)						
<i>Inverno</i>	10,32	9,16	9,99	10,44	9,97 ± 0,5	1,13
<i>Verão</i>	7,9	7,5	7,3	7,1	7,45 ± 0,29	1,11
Fósforo total (P)						
<i>Inverno</i>	0,08	0,12	0,06	0,06	0,08 ± 0,02	2
<i>Verão</i>	0,08	0,07	0,07	0,06	0,07 ± 0,01	1,33
Nitrogênio total (N)						
<i>Inverno</i>	5,3	3,99	1,37	1,44	3,02 ± 1,68	3,86
<i>Verão</i>	2,08	9,63	2,6	2,08	4,09 ± 3,2	4,62
Nitrato (NO₂)						
<i>Inverno</i>	ND	1,02	ND	ND	1,02	34*
<i>Verão</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Nitrito (NO₃)						
<i>Inverno</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Verão</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Nitrogênio amoniacal (NH₄)						
<i>Inverno</i>	4,3	3,7	0,07	0,16	2,05 ± 1,95	61,42
<i>Verão</i>	0,78	2,34	2,21	1,56	1,72 ± 0,62	3
Sólidos totais						
<i>Inverno</i>	5018	122	5548	6319	4251,75 ± 2428,8	51,8
<i>Verão</i>	37,99	17,69	13,03	6,98	18,92 ± 11,64	5,44