

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**ÍNDICE DE RESISTÊNCIA MÚLTIPLA AOS ANTIMICROBIANOS E
DETECÇÃO DE GENES ASSOCIADOS À PRODUÇÃO DE
CARBAPENEMASES EM *Klebsiella pneumoniae* ISOLADAS DE
DIFERENTES AFECÇÕES EM CÃES E GATOS**

CAROLINA LECHINSKI DE PAULA

Botucatu - SP
2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**ÍNDICE DE RESISTÊNCIA MÚLTIPLA AOS ANTIMICROBIANOS E
DETECÇÃO DE GENES ASSOCIADOS À PRODUÇÃO DE
CARBAPENEMASES EM *Klebsiella pneumoniae* ISOLADAS DE
DIFERENTES AFECÇÕES EM CÃES E GATOS**

CAROLINA LECHINSKI DE PAULA

Tese apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Campus de Botucatu, SP, para obtenção do título de doutor.

Orientador: Prof. Associado Márcio Garcia Ribeiro

Área de concentração: Saúde Animal, Saúde Pública Veterinária e Segurança Alimentar

Botucatu- SP
2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Paula, Carolina Lechinski de.

Índice de resistência múltipla aos antimicrobianos e detecção de genes associados à produção de carbapenemases em *Klebsiella pneumoniae* isoladas de diferentes afecções em cães e gatos / Carolina Lechinski de Paula. - Botucatu, 2019

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Márcio Garcia Ribeiro

Capes: 50502034

1. Animais de estimação. 2. Anti-infecciosos.
3. *Klebsiella pneumoniae*. 4. Carbapenêmicos.

Palavras-chave: Animais de companhia; Carbapenêmicos; *K. pneumoniae*.

Nome do autor: Carolina Lechinski de Paula

Título: ÍNDICE DE RESISTÊNCIA MÚLTIPLA AOS ANTIMICROBIANOS E
DETECÇÃO DE GENES ASSOCIADOS À PRODUÇÃO DE
CARBAPENEMASES EM *Klebsiella pneumoniae* ISOLADAS DE DIFERENTES
AFECÇÕES EM CÃES E GATOS

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Associado Márcio Garcia Ribeiro

Presidente e Orientador

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia (FMVZ) – UNESP/Botucatu, SP

Prof. Associado Antonio Carlos Paes

Membro

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, FMVZ -
UNESP/Botucatu, SP

Prof^a. Ass. Dr^a. Maria Lucia Gomes Lourenço

Membro

Departamento de Clínica Veterinária, FMVZ- UNESP/Botucatu, SP

Prof. Doutor Rogerio Giuffrida

Membro

Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, SP

Prof^a. Dr^a. Selene Daniela Babboni

Membro

Universidade Paulista – UNIP, Campus Dutra, São José dos Campos, SP

Data da defesa: 28/06/2019

*“Trago dentro do meu coração,
Como num cofre que se não pode fechar de cheio,
Todos os lugares onde estive,
Todos os portos a que cheguei,
Todas as paisagens que vi através de janelas ou vigias,
Ou de tombadilhos, sonhando,
E tudo isso, que é tanto, é pouco para o que eu quero...”*

Álvaro de Campos (Fernando Pessoa)

Dedicatória

Às pessoas mais importantes da minha vida, meus amados pais, Suefy e José, pelo amor incondicional e por todo incentivo na realização de meus objetivos. Meus pilares de fé, força, amor, amparo e sabedoria.

Agradecimento especial

Ao meu orientador, professor Márcio Garcia Ribeiro, por toda dedicação, auxílio e ensinamentos ao longo de sete anos de orientação. Eterna gratidão pela confiança e pela oportunidade de aprimoramento pessoal e profissional

Agradecimentos

A Deus por me abençoar com a dádiva da vida a cada dia e permitir que eu siga com força e determinação.

À minha avó, Carolina (in memoriam) sempre presente no meu coração e em minhas orações. Tenho certeza que sua força e luz orientam minha trajetória.

Ao meu irmão, Fernando e futura cunhada, Letícia, pelo amor e apoio em todas as horas.

Ao Fernando José Paganini Listoni, pelo cuidado dedicado a mim, por toda orientação e ensinamentos essenciais que foram a base para a realização desta e de tantas pesquisas. Grata pela amizade, conselhos e toda confiança em meu potencial.

À amiga Noelle, minha irmã de coração, por todo amor, carinho e amizade.

Ao querido professor, Antonio Carlos Paes por todo carinho, amizade e contribuição em minha formação. Agradeço às longas conversas bem-humoradas e por alimentar minha paixão pela leitura.

Aos pós-graduandos e amigos André Mota, Fábio Portilho, Rafaela Riseti, Marília Caxito, Simony Guerra e Mariana Carvalho por compartilharem comigo uma rotina intensa no laboratório, por todo apoio e pelas horas de cafés e risadas.

Ao professor Domingos, pós-graduanda Taila e demais colegas da UNICAMP que contribuíram de forma valiosa para o desenvolvimento desta pesquisa.

Aos meus amigos aventureiros, Leila, Márcio, Zé Basseto e seu Nica por todas as caminhadas e momentos de muita alegria.

À minha hermana, Carmen Bolaños que, mesmo longe, sempre me auxilia e incentiva. Saudades todos os dias!

À querida amiga, Adriana Pavan, pela alegria que contagia nosso departamento todos os dias. Obrigada pelas horas de conversas e risadas!

À querida Cris por manter sempre tudo organizado e pelos “cafezins” diários

Aos funcionários, Roberto, Pardaí, Nelson e Marquinhos por toda ajuda e amizade.

A todos os professores, residentes, funcionários e pós-graduandos do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública por todos os anos de convívio diário.

Aos meus amigos queridos Daniela (Munds), Aline (Pink), Joyce (Bigols), Dália e Juliano (Xulis) pela amizade e por torcerem sempre pelo meu progresso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro a esta pesquisa.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Sequência de iniciadores utilizados nas reações de PCR para identificação de genes associados à produção de carbapenemases em <i>K. pneumoniae</i> isoladas de diferentes afecções de cães e gatos. Botucatu, SP, 2017 – 2018.....	31
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Antimicrobianos utilizados no teste “in vitro” de sensibilidade microbiana – método de difusão com discos – e interpretação dos halos de inibição em <i>K. pneumoniae</i> isoladas de diferentes afecções em cães e gatos. Botucatu, SP, 2017 - 2018.....	28
Tabela 2. Ocorrência de diferentes afecções clínicas causadas por <i>K. pneumoniae</i> em cães e gatos. Botucatu, SP, 2017 – 2018.....	34
Tabela 3. Perfil de sensibilidade microbiana “in vitro”, no teste de difusão com discos, em 65 isolados de <i>Klebsiella pneumoniae</i> obtidos de diferentes afecções em cães e gatos. Botucatu, SP, 2017 – 2018.....	36
Tabela 4. Índice de resistência múltipla aos antimicrobianos em 65 <i>K. pneumoniae</i> isoladas em cães e gatos. Botucatu, SP, 2017 - 2018.....	37
Tabela 5. Perfis de resistência aos antimicrobianos em 65 linhagens de <i>Klebsiella pneumoniae</i> isoladas de diferentes afecções em cães e gatos. Botucatu, SP, 2017 - 2018.....	38
Tabela 6. Estimativas do coeficiente de concordância Kappa entre resultados de sensibilidade de <i>K. pneumoniae</i> frente a carbapenêmicos e presença dos genes <i>bla_{NDM}</i> e <i>bla_{OXA-48}</i>	41

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária Animal
AMI	Amicacina
AMC	Amoxicilina/ácido clavulânico
Ass.	Assistente
AZT	Azitromicina
<i>bla_{KPC}</i>	Gene codificador da enzima KPC
<i>bla_{NDM}</i>	Gene codificador da enzima NDM
<i>bla_{OXA}</i>	Gene codificador da enzima OXA
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i> (caldo infusão cérebro e coração)
CDC	<i>Centers for Diseases Control</i>
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CFT	Ceftiofur
CFX	Ceftriaxona
CIM	Concentração inibitória mínima
CIP	Ciprofloxacino
CLSI	<i>Clinical Laboratory Standard Institute</i>
DHVSP	Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública
DNA	Ácido desoxirribonucleico
Dr.	Doutor
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EPM	Escola Paulista de Medicina
ENR	Enrofloxacino
ERT	Ertapenem
ESBL	Beta-lactamase de espectro estendido
et al.	Colaboradores
EUA	Estados Unidos da América
FLO	Florfenicol
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
GEN	Gentamicina
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IMP	Imipenem
IRMA	Índice de Resistência Múltipla aos Antimicrobianos
ITU	Infecção do trato urinário
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> produtora de carbapenemases
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>K. oxytoca</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>
LEV	Levofloxacino
LPS	Lipopolissacarídeos
MAR	Marbofloxacino

MDR	Multidroga resistente
MER	Meropenem
Mili	Motilidade, lisina e indol
NEO	Neomicina
NDM	New Delhi Metallo-beta-lactamase
NOR	Norfloxacino
OXA	Oxacilinase
OXT	Oxitetraciclina
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PBPs	Proteínas ligadoras de penicilinas
PCR	Reação em cadeia pela polimerase
Prof.	Professor
PS	Parcialmente sensível
RIF	Rifampicina
SP	São Paulo
spp.	Espécies
SUT	Sulfazotrim
UNESP	Universidade Estadual Paulista
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
WHO	World Health Organization
VIM	Verona imipenemase

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	graus Celsius
β	Beta
dNTP	dexosinucleotídeo trifosfato
h	Horas
$\geq$	Maior ou igual
$>$	Maior
$\leq$	Menor ou igual
$<$	Menor
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
mL	Mililitros
mM	Milimolar
mm	Milímetros
min	Minutos
mV	Milivolts
μ g	Microgramas
μ L	Microlitros
n ^o ou N	Número
pb	Pares de base
%	Porcentagem
+	Positivo
pH	Potencial hidrogeniônico
®	Marca registrada
s	Segundos
Tris-HCL	Hidrocloreto de trisaminometano
U	Unidade
KCl	Cloreto de potássio

SUMÁRIO

RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	2
1. INTRODUÇÃO	3
2. REVISÃO DE LITERATURA	7
2.1 <i>Klebsiella pneumoniae</i> : taxonomia e propriedades gerais.....	7
2.2 Infecções em animais domésticos.....	9
2.2.1 Infecções em cães e gatos	9
2.3 Infecções em humanos	11
2.4 Resistência aos antimicrobianos	13
2.4.1 Alteração da permeabilidade de membrana.....	14
2.4.2 Bombas de efluxo.....	15
2.4.3 Alterações do sítio alvo do antimicrobiano	15
2.4.4 Ação enzimática	16
2.5 <i>Klebsiella pneumoniae</i> multirresistentes e produtoras de carbapenemases.....	17
2.6 Índice de Resistência Múltipla aos Antimicrobianos	22
3. HIPÓTESES DE ESTUDO	24
4. OBJETIVOS.....	25
4.1 Geral	25
4.2 Específicos.....	25
5. MATERIAL E MÉTODOS	26
5.1 Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)	26
5.2 Isolamento e identificação de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	26
5.3 Testes de sensibilidade microbiana “in vitro”	27
5.3.1 Método de difusão com discos	27
5.3.2 Índice de resistência múltipla aos antimicrobianos (IRMA).....	29
5.3.3 Perfis de resistência aos antimicrobianos	29
5.4 Detecção molecular dos genes associados à produção de carbapenemases.....	29
5.4.1 Controles da reação	29
5.4.2 Obtenção do material genético.....	29
5.4.3 Amplificação do material genético.....	30
5.4.4 Eletroforese em gel de agarose	31
5.5 Cálculo amostral e análise estatística.....	32
6. RESULTADOS	33

6.1 Isolamento de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	33
6.2 Perfil de sensibilidade microbiana e IRMA.....	35
6.3 Identificação fenotípica de <i>K. pneumoniae</i> produtora de carbapenemases.....	38
6.4 Perfil de resistência aos antimicrobianos	38
6.5 Genes associados à produção de carbapenemases.....	40
6.6 Análise Estatística.....	40
7. DISCUSSÃO.....	42
8. CONCLUSÕES	48
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
10. TRABALHO CIENTÍFICO	67
ANEXOS.....	78
ANEXO 1	78

DE PAULA, C.L. **Índice de resistência múltipla aos antimicrobianos e detecção de genes associados à produção de carbapenemases em *Klebsiella pneumoniae* isoladas de diferentes afecções em cães e gatos.** Botucatu, SP, 2019. 83p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

RESUMO

A população de cães e gatos tem aumentado em todo o mundo e o contato próximo entre os tutores e seus animais pode favorecer a transmissão de patógenos de animais de estimação para humanos. *Klebsiella pneumoniae* são bactérias ubíquas, de comportamento oportunista, relacionadas a várias manifestações clínicas em animais de companhia e infecções nosocomiais em humanos. O micro-organismo comumente é resistente aos antimicrobianos, incluindo aos fármacos carbapenêmicos. O aumento de infecções causadas por bactérias resistentes, por exemplo, como *K. pneumoniae* produtora de carbapenemases é considerado problema emergente de Saúde Pública. O presente estudo investigou o índice de resistência múltipla aos antimicrobianos utilizando 19 antimicrobianos pertencentes a dez grupos de fármacos, bem como a presença de *K. pneumoniae* produtora de carbapenemase no teste “in vitro” de difusão com discos usando ertapenem, imipenem e meropenem em 65 linhagens de *K. pneumoniae* isoladas de afecções de cães e gatos. Todos os isolados foram submetidos a PCR para a detecção dos genes *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}* e *bla_{OXA-48}* (associados com a produção de carbapenemases). Nos cães, cistite (n=26/58; 44,8%) e enterite (n=14/58; 24,1%) foram os sinais clínicos mais comuns; enquanto em gatos, a otite (n=3/7; 42,8%) foi o distúrbio mais frequente. Os isolados apresentaram sensibilidade $\geq 50\%$ no teste de difusão com discos para ertapenem (67,7%), florfenicol (61,5%), levofloxacino (56,9%) e sulfametoxazol / trimetoprim (50,8%). Em contraste, a maior resistência dos isolados foi observada para rifampicina (100%), azitromicina (92,3%), ceftiofur (56,9%), ceftriaxona (53,8%) e enrofloxacin (50,8%), com grande variedade de perfis de resistência. Os resultados de isolados parcialmente sensíveis e resistentes à identificação fenotípica de *K. pneumoniae* produtora de carbapenemase revelaram: 29,2% (19/65) e 3,1% (2/65) para ertapenem; 60% (39/65) e 18,5% (12/65) para imipenem; e 47,7% (31/65) e 10,8% (7/65) para meropenem, respectivamente. O IRMA ($\geq 0,3$) foi observado em 81,5% (53/65) dos isolados. A PCR detectou 4,6% (3/65) isolados carregando *bla_{NDM}* e 7,7% (5/65) isolados com *bla_{OXA-48}*. Poucos estudos, em todo o mundo, têm investigado genes associados à produção de carbapenemases em *K. pneumoniae* isoladas de animais de companhia. A multirresistência de *K. pneumoniae* em cães e gatos reforça a preocupação mundial em relação a necessidade do uso racional de antimicrobianos no tratamento de doenças bacterianas em animais de companhia. Na literatura consultada, o presente estudo descreve, pela primeira vez, a detecção do gene *bla_{NDM}* em *K. pneumoniae* em cães doentes. Os resultados indicam que os cães podem carrear genes de *K. pneumoniae* multirresistentes aos antimicrobianos e também servir como reservatório de isolados produtores de carbapenemase para os humanos.

Palavras-chave: *K. pneumoniae*, multirresistência aos antimicrobianos, grupo dos carbapenêmicos, animais de companhia

DE PAULA, C.L. **Multiple antibiotic resistance index and identification of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from diseased dogs and cats.** Botucatu, SP, 2019. 83p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

ABSTRACT

The population of dogs and cats has raised globally and close contact of owners and their animals may favor transmission of pathogens from pets-to-humans. *Klebsiella pneumoniae* are ubiquitous bacteria, opportunistic in nature, related to various clinical disorders in companion animals and nosocomial infections in humans. This pathogen is usually resistant to conventional antimicrobials, including from carbapenemases group. The increase of infections caused by resistant bacteria, e.g., carbapenemase-producing *K. pneumoniae*, is an emergent public health issue worldwide. The present study investigated phenotypically the multiple antibiotic resistance (MAR) index to 19 antimicrobials belong to 10 groups of drugs, and carbapenemase-producing *K. pneumoniae* in the *in vitro* disk diffusion test using ertapenem, imipenem, and meropenem among 65 *K. pneumoniae* diseased dogs and cats. In addition, all isolates were subjected to PCR to the detection of the genes *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}* and *bla_{OXA-48}* (associated with the production of carbapenemases). In dogs, cystitis (n=26/58; 44.8%) and enteritis (n=14/58; 24.1%) were the most common clinical signs; whereas in cats, otitis (n=3/7; 60%) was the most frequent disorder. The isolates showed sensitivity $\geq 50\%$ in the disk diffusion test for ertapenem (67.7%), florfenicol (61.5%), levofloxacin (56.9%), and sulfamethoxazole/trimethoprim (50.8%). In contrast, the highest resistance of the isolates was observed for rifampicin (100%), azithromycin (92.3%), ceftiofur (56.9%), ceftriaxone (53.8%), and enrofloxacin (50.8%) with a great variety of resistance profiles. The results of partially sensitive and resistant isolates to phenotypic identification of carbapenemase-producing *K. pneumoniae* revealed: 29.2% (19/65) and 3.1% (2/65) to ertapenem; 60% (39/65) and 18.5% (12/65) to imipenem; and 47.7% (31/65) and 10.8% (7/65) to meropenem, respectively. The MAR index (≥ 0.3) was observed in 81.5% (53/65) strains. PCR detected 4.6% (3/65) of isolates harboring *bla_{NDM}* and 7.7 (5/65) isolates *bla_{OXA-48}*. Few comprehensive studies worldwide have investigated the genes associated with carbapenemase-producing *K. pneumoniae* isolated from companion animals. The multidrug resistance of *K. pneumoniae* isolated from dogs and cats sampled highlights the global concern regarding the rational use of antimicrobials in the treatments of bacterial diseases in companion animals. To our knowledge, the present study for the first time describes the detection of the gene *bla_{NDM}* in *K. pneumoniae* from diseased dogs. Overall, our results indicate that dogs may harbor multidrug-resistant *K. pneumoniae* genes and may be a reservoir of carbapenemase-producing isolates to humans.

Key-words: *K. pneumoniae*, multidrug resistance, carbapenems, companion animals

1. INTRODUÇÃO

Klebsiella pneumoniae são bactérias oportunistas responsáveis por grande variedade de infecções graves em humanos e animais (DONATI et al., 2014; LERY et al., 2014; DAVIS; PRICE, 2016). É encontrada na microbiota intestinal de animais e humanos, no ambiente ou contaminando utensílios, principalmente de uso hospitalar (WHO, 2014). É reconhecido mundialmente como problema emergente em Saúde Pública, principalmente pelo crescente número de infecções por *K. pneumoniae* e multirresistência aos antimicrobianos convencionais (PACZOSA; MECSAS, 2016).

Em humanos, *K. pneumoniae* representa um dos patógenos bacterianos mais envolvidos em infecções nosocomiais, particularmente no trato urinário, pulmões, feridas e sepse (HAZEN et al., 2014; CHUNG THE et al., 2015; HOU et al., 2015). As infecções apresentam risco para pessoas com maior vulnerabilidade, como indivíduos hospitalizados por longos períodos, pacientes com doenças crônicas (diabetes, alcoolismo), imunossuprimidos, idosos e neonatos (WHO, 2014). Além disso, é considerado agente re-emergente em infecções não hospitalares, principalmente como causa de pneumonia e abscessos em órgãos (LERY et al., 2014).

O patógeno está associado com diferentes infecções oportunistas nos animais domésticos (QUINN et al., 2011; KOENIG, 2012; MOXLEY, 2013). Em bovinos, o agente é causa comum de mastite clínica (SCHKKEN et al., 2012; TIMOFTE et al., 2014; CONSTABLE et al., 2017) e pneumonia (CONSTABLE et al., 2017). Nos equinos, são descritos casos de pneumonia, endometrite e abortamentos (CONSTABLE et al., 2017). Em cães e gatos, o micro-organismo causa afecções do trato gastrintestinal e geniturinário, por vezes com desenvolvimento de septicemia. Nessas espécies, assim como em humanos, a bactéria está relacionada comumente a infecções de origem hospitalar, como contaminação de cateteres e sondas (KOENIG, 2012).

A emergência de infecções causadas por bactérias multidroga resistentes representa grave problema em Saúde Pública e em animais domésticos (MATEU; MARTIN, 2001; ROBILOTTI; DERESINSKI, 2014; HARADA et al., 2016), principalmente devido às altas taxas de morbimortalidade (CHANG et al., 2015). A multirresistência bacteriana aos fármacos é especialmente observada

entre os patógenos pertencentes à família Enterobacteriaceae (*Escherichia coli*, *Klebsiella* sp., *Salmonella* sp., *Proteus* sp.) bem como outros micro-organismos gram-negativos não fermentadores da glicose (*Pseudomonas aeruginosa*) (YONG et al., 2009; POTTER; D'SOUZA; DANTAS, 2016; SWATHI et al., 2016).

Há cerca de duas décadas, os antimicrobianos do grupo dos carbapenêmicos eram considerados de eleição no tratamento de infecções em humanos causadas por patógenos gram-negativos multirresistentes (HAMZA, 2016) e a presença de bactérias produtoras de carbapenemases era rara (TÄNGDÉN; GISKE, 2015). *K. pneumoniae* é usualmente resistente aos antimicrobianos convencionais, reconhecida por carrear e disseminar genes de resistência aos fármacos entre outras bactérias gram-negativas (CHUNG THE et al., 2015), incluindo genes que codificam carbapenemases (ROBILOTTI; DERESINSKI, 2014). Desde 2013, o *Centers for Disease Control*, nos EUA, considera que enterobactérias produtoras de carbapenemases são uma das três principais preocupações emergentes em Saúde Pública. Essas linhagens possuem crescente disseminação global, multirresistência aos antimicrobianos convencionais e causam infecções com altas taxas de mortalidade em humanos (ROBILOTTI; DERESINSKI, 2014; POTTER; D'SOUZA; DANTAS, 2016).

As carbapenemases são um grupo diverso de enzimas capazes de hidrolisar os antimicrobianos β -lactâmicos (TÄNGDÉN; GISKE, 2015; PULSS et al., 2018). Apesar da produção de carbapenemases ser clinicamente relevante em surtos por *E. coli* e *P. aeruginosa*, os genes que codificam tais enzimas parecem predominar em linhagens de *K. pneumoniae*, tornando primordiais estudos com a multirresistência desse patógeno (TZOUVELEKIS et al., 2012). Ainda, *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemases são resistentes à outras classes de antimicrobianos, incluindo tetraciclinas, aminoglicosídeos e fluorquinolonas (ROBILOTTI; DERESINSKI, 2014). Tal fato decorre da coaquisição de genes de resistência não- β -lactâmicos localizados nos mesmos plasmídios que carregam os genes responsáveis pela produção das carbapenemases (TÄNGDÉN; GISKE, 2015). Devido às dificuldades de tratamento de infecções em humanos por *K. pneumoniae* multirresistentes, aliada às altas taxas de mortalidade nessa espécie, o patógeno ficou popularmente conhecido como “superbactéria” (DONG et al., 2018).

O primeiro relato de identificação de *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemases (gene *bla_{KPC}*) ocorreu em 1996, nos EUA (YIGIT et al., 2001). Na atualidade, as carbapenemases epidemiologicamente mais importantes pertencem à classe A (KPC - 17 variantes), classe B (metallo- β -lactamases) e classe D (oxacilinases – gene *bla_{OXA}*). Em 2009, foi relatada carbapenemase NDM-1 (Nova Delhi metallo- β -lactamase-1), que se difundiu inicialmente pela Índia e, subsequentemente, para países de outros continentes (GUERRA; FISCHER; HELMUTH, 2014; NORDMANN, 2014).

Ainda são escassos, subdiagnosticados ou restritos a relatos de casos os estudos sobre a presença de *K. pneumoniae* carreadoras de genes associados com a produção de carbapenemases isoladas de animais de companhia (STOLLE et al., 2013). Tal fato gera preocupação quanto o papel de cães e gatos na disseminação de *K. pneumoniae* multirresistentes, incluindo aos carbapenêmicos (PULSS et al., 2018), posto que é crescente o aumento de animais de companhia em todo o mundo (ESCH; PETERSEN, 2013). Estudos pontuais na Alemanha (STOLLE et al., 2013; PULSS et al., 2018) e Espanha (GONZÁLEZ-TORRALBA et al., 2016) têm relatado *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemases em animais de companhia, com identificação dos genes *bla_{OXA-48}* e *bla_{VIM}*. Entretanto, a real prevalência de genes codificadores de carbapenemases em bactérias provenientes dessas espécies animais ainda é desconhecida (GUERRA; FISCHER; HELMUTH, 2014).

É notável o crescimento mundial e a importância na sociedade atual dos cães e gatos como animais de companhia (ESCH; PETERSEN, 2013). Estima-se que a população mundial de animais de estimação alcançou 1,5 bilhão em 2012. Desde 2008, o Brasil ocupa a 4ª posição em número de animais de estimação, com 134,2 milhões (IBGE, 2013). Em 2013, a Pesquisa Nacional da Saúde realizada pelo IBGE estimou a população de cães e gatos em domicílios brasileiros em 52,2 milhões e 22,1 milhões, respectivamente. No entanto, os animais de companhia, particularmente cães e gatos, representam espécies animais com elevado potencial para disseminar patógenos aos humanos, incluindo bactérias com potencial zoonótico, por vezes multirresistentes aos antimicrobianos (GUARDABASSI; SCHWARZ; LLOYD, 2004; NORDMANN; POIREL, 2013). Tal risco é relacionado ao contato cada vez mais próximo dessas espécies com humanos, além do uso frequente, por vezes não racional,

de antimicrobianos no tratamento desses animais domésticos (GUARDABASSI; SCHWARZ; LLOYD, 2004). Poucos estudos foram conduzidos na identificação da multirresistência de *K. pneumoniae*, com grande número de isolados, obtidos de cães e gatos (HARADA et al., 2016), tampouco na detecção dos principais genes relacionados à produção de carbapenemases (PULSS et al., 2018). Diante desse cenário, o presente estudo investigou a multirresistência aos antimicrobianos e a detecção dos genes *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM} e *bla*_{OXA-48} associados a produção de carbapenemases em *K. pneumoniae* isoladas de diferentes afecções em cães e gatos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Klebsiella pneumoniae*: taxonomia e propriedades gerais

K. pneumoniae são bactérias gram-negativas pertencentes à família Enterobacteriaceae, que possui mais de 40 gêneros incluindo *Citrobacter*, *Cronobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Morganella*, *Plesiomonas*, *Proteus*, *Providencia*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella* e *Yersinia*, muitos dos quais responsáveis por infecções em humanos e animais (MOXLEY, 2013).

O gênero *Klebsiella* foi nomeado por Trevisan em 1885 em homenagem ao bacteriologista alemão Theodor Albrecht Edwin Klebs (1834-1913) [STÜRCHLER, 2016]. O bacilo, atualmente denominado *Klebsiella*, foi descrito em 1882 por Carl Friedländer como causa de pneumonia grave e fatal, referido durante anos como “bacilo de Friedländer” (WINN et al., 2008; STÜRCHLER, 2016).

Em 2001, a taxonomia de *Klebsiella* sofreu alterações após pesquisadores na França realizarem análise genética comparativa de nove espécies de *Klebsiella* com 20 outras espécies de 11 gêneros da família Enterobacteriaceae. Os resultados do estudo possibilitaram propor a divisão do gênero *Klebsiella* em três grupos: o grupo I, que compreende *K. pneumoniae* subespécie *pneumoniae*, *K. rhinoscleromatis*, *K. ozaenae* e *K. granulomatis*; o grupo II, compreendido por *K. ornithinolytica*, *K. planticola*, *K. trevisanii* e *K. terrigena* e o grupo III, por *K. oxytoca*. As espécies pertencentes ao grupo I permanecem no gênero *Klebsiella*, enquanto as do grupo II compõem o novo gênero *Raoultella* (DRANCOURT et al., 2001).

K. pneumoniae foi previamente subdividida também em filogrupos denominados KpI, KpII e KpIII (BRISSE; PASSET; GRIMONT, 2014). Foi proposto que esses filogrupos sejam renomeados como espécies distintas, quais sejam: *K. pneumoniae* (KpI), *K. quasipneumoniae* (KpII) e *K. variicola* (KpIII) (HOLT et al., 2015), pertencentes ao complexo *K. pneumoniae* (HARADA et al., 2016).

Assim como as demais bactérias da família Enterobacteriaceae, *K. pneumoniae* se apresenta à microscopia como bacilo ou coco-bacilo gram-negativo, não esporulado, com até 3 µm de comprimento. São imóveis, anaeróbicos facultativos e capsulados (QUINN et al., 2011). Em ágar

MacConkey as colônias são tipicamente grandes, brilhantes, mucóides e de tonalidade vermelha, indicando fermentação da lactose e produção de ácido (WINN et al., 2008).

As espécies de *Klebsiella* são fenotipicamente identificadas com base em reações bioquímicas, com utilização dos meios EPM, citrato e Mili (WINN et al., 2008; QUINN et al., 2011), com destaque para a hidrólise de ureia e produção de indol (PODSCHUN; ULLMANN, 1998). A maioria dos isolados hidrolisam lentamente a ureia, produzindo cor rosa pálido na superfície do ágar Christensen (ágar ureia). A produção do indol a partir do triptofano pode ser utilizada para diferenciar as duas espécies mais comuns, visto que *K. pneumoniae* é indol-negativa enquanto *K. oxytoca* é indol-positiva (WINN et al., 2008).

A capacidade de *K. pneumoniae* desenvolver infecções em diferentes órgãos ou tecidos está diretamente relacionada a certos fatores de virulência do patógeno, como cápsula, endotoxina, adesinas e invasinas (MAATALLAH et al., 2014). A cápsula tem relação direta na patogenicidade. A estrutura capsular é composta de polissacarídeos, sob a forma de feixes grossos (fibrilas) cobrindo toda a superfície bacteriana (PODSCHUN; ULLMANN, 1998; GUPTA et al., 2003). A cápsula confere proteção à bactéria contra a resposta imune do hospedeiro, pois inibe a fagocitose e dificulta a lise pelo sistema complemento (PODSCHUN; ULLMANN, 1998; GUPTA et al., 2003; DOORDUIJN et al., 2016; PACZOSA; MECSAS, 2016). Atualmente são conhecidos mais de 78 antígenos capsulares (K) de *K. pneumoniae*, dos quais K1, K2, K20, K54 e K57 são associados com doenças sistêmicas (MAATALLAH et al., 2014).

A endotoxina é outro fator de virulência observado em *K. pneumoniae* e demais bactérias gram-negativas. A atividade dessa toxina depende do lipídio A, componente do lipopolissacarídeo de membrana (LPS), que é liberado na lise celular. A toxina ativa o sistema complemento, causando liberação de citocinas e substâncias pró-inflamatórias, com consequente leucocitose, trombocitopenia, coagulação intravascular disseminada, febre, choque e morte ocasional de animais e humanos (MURRAY, ROSENTHAL; PFALLER, 2017).

As adesinas fimbriais são estruturas filamentosas que se projetam da superfície de *K. pneumoniae* e medeiam o processo de fixação do micro-organismo nas superfícies e células de mucosas dos tratos respiratório, gastrointestinal e urinário (PODSCHUN; ULLMANN, 1998; GUPTA et al., 2003).

Ainda, outros fatores potencialmente patogênicos de *K. pneumoniae* incluem sistemas de aquisição de ferro (sideróforos) e invasinas (PODSCHUN; ULLMANN, 1998; HAZEN et al., 2014).

2.2 Infecções em animais domésticos

Kebsiella sp. são bactérias ubíquas, amplamente distribuídas no solo, água e ambientes úmidos, esgotos e plantas. Também são encontradas nas fezes e no trato gastrointestinal de animais (PODSCHUN; ULLMANN, 1998; MOXLEY, 2013). *K. pneumoniae* merece destaque entre os representantes do gênero pela particularidade de colonizar diferentes mucosas em humanos, além de espécies de animais produção e de companhia, silvestres e selvagens (PODSCHUN; ULLMANN, 1998). O patógeno é capaz de se manter viável por longos períodos no meio ambiente e em superfícies abióticas, particularmente em equipamentos e utensílios de uso hospitalar (TOFTELAND et al., 2013). Tanto em animais como em humanos o micro-organismo é oportunista, causando infecções em diferentes órgãos, envolvendo principalmente os tratos respiratório e geniturinário (BRISSE; PASSET; GRIMONT, 2014; BROBERG; PALACIOS; MILLER, 2014).

Nos animais domésticos predominam infecções nos tratos urinário e respiratório, além de glândulas mamárias (BRISSE; VAN DUIJKEREN, 2005). O patógeno está particularmente envolvido em infecções perinatais e mamárias em vacas (MOXLEY, 2013). A mastite bovina por *K. pneumoniae* é predominantemente clínica, com perdas significativas na produção de leite e morte ocasional de animais (GRÖHN et al., 2005; SCHUKKEN et al., 2012; LANGONI et al., 2015; RIBEIRO et al., 2016).

Em equinos, o micro-organismo está envolvido em pneumonia (ESTELL et al., 2016) e metrite em éguas (CONSTABLE et al., 2017). Nos suínos, *K. pneumoniae* está relacionado à mastites e pneumonia, além de surtos de septicemia em leitões neonatos ou no período pós-desmame (BOWRING et al., 2017; BIDEWELL et al., 2018).

2.2.1 Infecções em cães e gatos

À semelhança dos animais de produção, *K. pneumoniae* é encontrada na microbiota entérica de cães e gatos, bem como no ambiente dos criatórios,

causando infecções nos tratos gastrintestinal e urinário, pneumonia e septicemia (KOENIG, 2012).

O micro-organismo está associado a infecções oportunistas em animais de companhia - incluindo nosocomiais - particularmente em animais imunossuprimidos, acometidos por doenças debilitantes ou hospitalizados por longos períodos (QUINN et al., 2011; KOENIG, 2012; MOXLEY, 2013). No ambiente hospitalar, os fômites mais comumente relacionados às infecções por *K. pneumoniae* em cães e gatos são equipamentos cirúrgicos ou obstétricos, além de mesas de uso ambulatorial ou cirúrgico (MOXLEY, 2013). Tal contaminação ocorre pela capacidade do micro-organismo de formar biofilmes, particularmente em cateteres e sondas (CHUNG, 2016). Neste contexto, Bowlt et al. (2013), no Reino Unido, relataram infecção pelo micro-organismo secundária à colocação de cateter arterial em gato.

Apesar da importância do micro-organismo na rotina clínica, poucos estudos têm investigado a prevalência de infecções por *K. pneumoniae* em cães e gatos, contemplando grande número de isolados, ficando as descrições restritas aos relatos de casos ou estudos retrospectivos. As infecções do trato urinário são afecções frequentes em cães, especialmente em fêmeas (BARSANTI, 2012). Mais de 70% das ITUs nessa espécie têm etiologia bacteriana. Em gatos, as ITUs bacterianas são menos comuns. No entanto, podem ocorrer secundárias a sondagem uretral e cirurgias do trato urinário (BARSANTI, 2012). Ghantous e Crawford (2006), nos EUA, relataram caso de cistite por *K. pneumoniae* em felino doméstico com ureteres ectópicos, sugerindo que as ITUs também podem ser secundárias à anomalias genéticas.

Em estudo retrospectivo nos EUA, Seguin et al. (2008) descreveram 5,9% de prevalência de *K. pneumoniae* em cães com ITUs. Punia et al. (2018), na Índia, investigaram a etiologia de ITUs em cães, identificando *K. pneumoniae* como quarto agente bacteriano mais frequente, com 11,11% de isolamento nas culturas de urina. Em estudo similar no Brasil, Carvalho et al. (2014) revelaram 11% de prevalência de enterobactérias em amostras de urina de cães e gatos com ITU, incluindo *K. pneumoniae*.

Embora menos frequentes, podem ocorrer gastroenterites por *K. pneumoniae* em cães e gatos. Nos EUA, Roberts et al. (2000) relataram grave surto de enterite pelo patógeno em cães de canil. De 15 cães adultos, sete

apresentaram sinais de êmese e diarreia com sangue, com óbito de quatro animais, dos quais um por choque séptico.

Assim como outras enterobactérias, *K. pneumoniae* também está envolvida em infecções em cães e gatos neonatos. O ambiente e o próprio contato com secreções e/ou excreções maternas (secreção vaginal, leite, fezes) pode favorecer as infecções (MÜNNICH, 2008).

Infecções por *K. pneumoniae* no trato respiratório em cães e gatos também têm sido relatados. Na Alemanha, Adler et al. (2007) investigaram a etiologia de infecções do trato superior em felinos. De 460 suabes amostrados de orofaringe, 382 apresentaram isolamento bacteriano, com prevalência de 3% de *K. pneumoniae*.

2.3 Infecções em humanos

K. pneumoniae pertence à microbiota entérica de humanos hígidos (EL FERTAS-AISSANI et al., 2013; GORRIE et al., 2017), colonizando também, de forma assintomática, a pele, mucosas e vias respiratórias (GORRIE et al., 2017). A patogenicidade da bactéria está intimamente relacionada à virulência do patógeno e à higidez do hospedeiro (EL FERTAS-AISSANI et al., 2013).

O micro-organismo pode desenvolver processos infecciosos em diferentes órgãos ou sistemas (BROBERG; PALACIOS; MILLER, 2014; LIN et al., 2014; GUO et al., 2016; PACZOSA; MECSAS, 2016; RANJBAR et al., 2016). O comportamento oportunista do patógeno favorece o envolvimento em infecções nosocomiais (BACHMAN et al., 2015; CLEGG; MURPHY, 2016; GUO et al., 2016).

A predisposição às infecções por *K. pneumoniae* é maior em humanos que apresentem algum grau de vulnerabilidade, como crianças, idosos, imunossuprimidos ou indivíduos com comorbidades (TZOUVELEKIS et al., 2012). As principais manifestações clínicas em humanos são representadas por afecções do trato geniturinário, pneumonia, meningite, abscessos hepáticos e septicemia (BROBERG; PALACIOS; MILLER, 2014; LEE et al., 2017).

Estima-se que 30% das infecções hospitalares sejam do trato urinário, afetando principalmente pacientes com histórico de uso de sondas uretrais, recém-operados, idosos e imunocomprometidos (IACOVELLI et al., 2014). *K. pneumoniae* é o segundo patógeno envolvido na etiologia das ITUs em humanos

(RANJBAR et al., 2016; ARANA; RUBIO; ALÓS, 2017), superado apenas por *E. coli* (RANJBAR et al., 2016). O micro-organismo também é causa comum de ITUs por complicações pós-transplantes renais (BRIZENDINE et al., 2015; ESPINAR et al., 2015) ou secundárias ao diabetes mellitus (NOCUA-BÁEZ et al., 2017).

Os casos de pneumonia por *K. pneumoniae* são usualmente observados em humanos hospitalizados (BACHMAN et al., 2015), embora infecções de origem não hospitalar sejam emergentes em muitos países (WHO, 2014). As taxas de mortalidade por pneumonia podem exceder 50% em pacientes vulneráveis, mesmo quando tratados com antimicrobianos (WHO, 2014). Tal fato está relacionado a tendência do patógeno em exibir resistência múltipla aos antimicrobianos, restringindo as possibilidades de terapias eficazes (WINN et al., 2008). Ainda, muitos casos de pneumonia nosocomial por *K. pneumoniae* ocorrem após procedimentos de ventilação mecânica, com relato de casos em países como Itália (VIAGGI et al., 2015), China (GUO et al., 2016; YAN et al., 2016) e Egito (MOHAMED et al., 2017).

Os abscessos hepáticos em pacientes infectados por *K. pneumoniae* foram inicialmente descritos em meados da década de 80, em Taiwan (CHANG; CHOU, 1995). Nos últimos anos, nova síndrome invasiva por *K. pneumoniae*, hipervirulenta, emergiu no sudoeste asiático, causando abscessos hepáticos e complicações extra-hepáticas, como endoftalmite e meningite (SACCENTE, 1999; SIU et al., 2012). Indivíduos diabéticos ou com infecções hepáticas primárias são mais propensos a apresentarem esta síndrome (SIU et al., 2012).

Linhagens de *K. pneumoniae* multirresistentes, em especial as produtoras de carbapenemases, estão associadas com altas taxas de mortalidade em humanos, posto que as infecções geralmente evoluem para septicemia (KANWAR et al., 2018). Nos EUA, a ocorrência de septicemia por *K. pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos aumentou de 1,6% para 10,4% entre 2001 a 2011. Isolados de *K. pneumoniae* produtores de carbapenemases têm merecido atenção mundial, representando um desafio para o tratamento e controle das infecções por bactérias multirresistentes (NORDMANN; CUZON; NAAS, 2009).

No Brasil, Fortaleza et al. (2014) realizaram estudo retrospectivo, entre 2005 e 2010, com intuito de investigar a etiologia das septicemias em pacientes

do Hospital das Clínicas de Botucatu, SP. Foi observado que 67% das septicemias foram causadas por patógenos gram-negativos, incluindo *K. pneumoniae*. Em 2015, o micro-organismo ocupou o primeiro lugar no país como agente causal de septicemia em pacientes hospitalizados, representando 16,9% dos casos (ANVISA, 2013a).

2.4 Resistência aos antimicrobianos

A resistência bacteriana aos antimicrobianos é uma das principais preocupações atuais da área médica, especialmente em ambientes hospitalares (DIENSTMANN et al., 2010; WHO, 2014; MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2017). Os antimicrobianos são usados extensivamente no tratamento de infecções bacterianas em humanos e animais. Devido ao uso intenso, a resistência bacteriana aos antimicrobianos é problema emergente de âmbito mundial, tanto em medicina humana como veterinária (BLAIR et al., 2015; SCHWARZ; LOEFFLER; KADLEC, 2017), representando um dos principais problemas enfrentados por equipes multiprofissionais no conceito de “Uma Saúde” (*One Health*) [LAMMIE; HUGHES, 2016].

As bactérias possuem mecanismos biológicos que possibilitam a adaptação a diferentes níveis de pressão ambiental. A resistência aos antimicrobianos é uma expressão natural de evolução bacteriana às infecções (CABRERA; GÓMEZ; ZÚÑIGA, 2007; WHO, 2014). A resistência bacteriana pode ser intrínseca ou adquirida (CABRERA; GÓMEZ; ZÚÑIGA, 2007).

K. pneumoniae, assim como outros agentes gram-negativos, apresenta uma membrana externa que atua como barreira contra a entrada de antimicrobianos representando, assim, resistência intrínseca (CABRERA; GÓMEZ; ZÚÑIGA, 2007). Já a resistência adquirida resulta de mutações cromossômicas em genes reguladores ou estruturais, ou mesmo por aquisição de genes de resistência, principalmente por elementos genéticos móveis como plasmídios, integrons e transposons (CABRERA; GÓMEZ; ZÚÑIGA, 2007; TAFUR; TORRES; VILLEGAS, 2008; MADIGAN et al., 2010; MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2017).

Os plasmídios são elementos genéticos que se apresentam sob a forma de segmentos livres de DNA extra-cromossomal, encontrados no interior da célula, comumente em formato circular. Os plasmídios contêm genes que

conferem propriedades especiais ao micro-organismo, como atividades metabólicas, produção de toxinas, fatores de colonização e outros mecanismos de virulência. Há ainda os plasmídios que carregam genes de resistência aos antimicrobianos denominados plasmídios *R* (GIGUÈRE et al., 2010; MADIGAN et al., 2010).

Os transposons são pequenos segmentos de DNA capazes de se movimentar entre diferentes moléculas de DNA da célula, como plasmídios, cromossomos ou bacteriófagos. Ao deslocar-se, podem transferir horizontalmente genes que codificam várias características, incluindo a resistência aos antimicrobianos (MADIGAN et al., 2010).

A transferência de material genético entre células bacterianas pode ocorrer por quatro mecanismos principais: 1) transformação (absorção ativa e incorporação de DNA exógeno após lise bacteriana); 2) conjugação (troca de informação genética entre bactérias por intermédio de pili sexual); 3) transdução (transmissão de informação genética entre bactérias por bacteriófagos); e 4) transposição (movimento de um segmento de DNA, como transposons, que podem conter genes de resistência) [MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2017; SCHWARZ; LOEFFLER; KADLEC, 2017]. Ainda, são reconhecidos quatro mecanismos bioquímicos responsáveis pela resistência bacteriana adquirida, incluindo em *K. pneumoniae*, que podem ocorrer isolados ou associados: (1) alteração da permeabilidade de membrana; (2) bombas de efluxo; (3) alterações do sítio alvo do antimicrobiano; e (4) ação enzimática ou inativação do antimicrobiano (CABRERA; GÓMEZ; ZÚÑIGA, 2007; TAFUR; TORRES; VILLEGAS, 2008).

2.4.1 Alteração da permeabilidade de membrana

A maioria dos antimicrobianos utilizados na rotina clínica possuem ação intracelular no citoplasma bacteriano. Em bactérias gram-negativas, o fármaco precisa atravessar a membrana externa para exercer seu efeito terapêutico (MUNITA; ARIAS, 2016). A membrana externa é constituída de uma dupla camada lipídica, com a presença de porinas. As porinas são proteínas que formam canais repletos de água e regulam a entrada de vários elementos, incluindo os antimicrobianos.

A permeabilidade da membrana geralmente é alterada mediante mutações que influenciam na conformação ou quantidade das porinas (CABRERA; GÓMEZ; ZÚÑIGA, 2007; TAFUR; TORRES; VILLEGAS, 2008). Moléculas hidrofílicas tais como β -lactâmicos, tetraciclinas e certas fluoroquinolonas são particularmente afetadas por mudanças na permeabilidade da membrana externa, uma vez que usam porinas para entrada na célula bacteriana (BLAIR et al., 2015; MUNITA; ARIAS, 2016).

2.4.2 Bombas de efluxo

O mecanismo de efluxo dos antimicrobianos pode ser considerado um tipo de resistência intrínseca (CABRERA; GÓMEZ; ZÚÑIGA, 2007), frequentemente utilizado por bactérias gram-negativas (TAFUR; TORRES; VILLEGAS, 2008).

As bombas de efluxo transportam ativamente o fármaco do espaço pericitoplasmático para o exterior da célula, evitando ligação com o sítio de ação (TAFUR; TORRES; VILLEGAS, 2008; BLAIR et al., 2015). Dessa forma, as concentrações intracelulares desses agentes não atingem níveis terapêuticos requeridos para atividade antimicrobiana efetiva (WINN et al., 2008).

Esses sistemas são específicos para um antimicrobiano ou transportam múltiplos fármacos (POOLE, 2005; BLAIR et al., 2015). Podem ser codificados por genes cromossômicos ou plasmidiais (LI; NIKAIIDO, 2009). A superexpressão de bombas de efluxo multidrogas é um dos principais mecanismos de resistência bacteriana (BLAIR et al., 2015; WANG; VENTER; MA, 2016).

2.4.3 Alterações do sítio alvo do antimicrobiano

A interferência no local de ação do antimicrobiano é outro mecanismo comum de resistência bacteriana (MUNITA; ARIAS, 2016). A proteção dos sítios-alvos é considerada estratégia de resistência relevante, pois envolve várias classes de antimicrobianos (BLAIR et al., 2015).

As bactérias podem impedir a ação do fármaco na região de ligação ou realizar modificações nesse local, resultando em diminuição da afinidade pela molécula do antimicrobiano (MUNITA; ARIAS, 2016). Exemplo clássico desse mecanismo em bactérias gram-negativas é a resistência à classe dos macrolídeos, por modificação do sítio de ação no ribossomo. Para os microorganismos resistentes à classe dos β -lactâmicos ocorrem alterações nas

proteínas ligadoras de penicilina (PBPs), presentes na parte externa da membrana citoplasmática, impedindo a ação do fármaco (CABRERA; GÓMEZ; ZÚÑIGA, 2007).

2.4.4 Ação enzimática

Desde 1940, com a descoberta da penicilina, a modificação enzimática de antimicrobianos representa importante mecanismo de resistência bacteriana (BLAIR et al., 2015). A ação enzimática das β -lactamases é um exemplo clássico desse mecanismo. As β -lactamases são enzimas produzidas por certas espécies de bactérias, principalmente gram-negativas, capazes de hidrolisar o anel β -lactâmico da molécula de antimicrobianos do grupo β -lactâmico (penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos, monobactâmicos) resultando em inativação dos fármacos (CABRERA; GÓMEZ; ZÚÑIGA, 2007). Uma vez que esses fármacos são utilizados para o controle de diferentes infecções, a presença de β -lactamases desempenha papel crítico na eficácia dos tratamentos com esse grupo de antimicrobianos (BUSH; JACOBY, 2010).

Os genes que codificam as β -lactamases são geralmente denominados com a sigla *bla* (iniciais de beta-lactamases) seguida do nome da enzima específica (e.g., *bla_{KPC}*) (PARTRIDGE, 2015; MUNITA; ARIAS, 2016), podendo ser cromossomais ou presentes em elementos móveis, como plasmídios, transposons e integrons, possibilitando a transferência entre bactérias (TAFUR; TORRES; VILLEGAS, 2008; MUNITA; ARIAS, 2016).

A classificação das β -lactamases é baseada nas características funcionais das enzimas ou na estrutura primária (QUEENAN; BUSH, 2007; BUSH; JACOBY, 2010). A forma mais simples de classificação das β -lactamases é a divisão das enzimas em quatro classes (A, B, C e D), segundo postulado por Ambler (AMBLER, 1980; BUSH; JACOBY, 2010; PARTRIDGE, 2015). As enzimas da Classe A abrangem ampla variedade de proteínas com atividades catalíticas diferentes, incluindo penicilinases, β -lactamases de espectro estendido (ESBLs) e carbapenemases (como KPC) [PARTRIDGE, 2015; MUNITA; ARIAS, 2016].

As metallo- β -lactamases da Classe B são dependentes de íons zinco para atuação, ao contrário das enzimas das classes A, C e D, que utilizam serina no sítio ativo. Essas enzimas podem conferir resistência aos antimicrobianos β -

lactâmicos (exceto aztreonam) e carbapenêmicos (PARTRIDGE, 2015; MUNITA; ARIAS, 2016).

As β -lactamases da Classe C conferem resistência a todas as penicilinas e cefalosporinas. A enzima da Classe C mais clinicamente relevante é a AmpC, uma cefalosporinase codificada principalmente no cromossomo (embora o gene também seja encontrado em plasmídios), presente em *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Morganella morganii* e *Pseudomonas aeruginosa*. Em contraste, *K. pneumoniae* e *Proteus* spp. são exemplos de enterobactérias que não expressam genes codificadores dessa enzima (MUNITA; ARIAS, 2016).

As enzimas da Classe D, também denominadas oxacilinases, foram inicialmente diferenciadas das penicilinas da Classe A devido à capacidade de hidrolisar a oxacilina. Há, ainda, variantes com habilidade de degradar cefalosporinas de terceira geração e carbapenêmicos (PARTRIDGE, 2015).

As carbapenemases são outro grupamento de enzimas β -lactamases clinicamente relevantes devido à capacidade de hidrolisar os carbapenêmicos (doripenem, ertapenem, imipenem e meropenem), que são β -lactâmicos de amplo espectro (MUNITA; ARIAS, 2016). Essas enzimas estão incluídas em variantes das classes Ambler A, B e D das β -lactamases (NORDMANN; NAAS; POIREL, 2011). Na última década, três classes de carbapenemases são encontradas mundialmente, tanto em enterobactérias de origem humana quanto animal: a carbapenemase KPC, as metallo- β -lactamases (dos tipos Imipenemase - IMP, Verona imipenemase - VIM e New Delhi Metallo- β -lactamase - NDM) e as OXA - carbapenemases ou oxacilinases (NORDMANN; CUZON; NAAS, 2009).

São conhecidos também outros mecanismos enzimáticos responsáveis pela resistência bacteriana às demais classes de antimicrobianos. Merecem destaque enzimas que inativam o grupo dos aminoglicosídeos (metilases, acetiltransferases, nucleotidiltransferases e fosfotransferases) [TAFUR; TORRES; VILLEGAS, 2008].

2.5 *Klebsiella pneumoniae* multirresistentes e produtoras de carbapenemases

Em 1976, a descoberta da tienamicina, molécula derivada da bactéria *Streptomyces cattleya* e precursora do imipenem, anunciava novo grupo de fármacos β -lactâmicos, os carbapenêmicos (KAHAN et al., 1979).

Os carbapenêmicos são uma classe de antimicrobianos eficazes para muitas espécies bacterianas e menos vulneráveis aos mecanismos de resistência desenvolvidos pelos micro-organismos, especialmente a resistência aos fármacos β -lactâmicos. Por essa razão, são considerados antimicrobianos de eleição para certas infecções. Ainda, possuem menos efeitos adversos, possibilitando maior segurança na terapêutica clínica (MELETIS, 2016). Dessa forma, torna-se preocupante o surgimento e a rápida disseminação de bactérias resistentes aos carbapenêmicos em todo o mundo, principalmente entre gram-negativas (MELETIS, 2016), tanto em não fermentadoras (*Pseudomonas aeruginosa*) quanto em fermentadoras (Enterobacteriaceae) [POIREL; POTRON; NORDMANN, 2012]. Tal fato pode ser consequência do aumento da utilização dos fármacos carbapenêmicos ou do fenômeno da globalização, que favoreceu o trânsito de pessoas entre os países e continentes (NORDMANN; NAAS; POIREL, 2011).

K. pneumoniae merece destaque entre as bactérias gram-negativas. O agente comumente adquire resistência por elementos genéticos móveis, promovendo rápida disseminação de genes, incluindo codificadores de carbapenemases (ROBILOTTI; DERESINSKI, 2014).

A prevalência de micro-organismos resistentes a múltiplos fármacos representa ameaça emergente Saúde Pública. Isolados de *K. pneumoniae* produtores de carbapenemases apresentam, por vezes, multirresistência a outras classes de antimicrobianos, relacionados com altas taxas de morbimortalidade (TUMBARELLO et al., 2012; MUÑOZ-PRICE et al., 2013; DAIKOS et al., 2014; NORDMANN, 2014; ROBILOTTI; DERESINSKI, 2014).

O primeiro relato de *K. pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos ocorreu em 1996, na Carolina do Norte, EUA (YIGIT et al., 2001). O isolado era resistente aos carbapenêmicos e demais β -lactâmicos, denominado a época *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase ou KPC-1 (gene *bla_{KPC}*) [YIGIT et al., 2001]. Posteriormente, foi descrita KPC-2, como variante de KPC-1, inicialmente nos EUA (BRATU et al., 2005) e depois em partes da Europa (NAAS et al., 2005), América do Sul (VILLEGAS et al., 2006; PASTERAN et al., 2008) e Israel (LEAVITT et al., 2007). Desde então, KPCs têm sido descritas em surtos hospitalares ou casos esporádicos em vários países como China (WEI et al., 2007), Grécia (CUZON et al., 2008; GIAKOUPI et al., 2009), Polônia (BARANIAK

et al., 2009), Itália (GIANI et al., 2009) e França (CARBONNE et al., 2010). Porém, após estudos com base em sequenciamento, foi reconhecido que KPC-1 e KPC-2 são a mesma enzima (BROBERG; PALACIOS; MILLER, 2014).

No Brasil, a primeira identificação de KPC ocorreu em 2006, em linhagens isoladas de amostras de sangue e urina de pacientes internados na Unidade de Tratamento Intensivo (UTI), em hospital da cidade de Recife (MONTEIRO et al., 2009).

As variantes de oxacilinasas, enzimas inseridas na classe D de Ambler, são amplamente difundidas entre as bactérias gram-negativas. Porém, em 2001, foi identificada na Turquia nova variante denominada OXA-48, codificada pelo gene plasmidial *bla*_{OXA-48} (POIREL et al., 2004). Essa primeira linhagem de *K. pneumoniae* produtora de OXA-48 foi multirresistente aos antimicrobianos, incluindo cefalosporinas de espectro estendido, cefamicinas, monobactâmicos e carbapenêmicos (POIREL et al., 2004). Subsequentemente, OXA-48 foi identificada em outros países e tem emergido principalmente em pacientes acometidos por *K. pneumoniae* na Turquia, oeste da Europa, norte da África e países do mediterrâneo (POIREL; POTRON; NORDMANN, 2012).

Em 2009, na Índia, foi descrita nova enzima carbapenemase denominada New Delhi Metallo β -lactamase (NDM-1), codificada pelo gene *bla*_{NDM-1} (KUMARASAMY et al., 2010). Tal enzima tem a capacidade de hidrolizar todos os antimicrobianos β -lactâmicos, com exceção dos monobactâmicos. Após a primeira descrição, NDM tem sido identificada em várias bactérias gram-negativas, especialmente *K. pneumoniae*, *E. coli* e *P. aeruginosa* (YONG et al., 2009; WALSH et al., 2011). A rápida disseminação mundial de bactérias carreadoras do gene *bla*_{NDM-1} pode ser atribuída, em parte, a presença em plasmídios ou outros elementos genéticos móveis (WALSH et al., 2011).

As carbapenemases podem coexistir com outras β -lactamases, como as ESBLs. Ainda, mais de uma carbapenemase pode estar presente, simultaneamente, como descrito em *K. pneumoniae* isolada de humano na China que carrega os genes *bla*_{KPC-2} e *bla*_{IMP-4} (WANG et al., 2012).

A identificação de linhagens de *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemases é importante para o direcionamento do tratamento, estabelecimento do prognóstico e subsidiar ações de controle. Métodos fenotípicos como testes “in vitro” de concentração inibitória mínima (CIM),

difusão com discos, teste de Hodge modificado (ANVISA, 2013b; CLSI, 2016) ou meios cromogênicos (PANAGEA et al., 2011; PERRY et al., 2011) têm sido utilizados na triagem de isolados produtores de carbapenemases. Porém, recomenda-se que os isolados com potencial fenotípico de resistência às carbapenemases sejam confirmados pela detecção molecular dos genes de resistência (POIREL et al., 2011; TZOUVELEKIS et al., 2012), como a Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) e sequenciamento. Os testes moleculares possibilitam, ainda, a detecção de carbapenemases do tipo OXA, para as quais não foram desenvolvidos testes fenotípicos específicos (TZOUVELEKIS et al., 2012).

2.5.1 *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases em cães e gatos

Embora a emergência da multirresistência de *K. pneumoniae* às carbapenemases represente emergência de âmbito mundial, os estudos com isolados de origem animal, particularmente em cães e gatos, têm investigado quase que exclusivamente à produção de ESBLs (DONATI et al., 2014; SCHMIEDEL et al., 2014; HARADA et al., 2016; XIA et al., 2017).

Nos animais de companhia é bem documentada a identificação dos genes *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}* e *bla_{OXA-48}* em outras enterobactérias, com destaque para *E. coli* (SHAHEEN; NAYAK; BOOTHE, 2013; LIU; THUNGRAT; BOOTHE, 2016), *E. cloacae* (DANIELS et al., 2018) e *Salmonella* sp. (FERNÁNDEZ; GUERRA; RODICIO, 2018). No entanto, apenas três estudos se propuseram a investigar os genes de resistência aos carbapenêmicos em isolados de *K. pneumoniae* obtidos de cães e gatos. Neste contexto, o primeiro relato de detecção de OXA-48 em *K. pneumoniae* e *E. coli* de cães foi descrito por Stolle et al. (2013), na Alemanha. As linhagens de ambas bactérias foram provenientes de cães hospitalizados em uma clínica veterinária. Foram identificadas, em diferentes espécimes clínicos dos cães, 109 e 1.175 isolados de *K. pneumoniae* e *E. coli*, respectivamente. Destes, oito carregavam o gene *bla_{OXA-48}* (cinco isolados de *K. pneumoniae* e três de *E. coli*). Os genes de resistência foram identificados em animais mantidos sob terapia intensiva e todos apresentavam comorbidades. *K. pneumoniae* foi isolada de secreções de feridas, lavado traqueobrônquico, fezes, urina e cateter venoso central. Devido à natureza clonal dos isolados, os autores sugeriram origem nosocomial das infecções.

Na Alemanha, Pulss et al. (2018) investigaram a emergência de enterobactérias produtoras de carbapenemases em linhagens de *E. coli* (n=19.025), *Klebsiella* spp. (n=1.607) e *Enterobacter* spp. (n=570) isoladas de diferentes afecções clínicas e fezes de animais de produção e companhia. As amostras eram provenientes de hospital veterinário universitário bem como várias clínicas veterinárias da Alemanha. Foram investigados os genes *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{VIM}* e *bla_{OXA-48}*. Foram identificados 137 (0,64%) isolados carreadores do gene *bla_{OXA-48}*, incluindo oito linhagens (cinco isolados de *K. pneumoniae* e três de *E. coli*) anteriormente relatadas por Stolle et al. (2013). Isolados *bla_{OXA-48}* foram identificados somente em animais de companhia, particularmente cães (120/3775=3,2%) e gatos (13/932=1,4%). O gene *bla_{OXA-48}* foi detectado em 23,4% (77/329) e 11,4% (5/44) de *K. pneumoniae* isoladas de cães e gatos, respectivamente.

Na Espanha, González-Torralba et al. (2016) pesquisaram os genes *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{VIM}*, *bla_{IMP}* e *bla_{OXA-48}* em *K. pneumoniae* isoladas de 160 suabes retais de cães, atendidos em hospitais veterinários de Madri. Após triagem em meio cromogênico e confirmação com PCR, foi identificada uma (1/160=0,6%) linhagem de *K. pneumoniae* que carregava o gene *bla_{VIM-1}*.

Os autores dos três estudos supracitados salientaram a necessidade de maior número de investigações para o monitoramento global de enterobactérias produtoras de carbapenemases em animais. Ainda, alertam para os riscos de transferência de isolados resistentes aos carbapenêmicos, entre humanos e animais (STOLLE et al., 2013; GONZÁLEZ-TORRALBA et al., 2016; PULSS et al., 2018).

Atualmente, com o crescente número de animais de companhia presentes nos domicílios, especialmente cães e gatos, é inevitável o contato próximo entre esses animais e humanos, favorecendo condições para a transmissão de patógenos (GUARDABASSI; SCHWARZ; LLOYD, 2004). Porém, há muita divergência em relação ao papel dos cães e gatos na transmissão de *K. pneumoniae* multirresistentes, incluindo isolados que carregam genes de resistência aos carbapenêmicos (POIREL et al., 2014). Apesar dessa classe de fármacos não ser de uso rotineiro no tratamento de afecções em animais, outras classes de antimicrobianos, incluindo β -lactâmicos e derivados, são utilizadas nos animais de companhia e muitos desses fármacos são também de uso em

humanos. Por vezes, esses tratamentos não são respaldados na identificação do agente bacteriano, tampouco em testes de prévios de sensibilidade “in vitro” aos antimicrobianos, fato que poderia favorecer o aumento da pressão seletiva para bactérias multirresistentes (GUARDABASSI; SCHWARZ; LLOYD, 2004).

2.6 Índice de Resistência Múltipla aos Antimicrobianos

O IRMA foi inicialmente preconizado para a identificação de linhagens multirresistentes de *E. coli*, particularmente de origem humana. É calculado pela razão entre o número de classe(s) de antimicrobiano(s) contra a(s) qual (ais) cada linhagem é resistente e o número total de classes testadas. Comumente são testadas, no mínimo, dez classes e, neste caso, consideram-se índices $\geq 0,3$ indicadores fenotípicos de fonte potencial de transmissão de genes de resistência pelos isolados (KRUMPERMAN, 1983). Valores elevados de IRMAs podem estar associados a falhas no tratamento de doenças bacterianas em animais e humanos (MOTA et al., 2005).

Nos últimos anos, o cálculo do IRMA têm sido estendido a outros micro-organismos, além de *E. coli*. O índice foi determinado para isolados de *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. provenientes de hospitais na Índia (PAUL et al., 1997; BHUVANESHWARI, 2017) e Jamaica (DAVIS; BROWN, 2016). Em 2013, Osundiya e colaboradores, na Nigéria, determinaram o IRMA para *P. aeruginosa* e *Klebsiella* spp. também isolados de pacientes humanos hospitalizados.

Na Índia, Chitanand et al. (2010) utilizaram o índice em isolados de *E. coli*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter diversus*, *Enterobacter aerogenes* e *Klebsiella* spp. obtidos de amostras de água de rio.

No Brasil, foi calculado o IRMA em 67 linhagens de *Rhodococcus equi* isoladas de equinos, humanos e do ambiente (GIRARDINI et al., 2013). Ainda, Zappa et al. (2017) determinaram o índice em *Proteus mirabilis* e *Proteus vulgaris* isoladas de diferentes afecções clínicas em animais domésticos. Em ambos os estudos no país foram identificados isolados multirresistentes.

O IRMA tem demonstrando ser método valioso de triagem na identificação de bactérias multirresistentes. O cálculo do índice é simples e o teste “in vitro” de fácil realização, sem necessidade de treinamento ou equipamentos especializados (OSUNDIYA; OLADELE; ODUYEBO, 2013), podendo ser

aplicado em isolados provenientes de amostras clínicas de humanos e animais, bem como de origem ambiental.

Considerando a emergência da multirresistência de *K. pneumoniae* em todo o mundo e a escassez de estudos sobre os principais genes associados a produção de carbapenemases em animais de companhia, o presente estudo investigou a multirresistência aos antimicrobianos e a presença dos genes *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}* e *bla_{OXA-48}* em *K. pneumoniae* isoladas de diferentes afecções clínicas em cães e gatos.

3. HIPÓTESES DE ESTUDO

- ✓ É provável encontrar elevada resistência aos antimicrobianos nos isolados de *K. pneumoniae*, principalmente para fármacos convencionais ou utilizados há décadas no tratamento de afecções em cães e gatos;
- ✓ Espera-se identificar isolados carreando os genes *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}* e/ou *bla_{OXA-48}*, relacionados com a produção de carbapenemases por *K. pneumoniae*.
- ✓ É possível, também, que a presença dos genes de resistência investigados tenha associação com a multirresistência fenotípica dos isolados.

4. OBJETIVOS

4.1 Geral

Investigar a multirresistência aos antimicrobianos e a presença de genes associados à produção de carbapenemases em *K. pneumoniae* isoladas de diferentes espécimes clínicos em cães e gatos.

4.2 Específicos

- ✓ Avaliar a multirresistência dos isolados a 19 antimicrobianos de 10 grupamentos com base no IRMA;
- ✓ Detectar os principais genes associados à produção de carbapenemases (*bla_{KPC}*, *bla_{NMD}* e *bla_{OXA-48}*) nos isolados;
- ✓ Comparar a multirresistência fenotípica de *K. pneumoniae* no IRMA com a detecção molecular dos genes de resistência.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)

A realização do presente projeto de pesquisa foi aprovada pela CEUA, FMVZ – UNESP, Botucatu, SP (protocolo nº 197/2018), uma vez que não fere qualquer preceito ético e de uso de animais no desenvolvimento de estudos científicos (Anexo 1).

5.2 Isolamento e identificação de *Klebsiella pneumoniae*

Os isolados de *K. pneumoniae* utilizados no presente estudo foram provenientes da rotina do Laboratório de Diagnóstico Microbiológico da FMVZ-UNESP/Botucatu, SP, entre 2017 e 2018, obtidos de diferentes espécimes clínicos de cães e gatos. Os espécimes clínicos encaminhados ao laboratório foram obtidos de cães e gatos que estavam em atendimento no Hospital Veterinário da FMVZ-UNESP/Botucatu, SP, ou ainda, oriundos de clínicas particulares da cidade de Botucatu e região. Para inclusão no estudo não houve restrição de raça, sexo, idade ou procedência dos animais.

Todos os isolados obtidos no período supracitado foram incluídos no estudo. Os diferentes espécimes clínicos de cães e gatos (urina, fezes, secreções de conduto auditivo, abscessos e fragmento de órgãos) foram semeados no meio seletivo de ágar MacConkey e em ágar sangue ovino (5%) desfibrinado, mantidos em condições de aerobiose a 37°C, por 72h, com leituras a cada 24h. Após 24h de incubação, as colônias sugestivas de *K. pneumoniae* (entre 1 a 2 mm de diâmetro, lactose positivas, brilhantes, de aspecto mucóide) foram submetidas a testes bioquímicos (KRIEG e HOLT, 1994; WINN et al., 2008; QUINN et al., 2011) nos meios de Escola Paulista de Medicina – EPM (glicose, gás, LTD, H₂S, urease), MILi (motilidade, lisina e indol) e citrato de Simmons. Após identificação, todos os isolados foram mantidos em duplicata em ágar Lignières, a 25°C, até a realização dos testes de sensibilidade “in vitro” e detecção molecular dos genes investigados.

5.3 Testes de sensibilidade microbiana “in vitro”

5.3.1 Método de difusão com discos

Todos os testes de sensibilidade microbiana “in vitro” foram realizados no Laboratório de Diagnóstico Microbiológico da FMVZ-UNESP/Botucatu, SP. A totalidade das linhagens de *K. pneumoniae* foi submetida ao teste de sensibilidade microbiana utilizando o método clássico de difusão com discos (BAUER et al., 1966) e a interpretação baseada no *Clinical Laboratory Standard Institute* - CLSI (CLSI, 2015; 2016). Para tanto, 4 a 5 colônias de *K. pneumoniae* foram inoculadas em caldo BHI e incubadas a 37°C por 6 a 8h até atingirem a turvação padrão na escala Mc Farland. Posteriormente, o inóculo foi depositado em placas contendo meio de Müller-Hinton, com auxílio de suabes estéreis. Após cerca de 15 minutos foram depositados os discos comerciais contendo concentrações padrões dos antimicrobianos a serem testados. As placas foram incubadas em condições de aerobiose, a 37°C por 24h, para posterior leitura.

Foram utilizados 19 antimicrobianos pertencentes a dez grupamentos distintos de fármacos, recomendados no tratamento de infecções por *Klebsiella pneumoniae* em animais de companhia (QUINN et al., 2011; CLSI, 2015) e/ou em humanos (CLSI, 2016). A tabela 1 sumaria os fármacos utilizados, bem como a interpretação da leitura dos halos de inibição.

Tabela 1 – Antimicrobianos utilizados no teste “in vitro” de sensibilidade microbiana – método de difusão com discos – e interpretação dos halos de inibição em *K. pneumoniae* isoladas de diferentes afecções em cães e gatos. Botucatu, SP, 2017 - 2018.

Classes	Antimicrobianos	Concentração do disco (µg)	Interpretação Diâmetro dos halos (mm)		
			Resistente	Parcialmente sensível	Sensível
Aminoglicosídeos	Amicacina ^{a/b}	30	≤14	15 - 16	≥17
	Gentamicina ^{a/b}	10	≤12	13 - 14	≥15
	Neomicina ^b	30	≤12	13 - 16	≥17
Anfenicóis	Florfenicol ^b	30	≤16	17 - 18	≥19
Beta-lactâmicos	Amoxicilina/ácido ^{a/b} clavulânico	30	≤13	14 - 17	≥18
Carbapenêmicos	Ertapenem ^a	10	≤18	19 - 21	≥22
	Imipenem ^a	10	≤19	20 - 22	≥23
	Meropenem ^a	10	≤19	20 - 22	≥23
Cefalosporinas	Ceftiofur ^b	30	≤17	18 - 20	≥21
	Ceftriaxona ^a	30	≤19	20 - 22	≥23
Fluorquinolonas	Ciprofloxacino ^a	5	≤15	16 - 20	≥21
	Enrofloxacino ^b	5	≤16	17 - 22	≥23
	Levofloxacino ^a	5	≤13	14 - 16	≥17
	Marbofloxacino ^b	5	≤14	15 - 19	≥20
	Norfloxacino ^a	10	≤12	13 - 16	≥17
Macrolídeos	Azitromicina ^a	15	≤13	14 - 17	≥18
Rifamicinas	Rifampicina ^a	5	≤16	17 - 19	≥20
Sulfonamidas	Sulfametoxazole/ ^{a/b} trimetoprim	25	≤10	11 - 15	≥16
Tetraciclinas	Oxitetraciclina ^b	30	≤14	15 - 18	≥19

^aClinical Laboratory Standard Institute, 2016

^bClinical Laboratory Standard Institute, 2015

mm= milímetros; µg= microgramas; ≥maior ou igual; ≤ menor ou igual

5.3.1.1 Identificação fenotípica de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de carbapenemases

Todos os isolados de *K. pneumoniae* foram submetidos ao teste de sensibilidade microbiana - método de difusão com discos – para identificação fenotípica de linhagens produtoras de carbapenemases. Foram utilizados discos comerciais impregnados com os seguintes antimicrobianos do grupo dos carbapenêmicos: ertapenem (10µg), imipenem (10µg) e meropenem (10µg). Isolados resistentes ou parcialmente sensíveis aos antimicrobianos supracitados foram considerados potenciais produtores de carbapenemases (ANVISA, 2013b). A interpretação dos halos de inibição foi a mesma utilizada na tabela 1.

5.3.2 Índice de resistência múltipla aos antimicrobianos (IRMA)

O IRMA foi calculado para todos os isolados de *K. pneumoniae* pela razão entre o número de classe(s) de antimicrobiano(s) contra a(s) qual (ais) cada isolado foi resistente e o número total de classes testadas (dez classes). Isolados que apresentaram índices $\geq 0,3$ foram considerados fonte potencial de transmissão de genes de resistência (KRUMPERMAN, 1983).

5.3.3 Perfis de resistência aos antimicrobianos

Os antimicrobianos cujos isolados apresentarem maior resistência foram agrupados com intuito de avaliar possíveis perfis comuns de resistência aos fármacos.

5.4 Detecção molecular dos genes associados à produção de carbapenemases

Foram pesquisados os genes *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM} e *bla*_{OXA-48} associados a produção de carbapenemases em *K. pneumoniae* (POIREL et al., 2011; PITOUT; NORDMANN; POIREL, 2015). Os testes de detecção molecular dos genes nos isolados de *K. pneumoniae* foram realizados no Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes da UNICAMP, Campinas, SP, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Domingos da Silva Leite.

5.4.1 Controles da reação

A detecção dos genes foi realizada utilizando a técnica de reação em cadeia pela polimerase (PCR) convencional. Como controles positivos foram utilizadas cepas padrão de *K. pneumoniae* *bla*_{KPC}⁺, *bla*_{NDM}⁺ e *bla*_{OXA-48}⁺. Como controle negativo foi utilizada água esterilizada somente com os reagentes da técnica, sem a presença do DNA bacteriano. Todas as cepas controle foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Domingos da Silva Leite, da UNICAMP, Campinas, SP.

5.4.2 Obtenção do material genético

A extração do material genético dos isolados foi obtida pelo método de fervura descrito por Blanco et al. (1997), com modificações. A totalidade dos isolados foi repicada em caldo BHI em aerobiose, a 37°C, por 24h. Após esse período, uma alíquota desse material foi semeada em placas contendo ágar

Müller Hinton, em condições de aerobiose, a 37°C, por 24h. Posteriormente, um raspado de 3 a 4 colônias típicas foi suspenso em 200µL de água ultrapura estéril (Milli-q Plus QPack 1E, Millipore, Billerica, Massachusetts, EUA). As suspensões foram submetidas à fervura por 10 min, resfriadas em banho de gelo por 30 min e centrifugadas a 10.000 rpm por 10 min (Centrifuge 5424 R, Eppendorf®, Hamburgo, Alemanha). Após a centrifugação, uma alíquota de 150 µL do sobrenadante foi transferida para outro eppendorf e utilizada como DNA molde nas reações de amplificação. Os lisados foram congelados em freezer a -20°C, até o momento do uso.

5.4.3 Amplificação do material genético

Para cada reação foram utilizados 2,0 µL do DNA molde, 1,5 µL de tampão [20mM Tris-HCl (pH 8,4), 50mM KCl], 1,2 µL de MgCl₂ 50mM, 0,12µL de cada dextrosinucleotídeo trifosfato (dNTP), 9,03 µL de H₂O ultrapura estéril, 0,15 µL de Taq-DNA Polymerase (Invitrogen®, Califórnia, EUA) e 0,5 µL de cada par iniciadores (Quadro 1), perfazendo volume total de 15 µL. A amplificação foi realizada em termociclador (Applied Biosystems Veriti Thermal Cycler – Thermo Fisher Scientific®, Massachusetts, EUA), conforme descrito por Poirel et al (2011), com modificações nas condições do ciclo, a saber: pré-aquecimento a 94°C/10 minutos e 35 ciclos de 94°C/1 minuto, temperatura de anelamento dos genes *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}* e *bla_{OXA-48}* (Quadro 1), temperatura de extensão de 72°C/2 minutos, seguida por 72°C/7 minutos.

Quadro 1 – Sequência de iniciadores utilizados nas reações de PCR para identificação de genes associados à produção de carbapenemases em *K. pneumoniae* isoladas de diferentes afecções de cães e gatos. Botucatu, SP, 2017 - 2018.

Gene	Primer ^a	Sequência (5'3')	Tamanho do fragmento (pb)	TA (°C)	Referência
<i>bla_{KPC}</i>	KPC-F KPC-R	CGTCTAGTTCTGCTGTCTTG CTTGTCATCCTTGTTAGGCG	798	58	Poirel et al. (2011)
<i>bla_{NDM}</i>	NDM-F NDM-R	GGTTTGGCGATCTGGTTTTC CGGAATGGCTCATCACGATC	621	58	Poirel et al. (2011)
<i>bla_{OXA-48}</i>	OXA-F OXA-R	GCGTGGTTAAGGATGAACAC CATCAAGTTCAACCCAACCG	438	56	Poirel et al. (2011)

C = citosina; T = timina; A= adenina; G= guanina; pp= pares de base; TA = temperatura de anelamento;

^a F= *forward*; R=*reverse*; pb=pares de bases

5.4.4 Eletroforese em gel de agarose

Após realizadas as amplificações dos DNAs bacterianos foi adicionado às soluções 5µL de tampão de amostra (0,25% de azul de bromofenol; 0,25% de xilenocianol e 25% de ficoll). O gel para eletroforese foi preparado por aquecimento, fundindo-se agarose em tampão TAE (Tris 2M, ácido acético 0,04M, EDTA 0,01M e pH 8,0) na concentração final de 2%. Em cada poço do gel foram dispostos 7µL da mistura. Em seguida foi procedida a eletroforese com 100mV por 50 minutos e amperagem variável. As bandas foram identificadas após incubação em solução de brometo de etídio (1,5 µg/mL), por 15 minutos, e visualizadas em transluminador de luz ultravioleta. Para registro, os géis foram fotografados utilizando o sistema ImageMaster® VDS (Amersham Pharmacia Biothec Inc., Piscataway, EUA) e as imagens capturadas pelo programa LISCAP - Capture Application.

5.5 Cálculo amostral e análise estatística

A estimativa do tamanho amostral foi calculada com base na metodologia descrita por Pagano e Gauvreau (2008), utilizando o programa Open Epi versão 3.03a (DEAN et al., 2017). Foi considerada prevalência de 4% para o patógeno (média da prevalência observada em estudos envolvendo o micro-organismo em infecções de cães e gatos), nível de confiança de 95% e erro tolerável de 5%. Nessas condições foi estabelecido número mínimo de 60 isolados de *K. pneumoniae* para a realização do estudo.

A associação dos genes *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}* e *bla_{OXA-48}* (relacionados à resistência de *K. pneumoniae*), o perfil de sensibilidade/resistência *in vitro* e a presença do patógeno em diferentes afecções dos cães e gatos foi avaliada pelo teste de Qui-quadrado (ou Exato de Fisher), utilizando o software GraphPad Prism 5, considerando diferença significativa para valores de $p < 0,05$ (PAGANO; GAUVREAU, 2008). A concordância entre resultados dos testes de sensibilidade para carbapemênicos e cepas positivas para os genes pesquisados foi avaliada mediante estimativas do coeficiente Kappa de concordância categórica (VIERA; GARRETT, 2005). A análise estatística foi realizada com a colaboração do Prof. Dr. Rogerio Giuffrida, da Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, SP.

6. RESULTADOS

6.1 Isolamento de *Klebsiella pneumoniae*

Foram isoladas 65 linhagens de *K. pneumoniae* em diferentes espécimes clínicos de cães e gatos. A frequência de isolamento do patógeno foi maior nas afecções clínicas de cães ($58/65=89,2\%$) do que em gatos ($7/65=10,8\%$).

Em cães, cistite ($26/58=44,8\%$) e enterite ($14/58=24,1\%$) foram as manifestações clínicas mais frequentes. Nos gatos, a ocorrência do agente foi maior em otite ($3/7=28,6\%$).

As principais afecções clínicas em cães e gatos com isolamento do patógeno foram agrupadas na tabela 2.

Tabela 2 – Ocorrência de diferentes afecções clínicas por *K. pneumoniae* em cães e gatos. Botucatu, SP, 2017 - 2018.

Afecções	Cistite	Enterite	Otite	Pneumonia	Abscessos	Rinite	Prostatite	Diversos ¹	Total de isolados (%)
Espécie animal	Nº de isolados/ T de isolados (%)	Nº de isolados/ T de isolados (%)	Nº de isolados/ T de isolados (%)	Nº de isolados/ T de isolados (%)	Nº de isolados/ T de isolados (%)	Nº de isolados/ T de isolados (%)	Nº de isolados/ T de isolados (%)	Nº de isolados/ T de isolados (%)	
Canina	26/58 (44,8)	14/58 (24,1)	2/58 (3,5)	3/58 (5,2)	1/58 (1,7)	6/58 (10,3)	2/58 (3,5)	4/58 (6,9)	58 (89,2)
Felina	2/7 (28,6)	-	3/7 (42,8)	1/7 (14,3)	1/7 (14,3)	-	-	-	7 (10,8)
Total	28 (43,1)	14 (21,6)	5 (7,7)	4 (6,2)	2 (3)	6 (9,2)	2 (3)	4 (6,2)	65 (100)

¹Diversos = conjuntivite, osteomielite, pancreatite e septicemia

Nº = número; T = total; % porcentagem

6.2 Perfil de sensibilidade microbiana e IRMA

Os isolados mostraram sensibilidade $\geq 50\%$ para ertapenem (67,7%), florfenicol (61,5%), levofloxacino (56,9%) e sulfametoxazole/trimetoprim (50,8%). Em contraste, a maior resistência dos isolados foi observada para rifampicina (100%), azitromicina (92,3%), ceftiofur (56,9%), ceftriaxona (53,8%) e enrofloxacin (50,8%) [Tabela 3].

O IRMA $\geq 0,3$ (indicativo de multirresistência) foi observado em 81,5% (53/65) isolados, dos quais 49 (92,4%) de cães e 4 (7,6%) de gatos. Foi observada variação de resistência dos isolados entre 0,1 a 1,0.

Entre as afecções, a maior frequência de multirresistência foi identificada em isolados obtidos de cistite (22/53=41,5%) [Tabela 4].

Tabela 3 – Perfil de sensibilidade microbiana “in vitro”, no teste de difusão com discos, em 65 isolados de *Klebsiella pneumoniae* obtidos de diferentes afecções em cães e gatos. Botucatu, SP, 2017 – 2018.

Perfil de sensibilidade				
Classes	Antimicrobianos	Resistente	Parcialmente sensível	Sensível
		N (%)	N (%)	N(%)
Aminoglicosídeos	Amicacina	13 (20)	30 (46,2)	22 (33,8)
	Gentamicina	11 (16,9)	23 (35,4)	31 (47,7)
	Neomicina	19 (29,2)	46 (70,8)	-
Anfenicóis	Florfenicol	10 (15,4)	15 (23,1)	40 (61,5)
Beta lactâmicos	Amoxicilina/ácido Clavulânico	21 (32,3)	16 (24,6)	28 (43,1)
Carbapenêmicos	Ertapenem	2 (3,1)	19 (29,2)	44 (67,7)
	Imipenem	12 (18,5)	39 (60)	14 (21,5)
	Meropenem	7 (10,8)	31 (47,7)	27 (41,5)
Cefalosporinas	Ceftiofur	37 (56,9)	21 (32,3)	7 (10,8)
	Ceftriaxona	35 (53,8)	20 (30,8)	10 (15,4)
Fluorquinolonas	Ciprofloxacino	30 (46,2)	22 (33,8)	13 (20,0)
	Enrofloxacino	33 (50,8)	31 (47,7)	1 (1,5)
	Levofloxacino	20 (30,8)	8 (12,3)	37 (56,9)
	Marbofloxacino	21 (32,3)	17 (26,2)	27 (41,5)
	Norfloxacino	20 (30,8)	15 (23,1)	30 (46,2)
Macrolídeos	Azitromicina	60 (92,3)	2 (3,1)	3 (4,6)
Rifamicinas	Rifampicina	65 (100)	-	-
Sulfonamidas	Sulfametoxazole/Trimetoprim	28 (43,1)	4 (6,2)	33 (50,8)
Tetraciclinas	Oxitetraciclina	28 (43,1)	9 (13,8)	28 (43,1)

N=número; %=porcentagem

Tabela 4 – Índice de resistência múltipla aos antimicrobianos em 65 linhagens de *K. pneumoniae* isoladas em cães e gatos. Botucatu, SP. 2017 - 2018.

Afecções	Cistite	Enterite	Otite	Pneumonia	Abscessos	Rinite	Prostatite	Diversos ¹	Total de isolados (%)
	N isolados (%)	N isolados (%)	N isolados (%)	N isolados (%)	N isolados (%)	N isolados (%)	N isolados (%)	N isolados (%)	
IRMA ≥ 0,3	22/53 (41,5)	13/53 (24,5)	4/53 (7,5)	3/53 (5,7)	1 /53(1,9)	4/53 (7,5)	2/53(3,8)	4/53 (7,5)	53 (81,5)
Cães	21/49 (42,8)	13/49 (26,5)	2/49 (4,1)	2/49 (4,1)	1/49 (2)	4/49 (8,2)	2/49(4,1)	4/49 (8,2)	49 (92,4)
Gatos	1/4(25)	-	2/4 (50)	1/4 (25)	-	-	-	-	4 (7,6)
IRMA ≤ 0,3	6/12 (50)	1/12 (8,3)	1/12 (8,3)	1/12 (8,3)	1/12 (8,3)	2/12 (16,8)	-	-	12(18,5)
Cães	5/9 (55,6)	1/9 (11,1)	-	1/9 (11,1)	-	2/9 (22,2)	-	-	9 (75)
Gatos	1/3 (33,3)	-	1/3 (33,3)	-	1/3 (33,3)	-	-	-	3 (25)
Total	28 (43,1)	14 (21,6)	5 (7,7)	4 (6,2)	2 (3)	6 (9,2)	2 (3)	4 (6,2)	65 (100)

¹Diversos = conjuntivite, osteomielite, pancreatite e septicemia

N=número; %=porcentagem; ≥=maior ou igual; ≤=menor ou igual

6.3 Identificação fenotípica de *K. pneumoniae* produtora de carbapenemases

Para os fármacos do grupo dos carbapenêmicos foram identificados, no teste de difusão com discos, 29,2% (19/65) isolados parcialmente sensíveis e 3,1% (2/65) resistentes ao ertapenem; 60% (39/65) parcialmente sensíveis e 18,5% (12/65) resistentes ao imipenem; e 47,7% (31/65) parcialmente sensíveis e 10,8% (7/65) resistentes ao meropenem (Tabela 3).

6.4 Perfil de resistência aos antimicrobianos

Foram observados 53 perfis de resistência nos isolados. Da totalidade de linhagens, 98,5% (64/65) apresentaram perfis de resistência a dois ou mais antimicrobianos. Do total de isolados 66,1% (43/65) apresentaram perfis de resistência a cinco ou mais antimicrobianos enquanto 49,2% (32/65) isolados apresentaram resistência a sete ou mais fármacos. Apenas um isolado foi resistente somente à rifampicina (1,5%). Os perfis mais comuns foram AZT/RIF (10/53=18,8%);

CTX/CFT/AMC/AZT/ENR/CIP/NOR/LEV/MAR/GEN/AMI/NEO/RIF/FLO/SUT/OXT (2/53=3,7%); CTXCFT/AZT/ENR/CIP/NOR/LEV/MAR/NEO/RIF/SUT (2/53=3,7%) e CFT/AZT/RIF (2/53=3,7%). Os demais perfis estão relacionados na Tabela 5.

Tabela 5 – Perfis de resistência aos antimicrobianos em 65 linhagens de *Klebsiella pneumoniae* isoladas de diferentes afecções em cães e gatos. Botucatu, SP, 2017 - 2018.

Perfis de resistência aos antimicrobianos	Nº de isolados
CTX/CFT/AMC/AZT/ENR/CIP/NOR/LEV/MAR/GEN/AMI/NEO/RIF/FLO/SUT/OXT	2
CTX/CFT/AMC/AZT/ENR/CIP/NOR/LEV/MAR/NEO/RIF/FLO/SUT/OXT/IMP/MER	1
CTX/CFT/AMC/AZT/ENR/CIP/NOR/LEV/MAR/GEN/NEO/RIF/FLO/SUT/OXT	1
CTX/CFT/AMC/AZT/ENR/CIP/NOR/LEV/MAR/AMI/NEO/RIF/SUT/OXT/IMP	1
CTX/CFT/AMC/AZT/ENR/CIP/NOR/LEV/MAR/AMI/NEO/RIF/SUT/OXT/MER	1
CTX/CFT/AMC/AZT/ENR/CIP/NOR/LEV/MAR/NEO/RIF/FLO/SUT/OXT	1
CTX/CFT/AMC/AZT/ENR/CIP/NOR/LEV/MAR/NEO/RIF/SUT/OXT/IMP	1
CTX/CFT/AZT/ENR/CIP/NOR/LEV/MAR/GEN/AMI/RIF/FLO/SUT/OXT	1
CTX/CFT/AMC/AZT/ENR/CIP/NOR/LEV/MAR/GEN/RIF/SUT	1
CTX/CFT/AMC/AZT/ENR/CIP/NOR/RIF/SUT/OXT/IMP/MER	1

CTX/CFT/AMC/AZT/ENR/CIP/AMI/RIF/SUT/OXT/IMP/MER	1
CTX/CFT/AMC/AZT/ENR/CIP/NEO/RIF/FLO/SUT/OXT	1
CTX/CFT/AMC/AZT/ENR/CIP/NOR/LEV/MAR/RIF/SUT	1
CTX/CFT/AMC/AZT/ENR/CIP/NOR/MAR/RIF/SUT/OXT	1
CTX/CFT/AMC/AZT/ENR/CIP/GEN/NEO/RIF/SUT/OXT	1
CTX/CFT/AMC/AZT/ENR/CIP/NEO/RIF/SUT/OXT/MER	1
CTX/CFT/AZT/ENR/CIP/NOR/LEV/MAR/NEO/RIF/SUT	2
CTX/CFT/AZT/ENR/CIP/NOR/LEV/MAR/RIF/FLO/SUT	1
CTX/CFT/AMC/AZT/ENR/MAR/NEO/RIF/SUT/OXT	1
CTX/CFT/AMC/AZT/ENR/AMI/NEO/RIF/OXT/IMP	1
CTX/CFT/AMC/AZT/ENR/CIP/NOR/RIF/IMP	1
CTX/CFT/AZT/ENR/CIP/NOR/LEV/RIF/OXT	1
CFT/AZT/ENR/CIP/LEV/GEN/RIF/SUT/IMP	1
CTX/CFT/AZT/ENR/CIP/NOR/LEV/RIF	1
CTX/CFT/AZT/GEN/AMI/RIF/SUT/OXT	1
CTX/CFT/AZT/ENR/CIP/GEN/AMI/RIF	1
CTX/AZT/CIP/LEV/RIF/SUT/OXT	1
CTX/AZT/NOR/MAR/NEO/RIF/OXT	1
CTX/CFT/AZT/ENR/CIP/LEV/RIF	1
CTX/AMC/ENR/CIP/AMI/RIF/IMP	1
CTX/CFT/AZT/CIP/RIF	1
AZT/MAR/RIF/SUT/OXT	1
AZT/ENR/GEN/RIF/OXT	1
ENR/MAR/NEO/RIF/OXT	1
CTX/CFT/AZT/RIF/SUT	1
AZT/CIP/MAR/RIF/OXT	1
LEV/MAR/AMI/NEO/RIF	1
AZT/RIF/FLO/ERT/IMP	1
AZT/GEN/AMI/RIF/IMP	1
AZT/RIF/OXT/IMP/MER	1
CTX/CFT/AZT/ENR/RIF	1
CTX/CFT/AZT/RIF	1
AZT/RIF/SUT/OXT	1
CFT/AZT/RIF/OXT	1
AMC/AZT/RIF/OXT	1
AZT/ENR/RIF/FLO	1
AZT/NEO/RIF	1
AZT/AMI/RIF	1
AZT/RIF/SUT	1
CFT/AZT/RIF	2
AZT/RIF	10
CTX/RIF	1
RIF	1

CTX= ceftriaxona, CFT= ceftiofur, AMC = amoxicilina/ácido clavulânico, AZT= azitromicina, ENR= enrofloxacino, CIP= ciprofloxacino, NOR= norfloxacino, LEV= levofloxacino; MAR= marbofloxacino, GEN= gentamicina, AMI= amicacina, NEO= neomicina; RIF= rifampicina, FLO=florfenicol; SUT= sulfametoxazole/trimetoprim, OXT= oxitetraciclina, ERT= ertapenem, IMP= imipenem; MER= meropenem

6.5 Genes associados à produção de carbapenemases

Dos três genes investigados nos 65 isolados de *K. pneumoniae* foram detectados 4,6% (3/65) isolados carreando o gene *bla_{NDM}* e 7,7% (5/65) o gene *bla_{OXA-48}*. Destes oito isolados com detecção molecular de genes associados à produção de carbapenemases todos apresentaram resultados parcialmente sensíveis - no teste de difusão com discos - a um os mais fármacos carbapenêmicos (ertapenem, meropenem e imipenem) e apenas um apresentou resistência ao imipenem.

Dos isolados positivos para o gene *bla_{NDM}*, o IRMA variou entre 0,1 e 0,7, enquanto para o gene *bla_{OXA-48}* o IRMA variou entre 0,4 e 0,9.

6.6 Análise Estatística

Não houve associação estatística ($p > 0,05$) entre a presença de *K. pneumoniae* e as diferentes afecções de cães e gatos, entre os perfis de sensibilidade/resistência “in vitro” dos isolados e a detecção dos genes *bla_{NDM}* e *bla_{OXA-48}* nos isolados pelo teste de Qui-quadrado ou (Exato de Fisher). Ainda, foi observada baixa concordância entre os resultados dos testes de sensibilidade aos carbapenêmicos e cepas NDM e OXA-48 positivas, segundo estimativas do coeficiente Kappa de concordância categórica (Tabela 6).

Tabela 6 – Estimativas do coeficiente de concordância Kappa entre resultados de sensibilidade de *K. pneumoniae* frente à carbapenêmicos e presença dos genes *bla*_{NDM} e *bla*_{OXA-48}.

Concordância	Kappa	IC95%
Imipenem x Ertapenem	0.180	0.024 a 0.336
Imipenem x Meropenem	0.284	0.067 a 0.503
Ertapenem x Meropenem	0.100	-0.111 a 0.311
Imipenem x gene <i>bla</i> _{OXA-48}	0.003	-0.070 a 0.075
Meropenem x gene <i>bla</i> _{OXA-48}	0.058	-0.053 a 0.160
Ertapenem x gene <i>bla</i> _{OXA-48}	0.110	-0.058 a 0.280
Imipenem x gene <i>bla</i> _{NDM}	0.026	-0.030 a 0.081
Meropenem x gene <i>bla</i> _{NDM}	0.013	-0.074 a 0.100
Ertapenem x gene <i>bla</i> _{NDM}	0.002	-0.137 a 0.143

IC 95%=limites do intervalo de confiança a 95%

7. DISCUSSÃO

No presente estudo foi identificada elevada multirresistência aos antimicrobianos em *K. pneumoniae* isoladas de diferentes manifestações clínicas em cães e gatos. Ainda, foram detectados, pela primeira vez no Brasil, os genes *bla_{NDM}* e *bla_{OXA-48}*, relacionados a produção de carbapenemases, em *K. pneumoniae* isoladas de afecções de cães. Tais achados reforçam a preocupação, de ordem mundial, de infecções causadas por bactérias multidroga resistentes, que representam grave problema em Saúde Pública e animal.

O desenvolvimento do estudo foi motivado pela escassez de pesquisas investigando infecções por *K. pneumoniae* em animais de companhia, bem como a ocorrência de resistência do patógeno aos antimicrobianos convencionais e a presença de genes relacionados com a produção de carbapenemases.

K. pneumoniae são bactérias oportunistas relacionadas com diferentes infecções clínicas em animais (QUINN et al., 2011; KOENIG, 2012; MOXLEY, 2013; DAVIS; PRICE, 2016). Em humanos, predominam em indivíduos hospitalizados ou com maior vulnerabilidade (WHO, 2014). No presente estudo foram isoladas 65 linhagens de *K. pneumoniae* de animais de companhia, com 89,2% de frequência de isolamento em afecções de cães e 10,8% em gatos; fato que pode ser considerado fator limitante do estudo devido ao maior número de cães amostrados.

Dos cães amostrados, predominaram as infecções do trato urinário (26/58= 44,8%). Estudos similares também têm relatado alta frequência de *K. pneumoniae* em infecções urinárias nesta espécie (SEGUIN et al., 2008; CARVALHO et al., 2014; PUNIA et al., 2018). A proximidade anatômica da região perineal com a genitália externa dos animais (especialmente as fêmeas) pode favorecer a ascensão de bactérias, por vezes oriundas da microbiota intestinal (BARSANTI, 2012), fato que poderia justificar a prevalência de infecções urinárias por *K. pneumoniae*.

Além de infecções do trato urinário, foram observadas nos cães e gatos amostrados outras manifestações clínicas por *K. pneumoniae* como enterite, otite, pneumonia, abscessos, rinite, prostatite, conjuntivite, osteomielite, pancreatite e septicemia. A miscelânea de infecções por *K. pneumoniae* em cães

e gatos reforça o comportamento oportunista do patógeno nos animais domésticos.

A presença do micro-organismo na microbiota intestinal de animais favorece a contaminação do ambiente de criação, bem como da água, alimentos e demais utensílios de uso comum (PODSCHUN; ULLMANN, 1998; MOXLEY, 2013). Essa dinâmica, aliada a presença de certos fatores de virulência do patógeno como cápsula, endotoxina, fímbrias, adesinas e invasinas (MAATALLAH et al., 2014) e deficiências nos mecanismos de defesa do hospedeiro favorecem infecções em diferentes órgãos ou tecidos, tanto de cães e gatos (QUINN et al., 2011; KOENIG, 2012; MOXLEY, 2013), como de humanos (BRISSE; PASSET; GRIMONT, 2014; BROBERG; PALACIOS; MILLER, 2014).

Diferentes antimicrobianos são utilizados com frequência no tratamento de animais domésticos. Ao contrário da medicina humana, não há necessidade de prescrição médica veterinária para aquisição de antimicrobianos comerciais para uso em animais, particularmente animais de companhia. Muitos desses fármacos, inclusive, são de importância para o tratamento de infecções em humanos (GUARDABASSI; SCHWARZ; LLOYD, 2004; LLOYD, 2007). No entanto, o uso não racional ou indevido de antimicrobianos, por vezes sem respaldo de testes “in vitro” de sensibilidade, pode aumentar a pressão seletiva para bactérias resistentes (GUIGÈRE et al., 2010).

No presente estudo, a eficácia “in vitro” $\geq 50\%$ dos antimicrobianos nos 65 isolados de *K. pneumoniae* foi observada somente para ertapenem (67,7%), florfenicol (61,5%), levofloxacino (56,9%) e sulfametoxazole/trimetoprim (50,8%). Embora os carbapenêmicos sejam a classe de antimicrobianos recomendada para o tratamento de infecções por micro-organismos multidroga resistentes em humanos, seu uso em medicina veterinária ainda é restrito (SMITH et al., 2019), fato que poderia justificar a maior efetividade “in vitro” desse fármaco nos isolados. Nesse mesmo contexto, a alta eficácia do florfenicol provavelmente possa ser atribuída às poucas apresentações comerciais desse antimicrobiano para uso em pequenos animais (MAALAND et al., 2015), limitadas somente a formulações otológicas (EHLING; BAYNES; BÄUMER, 2018; KING et al., 2018).

As fluorquinolonas são grupo de antimicrobianos de uso frequente em afecções de cães e gatos (ANDRADE; GIUFFRIDA, 2008; PAPICH, 2013). O

levofloxacino é uma fluorquinolona introduzida recentemente como opção terapêutica em cães e gatos, geralmente reservada para casos refratários aos fármacos convencionais, fato que poderia explicar a sua eficácia nos isolados do presente estudo.

As sulfonamidas foram exaustivamente utilizadas há mais de três décadas, tanto em humanos quanto animais (ANDRADE; GIUFFRIDA, 2008). A relativa eficácia “in vitro” do sulfatoxazole/trimetoprim nos isolados de *K. pneumoniae* obtidos nos animais amostrados, pode encontrar justificativa na pressão de seleção para bactérias resistentes exercida pelo uso contínuo, que pode ter restringido a eficácia do fármaco ao longo dos anos (GUIGÈRE et al., 2010).

A prevalência de bactérias resistentes a múltiplos antimicrobianos constitui preocupação emergente, de ordem mundial, em saúde humana e animal. Bactérias multidroga resistentes estão relacionadas com ocorrência de alta morbimortalidade (WHO, 2014; LOGAN; WEINSTEIN, 2017). Nos 65 isolados de *K. pneumoniae* foi observada elevada resistência aos antimicrobianos, principalmente para rifampicina (100,0%), azitromicina (92,3%), ceftiofur (56,9%), ceftriaxona (53,8%) e enrofloxacino (50,8%). A resistência dos isolados à azitromicina, às cefalosporinas e ao enrofloxacino pode estar relacionada com a ampla utilização desses fármacos em medicina veterinária, especialmente em infecções do trato urinário (GUARDABASSI; SCHWARZ; LLOYD, 2004; PAPICH, 2013). Todos os isolados foram resistentes à rifampicina. Em virtude da ação intracelular, a rifampicina é indicada no tratamento de infecções granulomatosas e piogranulomatosas por *Mycobacterium* spp. e *Rhodococcus equi*, respectivamente, em humanos e animais (PAPICH, 2013; PAES; FRANCO, 2016; RIBEIRO; VARGAS, 2016). Paralelamente, estudos recentes observaram atividade sinérgica da rifampicina com carbapenêmicos, incluindo para bactérias gram-negativas produtoras de carbapenemases (DIEP et al., 2017; FREDBORG; SONDERGAARD; WANG, 2017; PEREZ et al., 2019); embora, no presente estudo foi identificada ineficácia do fármaco em isolados de *K. pneumoniae* obtidos de cães e gatos com diferentes manifestações clínicas.

O cálculo do IRMA revelou que 81,4% (53/65) dos isolados foram fenotipicamente multirresistentes. A maior frequência de multirresistência foi

identificada em isolados obtidos de cistite (22/53=41,5%). De modo similar, Ishii et al. (2011), no Brasil, também observaram multirresistência aos antimicrobianos em bactérias gram-negativas isoladas de infecções urinárias de cães e gatos. Os resultados do IRMA reforçam a característica de resistência múltipla de *K. pneumoniae* aos antimicrobianos e os riscos de disseminação de genes de resistência entre bactérias da mesma espécie ou até de gêneros diferentes (CHUNG THE et al., 2015).

Os fármacos do grupo dos carbapenêmicos foram considerados eficazes, por décadas, no tratamento de infecções por enterobactérias multirresistentes em humanos (SMITH et al., 2019; HAMZA; DORGHAM; HAMZA, 2016), uma vez que a presença de micro-organismos produtores de carbapenemases era rara (TÄNGDÉN; GISKE, 2015). Na última década, a Organização Mundial da Saúde (OMS) considerou os carbapenêmicos como antimicrobianos criticamente importantes em medicina humana. O uso desses fármacos é reservado para casos em que não há outra opção de tratamento e em infecções por bactérias que possam ser transmitidas aos humanos (por fontes não humanas), ou mesmo que possam adquirir genes de resistência de animais (WHO, 2016). Porém, é crescente o número de bactérias multirresistentes e produtoras de carbapenemases (WOODFORD et al., 2014), particularmente *K. pneumoniae*, relacionadas com alta mortalidade em humanos (MUÑOZ-PRICE et al., 2013; NORDMANN, 2014). Em contraste, estudos com bactérias produtoras de carbapenemases em animais domésticos são escassos, bem como a epidemiologia das infecções pouco esclarecida (WOODFORD et al., 2014; GONZÁLEZ-TORRALBA et al., 2016).

No presente estudo, a identificação fenotípica de *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemases (método de difusão com discos) com ertapenem, imipenem e meropenem identificou 29,2% (19/65) dos isolados parcialmente sensíveis e 3,1% (2/65) resistentes ao ertapenem; 60% (39/65) parcialmente sensíveis e 18,5% (12/65) resistentes ao imipenem; e 47,7% (31/65) parcialmente sensíveis e 10,8% (7/65) resistentes ao meropenem. Digno de nota que, os fármacos supracitados, não são de uso comum, no Brasil, no tratamento de infecções bacterianas em animais, incluindo cães e gatos (OLIVEIRA et al., 2006). Em contraste, Smith et al. (2019), nos EUA, realizaram estudo retrospectivo com intuito de avaliar a efetividade “in vitro” dos

carbapenêmicos em isolados bacterianos de afecções de cães e gatos. Neste estudo, não foi identificada nenhuma enterobactéria resistente aos carbapenêmicos, bem como observaram alta sobrevida nos animais tratados com esses fármacos. No entanto, a restrição recente desse grupamento de antimicrobianos no tratamento de infecções críticas em humanos, existe limitação na recomendação dos carbapenêmicos para uso em animais (WOODFORD et al., 2014; SMITH et al., 2019).

A detecção molecular pela PCR identificou nos animais amostrados 4,6% (3/65) isolados carreando o gene *bla_{NDM}* e 7,7% (5/65) *bla_{OXA-48}*. Destes oito isolados de *K. pneumoniae*, todos apresentaram resultados parcialmente sensíveis a um ou mais fármacos carbapenêmicos no teste de difusão com discos e apenas um isolado foi resistente ao imipenem. Ainda, foi observada baixa concordância entre o teste fenotípico e a detecção molecular dos genes relacionados à produção de carbapenemases nos isolados dos cães e gatos amostrados. Embora os métodos fenotípicos sejam aceitáveis para o diagnóstico de rotina, muitos isolados produtores de carbapenemases podem ser identificados como sensíveis aos carbapenêmicos, embora apresentem genes de resistência a essa classe de antimicrobianos (SINGH-MOODLEY; PEROVIC, 2018). Assim, a disparidade entre a detecção molecular dos genes *bla_{NDM}* e *bla_{OXA-48}* e os resultados do teste fenotípico de difusão com discos pode ser creditada à presença de *K. pneumoniae* que alberguem o gene de resistência, sem expressá-lo (MUNITA; ARIAS, 2016). Ainda, é possível que outros mecanismos de resistência aos antimicrobianos possam estar envolvidos (PODSCHUN; ULLMANN, 1998; GUPTA et al., 2003; MAATALLAH et al., 2014; DOORDUIJN et al., 2016; MUNITA; ARIAS, 2016; PACZOSA; MECSAS, 2016) ou mesmo outros genes-alvo não investigados no presente estudo.

Os genes *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}* e *bla_{OXA-48}* têm sido identificados em vários países em linhagens de *K. pneumoniae* e em outras enterobactérias isoladas de infecções em humanos (YIGIT et al., 2001; POIREL et al., 2004, 2011; POIREL; KUMARASAMY et al., 2010; POTRON; NORDMANN, 2012). No entanto, somente três estudos investigaram a presença de genes relacionados com a produção de carbapenemases em *K. pneumoniae* provenientes de cães e gatos. Stolle et al. (2013), na Alemanha, detectaram em espécimes clínicos de cães cinco linhagens de *K. pneumoniae* e três *E. coli* carreando o gene *bla_{OXA-48}*.

Pulss et al. (2018), também na Alemanha identificaram o gene *bla*_{OXA-48} em *K. pneumoniae* isoladas de cães (77/329=23,4%) e gatos (5/44=11,4%). González-Torralba et al. (2016), na Espanha, se propuseram a investigar os genes *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP} e *bla*_{OXA-48} em *K. pneumoniae* isoladas de cães e identificaram apenas um (1/160=0,6%) isolado positivo para o gene *bla*_{VIM}. Dentre a literatura consultada, o presente estudo descreve pela primeira vez a presença do gene *bla*_{NDM} em cães, utilizando método molecular no diagnóstico.

Os achados do presente estudo salientam para a necessidade de uso racional dos antimicrobianos no tratamento de afecções de cães e gatos, preferencialmente com respaldo de testes “in vitro” de sensibilidade, evitando o aumento da pressão seletiva para bactérias multirresistentes (WEESE et al., 2015; GUARDABASSI; SCHWARZ; LLOYD, 2004), incluindo *K. pneumoniae*. Ressalta-se, também, a necessidade de maior atenção à vigilância epidemiológica mundial de enterobactérias produtoras de carbapenemases em animais, especialmente cães e gatos, uma vez que o contato cada vez mais estreito dessas espécies com os humanos pode favorecer a transmissão de bactérias multirresistentes (GUARDABASSI; SCHWARZ; LLOYD, 2004; STOLLE et al., 2013; ABRAHAM et al., 2014; GONZÁLEZ-TORRALBA et al., 2016; PULSS et al., 2018), particularmente do grupo dos carbapenêmicos, de uso crítico em humanos.

8. CONCLUSÕES

- ✓ O isolamento de *K. pneumoniae* em diferentes afecções clínicas em cães e gatos reforça o comportamento oportunista do patógeno, apesar da maior frequência nas cistites em cães;
- ✓ O elevado índice de resistência múltipla aos antimicrobianos nos isolados, bem como a grande variedade dos perfis de resistência, salienta a importância de instituir os tratamentos em cães e gatos infectados por *K. pneumoniae* com respaldo em testes “in vitro” de sensibilidade aos antimicrobianos;
- ✓ A detecção molecular dos genes *bla_{NDM}* e *bla_{OXA-48}* nos isolados de *K. pneumoniae*, ainda que em baixa concordância com o teste fenotípico “in vitro”, evidencia a necessidade de maior atenção à produção de carbapenemases por bactérias de cães e gatos; devido ao aumento mundial da população de animais de companhia e ao estreito contato com humanos, que pode favorecer a transmissão de patógenos multirresistentes.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ABRAHAM, S.; WONG, H. S.; TURNIDGE, J.; JOHNSON, J. R.; TROTT, D. J. Carbapenemase-producing bacteria in companion animals: a public health concern on the horizon. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, n. 69, p. 1155-1157, jan. 2014.

ADLER, K.; RADELOFF, I.; STEPHAN, B.; GREIFE, H.; HELLMANN, K. Bacteriological and virological status in upper respiratory tract infections of cats (cat commum complex). *Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift*, v. 120, n.3-4, p.120-125, mar/abr. 2007.

AMBLER, R. P. The structure of beta-lactamases. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences Royal Society*, v. 289, n.1026, p. 321-331, maio 1980.

ANDRADE, S. F.; GIUFFRIDA, R. Quimioterápicos antimicrobianos e antibióticos. In: ANDRADE, S. F. *Manual de Terapêutica Veterinária*, 3ed. São Paulo: Roca, 2008, cap.3, p.26-72.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. In: *Boletim de Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde*, Brasília, dez. 2013a. 83p.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. In: *Nota Técnica Nº 01/2013 Medidas de Prevenção e Controle de Infecções por Enterobactérias Multirresistentes*, Brasília, abr. 2013b. 22p.

ARANA, D. M.; RUBIO, M.; ALÓS, J. I. Evolution of antibiotic multiresistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from urinary tract infections: A 12-year analysis (2003–2014). *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, v. 35, n. 5, p. 293–298, 2017.

BACHMAN, M. A.; BREEN, P.; DEORNELLAS, V.; MU, Q.; ZHAO, L.; WU, W.; CAVALCOLI, J. D; MOBLEY, H. L. T. Genome-Wide Identification of *Klebsiella pneumoniae* Fitness Genes during Lung Infection. *mBio*, v. 6, n. 3, p. 1–9, 2015.

BARANIAK, A.; IZDEBSKI, R.; HERDA, M.; FIETT, J.; HRYNIEWICZ, W.; GNIADKOWSKI, M.; KERN-ZDANOWICZ, I.; FILCZAK, K.; LOPACIUK, U. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* ST258 with KPC-2 in Poland. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 53, n. 10, p. 4565–4567, 2009.

*Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT 6023

BARSANTI, J. A. Genitourinary Infections. In: GREENE, C.E. *Infectious Diseases of the dog and cat*. 4 ed. St. Louis: Elsevier Saunders, 2012, cap. 90, p.1013-1044.

BHUVANESHWARI, G. Multiple Antibiotic Resistance Indexing of Non-Fermenting Gram Negative Bacilli. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, v. 10, n. 6, p. 78, 2017.

BIDEWELL, C. A.; WILLIAMSON, S. M.; ROGERS, J.; TANG, Y.; ELLIS, R. J.; PETROVSKA, L.; ABUOUN, M. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* subspecies *pneumoniae* as a cause of septicaemia in pigs in England. *PLoS ONE*, v. 13, n. 2, p. 1–18, 2018.

BLAIR, J. M. A.; WEBBER, M. A.; BAYLAY, A. J.; OGBOLU, D. O.; PIDDOCK, L. J. V. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology*, v. 13, n. 1, p. 42–51, 2015.

BLANCO, M.; BLANCO, J.E.; ALONSO, M.P.; MORA, A.; BALSALOBRE, C.; MUNOA, F.; JUAREZ, A.; BLANCO, J. Detection of *pap*, *sfa* and *afa* adhesinencoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains: relationship with expression of adhesions and production of toxins. *Research in Microbiology*, v.148, n.9, p.745-55, 1997.

BOWLT, K. L.; BORTOLAMI, E.; HARLEY, R.; MURISON, P.; WALLACE, A. Ischaemic distal limb necrosis and *Klebsiella pneumoniae* infection associated with arterial catheterisation in a cat. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, v. 15, n. 12, p. 1165–1168, 2013.

BOWRING, B. G.; FAHY, V. A.; MORRIS, A.; COLLINS, A. M. An unusual culprit: *Klebsiella pneumoniae* causing septicaemia outbreaks in neonatal pigs? *Veterinary Microbiology*, v. 203, p. 267–270, 2017.

BRATU, S.; MOOTY, M.; NICHANI, S.; LANDMAN, D.; GULLANS, C.; PETTINATO, B.; KARUMUDI, U.; TOLANEY, P.; QUALE, J. Emergence of KPC-possessing *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, New York: epidemiology and recommendations for detection. *Society*, v. 49, n. 7, p. 3018–3020, 2005.

BRISSE, S.; PASSET, V.; GRIMONT, P. A. D. Description of *Klebsiella quasipneumoniae* sp. nov., isolated from human infections, with two subspecies, *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae* subsp. nov. and *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* subsp. nov., and demonstration that *Klebsiella singaporensis* is a junior heterotypic synonym of *Klebsiella variicola*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 64, n. 2014, p. 3146–3152, 2014.

BRISSE, S.; VAN DUIJKEREN, E. Identification and antimicrobial susceptibility of 100 *Klebsiella* animal clinical isolates. *Veterinary Microbiology*, v. 105, n. 3–4, p. 307–312, 2005.

BRIZENDINE, K. D.; RICHTER, S. S.; COBER, E. D.; VAN DUIN, D. Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* urinary tract infection following solid organ transplantation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 59, n. 1, p. 553–557, 2015.

BROBERG, C. A.; PALACIOS, M.; MILLER, V. L. *Klebsiella*: a long way to go towards understanding this enigmatic jet-setter. *F1000Prime Reports*, v. 6, n. 64, 2014.

BUSH, K.; JACOBY, G. A. Updated functional classification of β -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 54, n. 3, p. 969–976, 2010.

CABRERA, C. E.; GÓMEZ, R. F.; ZÚÑIGA, A. D. La resistência de bactérias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes uma manifestación de los mecanismos de supervivência e adaptación. *Colombia Médica*, v. 38, p.149-158, 2007.

CARBONNE, A.; THIOLET, J. M.; FOURNIER, S.; FORTINEAU, N.; KASSIS-CHIKHANI, N.; BOYTCHEV, I.; AGGOUNE, M.; SÉGUIER, J. C.; SÉNÉCHAL, H.; TAVOLACCI, M. P.; COIGNARD, B.; ASTAGNEAU, P.; JARLIER, V. Control of a multi-hospital outbreak of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* type 2 in France, September to October 2009. *Eurosurveillance*, v. 15, n. 48, p. 4–9, 2010.

CARVALHO, V. M.; SPINOLA, T.; TAVOLARI, F.; IRINO, K.; OLIVEIRA, R. M.; RAMOS, M. C. C. Infecções do trato urinário (ITU) de cães e gatos: Etiologia e resistência aos antimicrobianos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 34, n. 1, p. 62–70, 2014.

CHANG, H.-H.; COHEN, T.; GRAD, Y. H.; HANAGE, W. P.; O'BRIEN, T. F.; LIPSITCH, M. Origin and Proliferation of Multiple-Drug Resistance in Bacterial Pathogens. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 79, n. 1, p. 101–116, 2015.

CHANG, F. Y.; CHOU, M.Y. Comparison of pyogenic liver abscesses caused by *Klebsiella pneumoniae* and non-K. *pneumonia* pathogens. *Journal of the Formosan Medical Association*, v.94, n.5, p.232-237, maio 1995.

CHITANAND, M. P.; KADAM, T. A.; GYANANATH, G.; TOTEWAD, N. D.; BALHAL, D. K. Multiple antibiotic resistance indexing of coliforms to identify high risk contamination sites in aquatic environment. *Indian Journal of Microbiology*, v. 50, n. 2, p. 216–220, 2010.

CHUNG, P. Y. The emerging problems of *Klebsiella pneumoniae* infections: Carbapenem resistance and biofilm formation. *FEMS Microbiology Letters*, v. 363, n. 20, p. 1–6, 2016.

CHUNG THE, H.; KARKEY, A.; PHAM THANH, D.; BOINETT, C. J.; CAIN, A. K.; ELLINGTON, M.; BAKER, K. S.; DONGOL, S.; THOMPSON, C.; HARRIS, S. R.; JOMBART, T.; LE THI PHUONG, T.; TRAN DO HOANG, N.; HA THANH, T.; SHRETHA, S.; JOSHI, S.; BASNYAT, B.; THWAITES, G.; THOMSON, N. R.; RABAA, M. A.; BAKER, S. A high-resolution genomic analysis of multidrug-resistant hospital outbreaks of *Klebsiella pneumoniae*. *EMBO Molecular Medicine*, v. 7, n. 3, p. 227–239, 2015.

CLEGG, S.; MURPHY, C. N. Epidemiology and Virulence of *Klebsiella pneumoniae*, v. 4, n. 1, fev 2016.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. In: *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. 26th ed. CLSI supplement M100S. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2016.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. In: *Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals*. 3rd ed. CLSI supplement VET01S. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015.

CONSTABLE, P. D.; HINCHCLIFF, K. W.; DONE, S. H.; GRÜNBERG, W. *Veterinary Medicine: A Textbook of the Diseases of Cattle, Horses, Sheep, Pigs and Goats*, 11 ed. St.Louis: Elsevier Ltd., 2017, 2 vol.

CUZON, G.; NAAS, T.; DEMACHY, M. C.; NORDMANN, P. Plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing β -lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolate from Greece. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 52, n. 2, p. 796–797, fev. 2008.

DAIKOS, G. L.; TSAOUSI, S.; TZOUVELEKIS, L. S.; ANYFANTIS, I.; PSICHOGIOU, M.; ARGYROPOULOU, A.; STEFANOU, I.; SYPSA, V.; MIRIAGOU, V.; NEPKA, M.; GEORGIADOU, S.; MARKOGIANNAKIS, A.; GOUKOS, D.; SKOUTELIS, A. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections: lowering mortality by antibiotic combination schemes and the role of carbapenems. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 58, n. 4, p. 2322–2328, Abr. 2014.

DANIELS, J. B.; CHEN, L.; GROOTERS, S. V.; MOLLENKOPF, D. F.; MATHYS, D. A.; PANCHOLI, P.; KREISWIRTH, B. N.; WITTUM, T. E. *Enterobacter cloacae* complex ST-171 isolates expressing KPC-4 carbapenemase recovered from canine patients in Ohio, USA. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, set. 2018.

DAVIS, G. S.; PRICE, L. B. Recent research examining links among *Klebsiella pneumoniae* from food, food animals, and human extraintestinal infections. *Current Environmental Health Reports*, v. 3, n. 2, p. 128–135, 2016.

DAVIS, R.; BROWN, P. D. Multiple antibiotic resistance index, fitness and virulence potential in respiratory *Pseudomonas aeruginosa* from Jamaica. *Journal of Medical Microbiology*, v. 65, n. 4, p. 261–271, mar. 2016.

DEAN, A. G.; SULLIVAN, K. M.; SOE, M. M. OpenEpi: Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health, Versão 3.03. 2017. Disponível em <www.OpenEpi.com> Acesso em: 20 set 2017.

DIENSTMANN, R.; PICOLI, S. U.; MEYER, G.; SCHENKEL, T.; STEYER, J. Phenotypic research on *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) enzyme in *Enterobacteriaceae* from hospitals. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 46, n. 1, p. 23–27, 2010.

DIEP, J. K.; JACOBS, D. M.; SHARMA, R.; COVELLI, J.; BOWERS, D. R.; RUSSO, T. A.; RAO, G. G. Polymyxin B in Combination with Rifampin and Meropenem against PolymyxinB-resistant KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 61, n. 2, p. 1–15, 2017.

DONATI, V.; FELTRIN, F.; HENDRIKSEN, R. S.; SVENDSEN, C. A.; CORDARO, G.; GARCÍA-FERNÁNDEZ, A.; LORENZETTI, S.; LORENZETTI, R.; BATTISTI, A.; FRANCO, A. Extended-spectrum-beta-lactamases, AmpC beta-lactamases and plasmid mediated quinolone resistance in *Klebsiella* spp. from companion animals in Italy. *PLoS ONE*, v. 9, n. 3, p. 1–7, 2014.

DONG, N.; YANG, X.; ZHANG, R.; CHAN, E. W. C.; CHEN, S. Tracking microevolution events among ST11 carbapenemase-producing hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* outbreak strains. *Emerging Microbes and Infections*, v. 7, n. 1, p. 4–11, 2018.

DOORDUIJN, D. J.; ROOIJAKKERS, S. H. M.; VAN SCHAİK, W.; BARDOEL, B. W. Complement resistance mechanisms of *Klebsiella pneumoniae*. *Immunobiology*, v. 221, n. 10, p. 1102–1109, jun. 2016.

DRANCOURT, M.; BOLLET, C.; CARTA, A.; ROUSSELIER, P. Phylogenetic analyses of *Klebsiella* species delineate *Klebsiella* and *Raoultella* gen. nov., with description of *Raoultella ornithinolytica* comb. nov., *Raoultella terrigena* comb. nov. and *Raoultella planticola* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 51, n. 3, p. 925–932, 2001.

EHLING, S.; BAYNES, R. E.; BÄUMER, W. Impact of synthetic canine cerumen on in vitro penetration of auricular skin of dogs by florfenicol, terbinafine, and betamethasone acetate. *American Journal of Veterinary Research*, v. 79, n. 3, p. 333–341, 2018.

ESCH, K. J.; PETERSEN, C. A. Transmission and epidemiology of zoonotic protozoal diseases of companion animals. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 26, n. 1, p. 58–85, 2013.

EL FERTAS-AISSANI, R.; MESSAI, Y.; ALOUACHE, S.; BAKOUR, R. Virulence profiles and antibiotic susceptibility patterns of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from different clinical specimens. *Pathologie Biologie*, v. 61, n. 5, p. 209–216, 2013.

ESPINAR, M. J.; MIRANDA, I. M.; COSTA-DE-OLIVEIRA, S.; ROCHA, R.; RODRIGUES, A. G.; PINA-VAZ, C. Urinary tract infections in kidney transplant patients due to *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*-producing extended-spectrum β -lactamases: risk factors and molecular epidemiology. *PLoS ONE*, v. 10, n. 8, p. 1–11, Ago. 2015.

ESTELL, K. E.; YOUNG, A.; KOZIKOWSKI, T.; SWAIN, E. A.; BYRNE, B. A.; REILLY, C. M.; KASS, P. H.; ALEMAN, M. Pneumonia Caused by *Klebsiella* spp. in 46 Horses. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 30, n. 1, p. 314–321, 2016.

FERNÁNDEZ, J.; GUERRA, B.; RODICIO, M. Resistance to carbapenems in non-typhoidal *Salmonella enterica* serovars from humans, animals and food. *Veterinary Sciences*, v. 5, n. 2, p. 40, 2018.

FORTALEZA, C. M. C. B.; CALDEIRA, S. M.; MOREIRA, R. G.; AKAZAWA, R. T.; CORRENTE, J. E.; SOUZA, L. do R. de; CUNHA, A. R. da. Tropical Healthcare Epidemiology: Weather Determinants of the Etiology of Bloodstream Infections in a Brazilian Hospital. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, v. 35, n. 1, p. 85–88, 2014.

FREDBORG, M.; SONDERGAARD, T. E.; WANG, M. Synergistic activities of meropenem double and triple combinations against carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 88, n. 4, p. 355–360, 2017.

GHANTOUS, S. N.; CRAWFORD, J. Double ureters with ureteral ectopia in a domestic shorthair cat. *The Journal of the American Animal Hospital Association*, v.42, n.6, p.462-466, nov./dez. 2006.

GIAKOUPIS, P.; MALTEZOU, H.; POLEMIS, M.; PAPPA, O.; SAROGLU, G.; VATOPOULOS, A. KPC-2- producing *Klebsiella pneumoniae* infectious in Greek hospitals are mainly due to a hyperepidemic clone. *Eurosurveillance*, v. 14, n. 21, p. 1–5, maio 2009.

GIANI, T.; D'ANDREA, M. M.; PECILE, P.; BORGIANNI, L.; NICOLETTI, P.; TONELLI, F.; BARTOLONI, A.; ROSSOLINI, G. M. Emergence in Italy of *Klebsiella pneumoniae* sequence type 258 producing KPC-3 carbapenemase. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 47, n. 11, p. 3793–3794, 2009.

GIGUÈRE, S.; BAGGOT, J. D.; WALKER, R. D.; PRESCOTT, J. E.; DOWLING, P. M. *Terapia antimicrobiana em medicina veterinária*. São Paulo: Roca, 2010. 683 p.

GIRARDINI, L. K.; GRESSLER, L. T.; COSTA, M. M. Da; BOTTON, S. D. A.; PAYÃO PELLEGRINI, D. D. C.; VARGAS, A. C. De. Perfil de suscetibilidade antimicrobiana e presença do gene *vapA* em *Rhodococcus equi* de origem humana, ambiental e equina. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 33, n. 6, p. 735–740, 2013.

GONZÁLEZ-TORRALBA, A.; OTEO, J.; ASENJO, A.; BAUTISTA, V.; FUENTES, E.; ALÓS, J. I. Survey of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in companion dogs in Madrid, Spain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 60, n. 4, p. 2499–2501, jan. 2016.

GORRIE, C. L.; MIRC ETA, M.; WICK, R. R.; EDWARDS, D. J.; THOMSON, N. R.; STRUGNELL, R. A.; PRATT, N. F.; GARLICK, J. S.; WATSON, K. M.; PILCHER, D. V.; MCGLOUGHLIN, S. A.; SPELMAN, D. W.; JENNEY, A. W. J.; HOLT, K. E. Gastrointestinal carriage is a major reservoir of *Klebsiella pneumoniae* infection in intensive care patients. *Clinical Infectious Diseases*, v. 65, n. 2, p. 208–215, mar. 2017.

GRÖHN, Y. T.; GONZÁLEZ, R. N.; WILSON, D. J.; HERTL, J. A.; BENNETT, G.; SCHULTE, H.; SCHUKKEN, Y. H. Effect of pathogen-specific clinical mastitis on herd life in two New York State dairy herds. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 71, n. 1–2, p. 105–125, jun. 2005.

GUARDABASSI, L.; SCHWARZ, S.; LLOYD, D. H. Pet animals as reservoirs of antimicrobial-resistant bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 54, n. 2, p. 321–332, jul. 2004.

GUERRA, B.; FISCHER, J.; HELMUTH, R. An emerging public health problem: acquired carbapenemase-producing microorganisms are present in food-producing animals, their environment, companion animals and wild birds. *Veterinary Microbiology*, v. 171, n. 3–4, p. 290–297, 2014.

GUO, S.; XU, J. J.; WEI, Y. S.; XU, J. H.; LI, Y.; XUE, R. Clinical and molecular characteristics of *Klebsiella pneumoniae* ventilator-associated pneumonia in mainland China. *BMC Infectious Diseases*, v. 16, n. 608, p. 1–7, 2016.

GUPTA, A.; AMPOFO, K.; RUBENSTEIN, D.; SAIMAN, L. Extended spectrum β lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* infections: a review of the literature. *Journal of Perinatology*, v. 23, n. 6, p. 439–443, 2003.

HAMZA, E.; DORGHAM, S. M.; HAMZA, D. A. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in broiler poultry farming in Egypt. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, v. 7, p. 8–10, jul. 2016.

HARADA, K.; SHIMIZU, T.; MUKAI, Y.; KUWAJIMA, K.; SATO, T.; USUI, M.; TAMURA, Y.; KIMURA, Y.; MIYAMOTO, T.; TSUYUKI, Y.; OHKI, A.; KATAOKA, Y. Phenotypic and molecular characterization of antimicrobial resistance in *Klebsiella* spp. isolates from companion animals in Japan: clonal dissemination of multidrug-resistant extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Frontiers in Microbiology*, v. 7, p. 1–12, jun. 2016.

HAZEN, T. H.; ZHAO, L.; SAHL, J. W.; ROBINSON, G.; HARRIS, A. D.; RASKO, D. A.; JOHNSON, J. K. Characterization of *Klebsiella* sp. strain 10982, a colonizer of humans that contains novel antibiotic resistance alleles and exhibits genetic similarities to plant and clinical *Klebsiella* isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 58, n. 4, p. 1879–1888, jan. 2014.

HOLT, K. E.; WERTHEIM, H.; ZADOKS, R. N.; BAKER, S.; WHITEHOUSE, C. A.; DANCE, D.; JENNEY, A.; CONNOR, T. R.; HSU, L. Y.; SEVERIN, J.; BRISSE, S.; CAO, H.; WILKSCH, J.; GORRIE, C.; SCHULTZ, M. B.; EDWARDS, D. J.; NGUYEN, K. Van; NGUYEN, T. V.; DAO, T. T.; MENSINK, M.; MINH, V. Le; NHU, N. T. K.; SCHULTSZ, C.; KUNTAMAN, K.; NEWTON, P. N.; MOORE, C. E.; STRUGNELL, R. A.; THOMSON, N. R. Genomic analysis of diversity, population structure, virulence, and antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae*, an urgent threat to public health. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 112, n. 27, p. E3574–E3581, jun. 2015.

HOU, X. H.; SONG, X. Y.; MA, X. B.; ZHANG, S. Y.; ZHANG, J. Q. Molecular characterization of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 46, n. 3, p. 759–768, 2015.

IACOVELLI, V.; GAZIEV, G.; TOPAZIO, L.; BOVE, P.; VESPASIANI, G.; FINAZZI AGRÒ, E. Nosocomial urinary tract infections: a review. *Urologia*, v.81, n.4, p.222-227, out. 2014.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. *Pesquisa Nacional de Saúde 2013*. Rio de Janeiro Brasil, 2015.

KAHAN, J. S.; KAHAN, F. M.; GOEGELMAN, R.; CURRIE, S. A.; JACKSON, M.; STAPLEY, E. O.; MILLER, T. W.; MILLER, A. K.; HENDLIN, D.; MOCHALES, S.; HERNANDEZ, S.; WOODRUFF, H. B.; BIRNBAUM, J. Thienamycin, a new beta-lactam antibiotic. *The Journal of Antibiotics*, v. 32, n. 1, p. 1–11, jan. 1979.

KANWAR, A.; MARSHALL, S. H.; PEREZ, F.; TOMAS, M.; JACOBS, M. R.; HUJER, A. M.; DOMITROVIC, T. N.; RUDIN, S. D.; ROJAS, L. J.; KREISWIRTH, B. N.; CHEN, L.; QUINONES-MATEU, M.; VAN DUIN, D.; BONOMO, R. A. Emergence of resistance to colistin during the treatment of bloodstream infection caused by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Open Forum Infectious Diseases*, v. 5, n. 4, p. 1–3, abr. 2018.

KING, S. B.; DOUCETTE, K. P.; SEEWALD, W.; FORSTER, S. L. A randomized, controlled, single-blinded, multicenter evaluation of the efficacy and safety of a once weekly two dose otic gel containing florfenicol, terbinafine and betamethasone administered for the treatment of canine otitis externa. *BMC Veterinary Research*, v.14, n. 307, p. 1-9, 2018.

KOENIG, A. Gram-negative bacterial infetions. In: GREENE, C.E. *Infectious Diseases of the dog and cat*. 4 ed. St. Louis: Elsevier Saunders, 2012, cap. 35, p.349-358.

KRIEG, N. R.; HOLT, J. C. *Bergey's manual of sistematic bacteriology*. 9.ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. 984 p.

KRUMPERMAN, P. H. Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods. *Applied and environmental microbiology*, v. 46, n. 1, p. 165–170, abr. 1983.

KUMARASAMY, K. K.; TOLEMAN, M. A.; WALSH, T. R.; BAGARIA, J.; BUTT, F.; BALAKRISHNAN, R.; CHAUDHARY, U.; DOUMITH, M.; GISKE, C. G.; IRFAN, S.; KRISHNAN, P.; KUMAR, A. V.; MAHARJAN, S.; MUSHTAQ, S.; NOORIE, T.; PATERSON, D. L.; PEARSON, A.; PERRY, C.; PIKE, R.; RAO, B.; RAY, U.; SARMA, J. B.; SHARMA, M.; SHERIDAN, E.; THIRUNARAYAN, M. A.; TURTON, J.; UPADHYAY, S.; WARNER, M.; WELFARE, W.; LIVERMORE, D. M.; WOODFORD, N. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 10, n. 9, p. 597–602, set. 2010.

LAMMIE, S. L.; HUGHES, J. M. Antimicrobial resistance, food safety, and One Health: the need for convergence. *Annual Review of Food Science and Technology*, v. 7, p. 287-312, 2016.

LANGONI, H.; GUIDUCE, M. V. S.; NÓBREGA, D. B.; DA SILVA, R. C.; RICHINI-PEREIRA, V. B.; SALINA, A.; GUIMARÃES, F. D. F. Research of *Klebsiella pneumoniae* in dairy herds. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 35, n. 1, p. 9–12, jan. 2015.

LEAVITT, A.; NAVON-VENEZIA, S.; CHMELNITSKY, I.; SCHWABER, M. J.; CARMELI, Y. Emergence of KPC-2 and KPC-3 in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains in an Israeli hospital. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 51, n. 8, p. 3026–3029, jun. 2007.

LEE, C.-R.; LEE, J. H.; PARK, K. S.; JEON, J. H.; KIM, Y. B.; CHA, C.-J.; JEONG, B. C.; LEE, S. H. Antimicrobial resistance of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*: epidemiology, hypervirulence-associated determinants, and resistance mechanisms. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 7, n. 483, p. 1-7, nov. 2017.

LERY, L. M. S.; FRANGEUL, L.; TOMAS, A.; PASSET, V.; ALMEIDA, A. S.; BIALEK-DAVENET, S.; BARBE, V.; BENGOCHEA, J. A.; SANSONETTI, P.; BRISSE, S.; TOURNEBIZE, R. Comparative analysis of *Klebsiella pneumoniae* genomes identifies a phospholipase D family protein as a novel virulence factor. *BMC Biology*, v. 12, n. 41, p. 1–15, 2014.

LI, X.-Z.; NIKAIDO, H. Efflux-mediated drug resistance in bacteria: an update. *NIH Public Access*, v. 69, n. 12, p. 1555-1623, ago. 2009.

LIN, W. H.; KAO, C. Y.; YANG, D. C.; TSENG, C. C.; WU, A. B.; TENG, C. H.; WANG, M. C.; WU, J. J. Clinical and microbiological characteristics of *Klebsiella pneumoniae* from community-acquired recurrent urinary tract infections. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, v. 33, n. 9, p. 1533–1539, abr. 2014.

LIU, X.; THUNGRAT, K.; BOOTHE, D. M. Occurrence of oxa-48 carbapenemase and other β -lactamase genes in ESBL-producing multidrug resistant *Escherichia coli* from dogs and cats in the United States, 2009-2013. *Frontiers in Microbiology*, v. 7, n. 1057, p. 1-10, jul. 2016.

MAALAND, M. G.; MO, S. S.; SCHWARZ, S.; GUARDABASSI, L. In vitro assessment of chloramphenicol and florfenicol as second-line antimicrobial agents in dogs. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, v.38, n.5, p. 1–8, 2015.

MAATALLAH, M.; VADING, M.; KABIR, M. H.; BAKHROUF, A.; KALIN, M.; NAUCLÉR, P.; BRISSE, S.; GISKE, C. G. *Klebsiella variicola* is a frequent cause of bloodstream infection in the Stockholm area, and associated with higher mortality compared to *K. pneumoniae*. *PLoS ONE*, v. 9, n. 11, p. 1–21, nov. 2014.

MADIGAN M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P.V.; CLARK, D. P. *Microbiologia de Brook*. 12 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010, 1128p.

MATEU, E.; MARTIN, M. Why is anti-microbial resistance a veterinary problem as well? *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, v. 48, n. 8, p. 569–581, 2001.

MELETIS, G. Carbapenem resistance: overview of the problem and future perspectives. *Therapeutic Advances in Infectious Disease*, v. 3, n. 1, p. 15–21, 2016.

MOHAMED, E. R.; ALY, S. A.; HALBY, H. M.; AHMED, S. H.; ZAKARIA, A. M.; EL-ASHEER, O. M. Epidemiological typing of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*, which causes paediatric ventilator-associated pneumonia in Egypt. *Journal of Medical Microbiology*, v. 66, n. 5, p. 628–634, mar. 2017.

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

MOTA, R.; MOTA, SILVA, K. P. C. da; FREITAS, M. F. L. de; PORTO, W. J. N.; SILVA, L. B. G. Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresistência bacteriana. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 42, n. 6, p. 465–470, 2005.

MOXLEY, R. Family Enterobacteriaceae. In: McVEY, D. S.; KENNEDY, M. CHENGAPPA, M. M. *Veterinary Microbiology*. 3 ed. Nova Jersey: Wiley-Blackwell, 2013, cap. 6, p.53-61.

MUNITA, J. M.; ARIAS, C. A. Biochemical of sodium fluoride and arsenic trioxide toxicity and their reversal in the brain of mice. *Fluoride*, v. 37, n. 2, p. 80–87, abr. 2016.

MÜNNICH, A. The pathological newborn in small animals: The neonate is not a small adult. *Veterinary Research Communications*, v. 32, n. SUPPL. 1, p. 81–85, 2008.

MUÑOZ-PRICE, S.; KUMARADAMY, K.; HAYDEN, M.; GNIADKOWSKI, M.; GARAU, J.; CORNAGLIA, G.; CORMICAN, M.; DAIKOS, G.; SCHWABER, M.; BONOMO, R.; POIREL, L.; LIVERMORE, D. M.; MAYA, J. J.; NORDMANN, P.; WANG, H.; WOODFORD, N.; QUINN, J. P. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 13, n. 9, p. 785–796, set. 2013.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. *Microbiologia Médica*. 8 ed. São Paulo: Editora Elsevier, 2017, 836p.

NAAS, T.; NORDMANN, P.; VEDEL, G.; POYART, C. Plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing beta-Lactamase KPC in a *Klebsiella pneumoniae* Isolate from France. *Society*, v. 49, n. 10, p. 4423–4424, out. 2005.

NOCUA-BÁEZ, L. C.; CORTÉS, J. A.; LEAL, A. L.; ARIAS, G. F.; OVALLE-GUERRO, M. V.; SAAVEDRA-ROJAS, S. Y.; BUITRAGO, G.; ESCOBAR-PÉREZ, J. A.; CASTRO-CARDOZO, B. Antimicrobial susceptibility profile in urinary pathogens causing community-acquired infections in diabetic patients in Colombia. *Biomédica*, v. 37, n. 3, p. 353-360, 2017.

NORDMANN, P. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: Overview of a major public health challenge. *Medecine et Maladies Infectieuses*, v. 44, n. 2, p. 51–56, dez. 2014.

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

NORDMANN, P.; NAAS, T.; POIREL, L. Global spread of carbapenemase producing *Enterobacteriaceae*. *Emerging Infectious Diseases*, v. 17, n. 10, p. 1791–1798, out. 2011.

NORDMANN, P.; POIREL, L. Strategies for identification of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 68, n. 3, p. 487–489, 2013.

OLIVEIRA, L. C.; BRILHANTE, R. S. N.; CUNHA, A. M. S.; CARVALHO, C. B. M. Perfil de isolamento microbiano em cães com otite média e externa associadas. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, v. 58, n. 6, p. 1009-1017, 2006.

OSUNDIYA, O.; OLADELE, R.; ODUYEBO, O. Multiple antibiotic resistance (MAR) indices of *Pseudomonas* and *Klebsiella* species isolates in Lagos University Teaching Hospital. *African Journal of Clinical and Experimental Microbiology*, v. 14, n. 3, p. 164–168, set. 2013.

PACZOSA, M. K.; MECSAS, J. *Klebsiella pneumoniae*: going on the offense with a strong defense. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 80, n. 3, p. 629–661, jun. 2016.

PAES, A.C.; FRANCO, M. M. J. Tuberculose em Animais de Produção. In: MEGID, J.; RIBEIRO, M.G.; PAES, A.C. *Doenças Infecciosas em Animais de Produção e de Companhia*. 1ed. 2016. Rio de Janeiro: Roca, cap. 48, p. 512-541.

PAGANO, M.; GAUVREAU, K. *Princípios de Bioestatística*. São Paulo: Cengage Learning, 2ed., 2008, 506p.

PANAGEA, T.; GALANI, I.; SOULI, M.; ADAMOU, P.; ANTONIADOU, A.; GIAMARELLOU, H. Evaluation of CHROMagar™ KPC for the detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in rectal surveillance cultures. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 37, n. 2, p. 124–128, 2011.

PAPICH, M. G. Antibiotic Treatment of resistant infections in small animals. *Veterinary Clinics of NA: Small Animal Practice*, v.43, n.5, p.1091-1107, 2013.

PARTRIDGE, S. R. Resistance mechanisms in *Enterobacteriaceae*. *Pathology*, v. 47, n. 3, p. 276–284, abr. 2015.

PASTERAN, F. G.; OTAEGUI, L.; GUERRIERO, L.; RADICE, G.; MAGGIORA, R.; RAPOPORT, M.; FACCONI, D.; MARTINO, A. Di; GALAS, M. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-2 Buenos Aires, Argentina. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 2014, n. 27, jul. 2008.

PAUL, S.; BEZBARUAH, R. L.; ROY, M. K.; GHOSH, A. C. Multiple antibiotic resistance (MAR) index and its reversion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Letters in Applied Microbiology*, v. 24, n. 3, p. 169–171, 1997.

PEREZ, F.; CHAKHTOURA, N. G. El; YASMIN, M.; BONOMO, R. A. Polymyxins : To Combine or not to combine? *Antibiotics*, v. 8, n.38, p. 1–13, 2019.

PERRY, J. D.; NAQVI, S. H.; MIRZA, I. A.; ALIZAI, S. A.; HUSSAIN, A.; GHIRARDI, S.; ORENGA, S.; WILKINSON, K.; WOODFORD, N.; ZHANG, J.; LIVERMORE, D. M.; ABBASI, S. A.; RAZA, M. W. Prevalence of faecal carriage of *Enterobacteriaceae* with NDM-1 carbapenemase at military hospitals in Pakistan, and evaluation of two chromogenic media. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 66, n. 10, p. 2288–2294, jun. 2011.

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

PODSCHUN, R.; ULLMANN, U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens : epidemiology, taxonomy, typing methods , and pathogenicity factors. *Journal of clinical microbiology*, v. 11, n. 4, p. 589–603, out. 1998.

POIREL, L.; HÉRITIER, C.; TOLÜN, V.; NORDMANN, P. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Library Journal*, v. 48, n. 1, p. 15–22, jan. 2004.

POIREL, L.; POTRON, A.; NORDMANN, P. OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 67, n. 7, p. 1597–1606, abr. 2012.

POIREL, L.; STEPHAN, R.; PERRETEN, V.; NORDMANN, P. The carbapenemase threat in the animal world: the wrong culprit. *Indian Pediatrics*, v. 51, n. 11, p. 931–935, fev. 2014.

POIREL, L.; WALSH, T. R.; CUVILLIER, V.; NORDMANN, P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 70, n. 1, p. 119–123, 2011.

POOLE, K. Efflux-mediated antimicrobial resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 56, p. 20-51, maio 2005.

POTTER, R. F.; D'SOUZA, A. W.; DANTAS, G. The rapid spread of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. *Drug Resistance Updates*, v. 29, p. 30–46, 2016.

PULSS, S.; STOLLE, I.; STAMM, I.; LEIDNER, U.; HEYDEL, C.; SEMMLER, T.; PRENGER-BERNINGHOFF, E.; EWERS, C. Multispecies and clonal dissemination of OXA-48 carbapenemase in *Enterobacteriaceae* from companion animals in Germany, 2009-2016. *Frontiers in Microbiology*, v. 9, n. 1265, p. 1–12, jun. 2018.

PUNIA, M.; KUMAR, A.; CHARAYA, G.; KUMAR, T. Pathogens isolated from clinical cases of urinary tract infection in dogs and their antibiogram. *Veterinary World*, v. 11, p. 1037–1042, 2018.

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

QUINN, P.J.; MARKEY, B.K.; LEONARD, F.C.; FITZPATRICK, E.S.; FANNING, S.; HARTIGAN, P.J. *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*. 2 ed. Oxford: Blackwell Science Ltd., 2011, 1231p.

RANJBAR, R.; MEMARIANI, H.; SOROURI, R.; MEMARIANI, M. Distribution of virulence genes and genotyping of CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from patients with community-acquired urinary tract infection (CA-UTI). *Microbial Pathogenesis*, v. 100, p. 244–249, out. 2016.

RIBEIRO, M. G.; LANGONI, H.; DOMINGUES, P. F.; PANTOJA, J. C. F. Mastite em Animais Domésticos. In: MEGID, J.; RIBEIRO, M.G.; PAES, A.C. *Doenças Infeciosas em Animais de Produção e de Companhia*. 1ed. Rio de Janeiro: Rocca, 2016, cap. 112, p. 1154-1205.

RIBEIRO, M.G.; VARGAS, A.C. Rodococose. In: MEGID, J.; RIBEIRO, M.G.; PAES, A.C. *Doenças Infeciosas em Animais de Produção e de Companhia*. 1ed, Rio de Janeiro: Rocca, 2016, cap. 44, p. 258-277.

ROBERTS, D. E.; MCCLAIN, H. M.; HANSEN, D. S.; CURRIN, P.; HOWERTH, E. W. An outbreak of *Klebsiella pneumoniae* infection in dogs with severe enteritis and septicemia. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 12, n. 2, p. 168–173, 2000.

ROBILOTTI, E.; DERESINSKI, S. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *F1000Prime Reports*, v. 6, n. 80, set. 2014.

SACCENTE, M. *Klebsiella pneumoniae* liver abscess, endophthalmitis, and meningitis in a man with newly recognized diabetes mellitus. *Clinical Infectious Diseases*, v. 29, n. 6, p. 1570–1571, 1999.

SCHMIEDEL, J.; FALGENHAUER, L.; DOMANN, E.; BAUERFEIND, R.; PRENGER-BERNINGHOFF, E.; IMIRZALIOGLU, C.; CHAKRABORTY, T. Multiresistant extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* from humans, companion animals and horses in central Hesse, Germany. *BMC Microbiology*, v. 14, n. 187, p. 1–13, 2014.

SCHUKKEN, Y.; CHUFF, M.; MORONI, P.; GURJAR, A.; SANTISTEBAN, C.; WELCOME, F.; ZADOKS, R. The “other” gram-negative bacteria in mastitis. *Klebsiella*, *Serratia*, and more. *Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice*, v.28, n.2, p.239-256, 2012.

SCHWARZ, S.; LOEFFLER, A.; KADLEC, K. Bacterial resistance to antimicrobial agents and its impact on veterinary and human medicine. *Veterinary Dermatology*, v. 28, p. 82-e19, 2017.

SEGUIN, M. A.; ALTIER, C.; VALDEN, S. L.; STONE, E.; LEVINE, J. F. Persistent urinary tract infections and reinfections in 100 dogs (1989-1999). *Animal Genetics*, v. 39, n. 5, p. 561–563, 2008.

SHAHEEN, B. W.; NAYAK, R.; BOOTHE, D. M. Emergence of a New Delhi metallo- β -Lactamase (NDM-1)-encoding gene in clinical *Escherichia coli* isolates recovered from companion animals in the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 57, n. 6, p. 2902–2903, 2013.

SIU, L. K.; YEH, K. M.; LIN, J. C.; FUNG, C. P.; CHANG, F. Y. *Klebsiella pneumoniae* liver abscess: a new invasive syndrome. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 12, n. 11, p. 881–885, nov. 2012.

SMITH, A.; WAYNE, A. S.; FELLMAN, C. L.; ROSENBAUM, M. H. Usage patterns of carbapenem antimicrobials in dogs and cats at a veterinary tertiary care hospital. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, p. 1-9, 2019.

SINGH-MOODLEY, A.; PEROVIC, O. Phenotypic and genotypic correlation of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* and problems experienced in routine screening. *SAMJ Research*, v. 108, n. 6, p. 495–501, 2018.

STOLLE, I.; PRENGER-BERNINGHOFF, E.; STAMM, I.; SCHEUFEN, S.; HASSDENTEUFEL, E.; GUENTHER, S.; BETHE, A.; PFEIFER, Y.; EWERS, C. Emergence of OXA-48 carbapenemase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in dogs. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 68, n. 12, p. 2802–2808, jul. 2013.

STÜRCHLER, D. *Klebsiella* and Klebs the person behind the name. *Travel Medicine and Infectious Disease*, v. 14, n. 654, p. 654, nov. 2016.

SWATHI, C. H.; CHIKALA, R.; RATNAKAR, K. S.; SRITHARAN, V. A structural, epidemiological & genetic overview of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPCs). *The Indian Journal of Medical Research*, v. 144, n.1, p. 21-31, jul. 2016.

TAFUR, J. D.; TORRES, J. A.; VILLEGAS, M. V. Mecanismos de resistência a lós antibióticos en bacterias Gram negativas. *Asociación Colombiana de Infectología*, v.12, n.3, p.223-233, set. 2008.

TÄNGDÉN, T.; GISKE, C. G. Global dissemination of extensively drug-resistant carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: clinical perspectives on detection, treatment and infection control. *Journal of Internal Medicine*, v. 277, n. 5, p. 501–512, 2015.

TIMOFTE, D.; MACIUC, I. E.; EVANS, N. J.; WILLIAMS, H.; WATTRET, A.; FICK, J. C.; WILLIAMS, N. J. Detection and molecular characterization of *Escherichia coli* CTX-M-15 and *Klebsiella pneumoniae* SHV-12 β -lactamases from bovine mastitis isolates in the United Kingdom. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 58, n. 2, p. 789–794, nov. 2014.

TOFTELAND, S.; NASEER, U.; LISLEVAND, J. H.; SUNDSFJORD, A.; SAMUELSEN, Ø. A long-term low-frequency hospital outbreak of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* involving intergenus plasmid diffusion and a persisting environmental reservoir. *PLoS ONE*, v. 8, n. 3, p. 1–8, mar. 2013.

TUMBARELLO, M.; VIALE, P.; VISCOLI, C.; TRECARICHI, E. M.; TUMIETTO, F.; MARCHESE, A.; SPANU, T.; AMBRETTI, S.; GINOCCHIO, F.; CRISTINI, F.; LOSITO, A. R.; TEDESCHI, S.; CAUDA, R.; BASSETTI, M. Predictors of mortality in bloodstream infections caused by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae*: importance of combination therapy. *Clinical Infectious Diseases*, v. 55, n. 7, p. 943–950, jul. 2012.

TZOUVELEKIS, L. S.; MARKOGIANNAKIS, A.; PSICHOGIOU, M.; TASSIOS, P. T.; DAIKOS, G. L. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other *Enterobacteriaceae*: An evolving crisis of global dimensions. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 25, n. 4, p. 682–707, 2012.

VIAGGI, B.; SBRANA, F.; MALACARNE, P.; TASCINI, C. Ventilator-associated pneumonia caused by colistin-resistant KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: a case report and literature review. *Respiratory Investigation*, v. 53, n. 3, p. 124–128, fev. 2015.

VIERA, A. J.; GARRETT, J. M. Understanding interobserver agreement: The kappa statistic. *Family Medicine*, v. 37, n. 5, p. 360-363, maio 2005.

VILLEGAS, M. V.; LOLANS, K.; CORREA, A.; SUAREZ, C. J.; LOPEZ, J. A.; VALLEJO, M.; QUINN, J. P. First detection of the plasmid-mediated class a carbapenemase KPC-2 in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from South America. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 50, n. 8, p. 2880–2882, ago. 2006.

WALSH, T. R.; WEEKS, J.; LIVERMORE, D. M.; TOLEMAN, M. A. Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: an environmental point prevalence study. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 11, n. 5, p. 355–362, abr. 2011.

WANG, Y.; CAO, W.; ZHU, X.; CHEN, Z.; LI, L.; ZHANG, B.; WANG, B.; TIAN, L.; WANG, F.; LIU, C.; SUN, Z. Characterization of a novel *Klebsiella pneumoniae* sequence type 476 carrying both *bla*KPC-2 and *bla*IMP-4. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, v. 31, n. 8, p. 1867–1872, jan. 2012.

WANG, Y.; VENTER, H.; MA, S. Efflux pump inhibitors: a novel approach to combat efflux-mediated drug resistance in bacteria. *Current Drug Targets*, v. 17, n. 6, p. 702–19, 2016.

WANG, Y.; CAO, W.; ZHU, X.; CHEN, Z.; LI, L.; ZHANG, B.; WANG, B.; TIAN, L.; WANG, F.; LIU, C.; SUN, Z. Characterization of a novel *Klebsiella pneumoniae* sequence type 476 carrying both *bla*KPC-2 and *bla*IMP-4. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, v. 31, n. 8, p. 1867–1872, 2012.

WEESE, J. S.; GUARDABASSI, L.; MORLEY, P. S.; PAPICH, M.; RICCIUTO, D. R.; SYKES, J. E. ACVIM Consensus Statement on Therapeutic Antimicrobial Use in Animals and Antimicrobial Resistance. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 29, p. 1-18, 2015

WEI, Z. Q.; DU, X. X.; YU, Y. S.; SHEN, P.; CHEN, Y. G.; LI, L. J. Plasmid-mediated KPC-2 in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from China. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 51, n. 2, p. 763–765, fev.2007.

WHO. *Antimicrobial resistance. Global report on surveillance*. World Health Organization, v. 61, n. 3, p. 383–394, 2014.

WHO. Critically Important Antimicrobials for Human Medicine: Ranking of Antimicrobial Agents for Risk Management of Antimicrobial Resistance Due to Non-Human Use. 4th ed. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2016.

WINN, W. C.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; KONEMAN, E. W.; PROCOP, G. W.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WOODS, G. I. *Koneman, Diagnóstico microbiológico – texto e atlas colorido*, 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008, 1565p.

YAN, Q.; ZHOU, M.; ZOU, M.; LIU, W. -e. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* induced ventilator-associated pneumonia in mechanically ventilated patients in China. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, v. 35, n. 3, p. 387–396, jan. 2016.

YIGIT, H.; QUEENAN, A. M.; ANDERSON, G. J.; DOMENECH-SANCHEZ, A.; BIDDLE, J. W.; STEWARD, C. D.; ALBERTI, S.; BUSH, K.; TENOVER, F. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 45, n. 4, p. 1151-1161, abr. 2001.

YONG, D.; TOLEMAN, M. A.; GISKE, C. G.; CHO, H. S.; SUNDMAN, K.; LEE, K.; WALSH, T. R. 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, dez. 2009.

XIA, J.; FANG, L. X.; CHENG, K.; XU, G. H.; WANG, X. R.; LIAO, X. P.; LIU, Y. H.; SUN, J. Clonal spread of 16S rRNA methyltransferase-producing *Klebsiella pneumoniae* ST37 with high prevalence of ESBLs from companion animals in China. *Frontiers in Microbiology*, v. 8, n. 529, p. 1–8, mar. 2017.

ZAPPA, V.; BOLAÑOS, C. A. D.; DE PAULA, C. L.; CALLEFE, J. L. R.; ALVES, A. C.; DE MORAIS, A. B. C.; GUERRA, S. T.; CABRINI, M. C.; MELVILLE, P. A.; RIBEIRO, M. G. Antimicrobial multiple resistance index, minimum inhibitory concentrations, and extended-spectrum beta-lactamase producers of *Proteus mirabilis* and *Proteus vulgaris* strains isolated from domestic animals with various clinical manifestations of infection. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 38, n. 2, p. 775–780, 2017.

10. TRABALHO CIENTÍFICO

Trabalho científico publicado na revista “*Brazilian Journal of Microbiology*”



Klebsiella-induced infections in domestic species: a case-series study in 697 animals (1997–2019)

Márcio Garcia Ribeiro^{1,2} · Amanda Bonalume Cordeiro de Moraes¹ · Ana Carolina Alves¹ · Carmen Alicia Daza Bolaños³ · Carolina Lechinski de Paula¹ · Fábio Vinicius Ramos Portilho¹ · Geraldo de Nardi Júnior⁴ · Gustavo Henrique Batista Lara¹ · Lorrayne de Souza Araújo Martins¹ · Lucieny Sierra Moraes¹ · Rafaela Mastrangelo Riseti¹ · Simony Trevizan Guerra¹ · Thaís Spessotto Bello¹ · Amanda Keller Siqueira¹ · Amanda Bezerra Bertolini¹ · Carolina Aparecida Rodrigues¹ · Natália Rodrigues Paschoal¹ · Beatriz Oliveira de Almeida¹ · Fernando José Paganini Listoni¹ · Luísa Fernanda García Sánchez¹ · Antonio Carlos Paes¹

Received: 26 July 2021 / Accepted: 24 December 2021

© The Author(s) under exclusive licence to Sociedade Brasileira de Microbiologia 2022

Abstract

Klebsiella species, particularly *K. pneumoniae*, are well-known opportunistic enterobacteria related to complexity of clinical infections in humans and animals, commonly refractory to conventional therapy. The domestic animals may represent a source of the pathogenic and multidrug-resistant *Klebsiella* species to humans. Nevertheless, most studies involving *Klebsiella*-induced infections in domestic animals are restricted to case reports or outbreaks. We retrospectively investigated selected epidemiological data, clinical aspects, and in vitro susceptibility pattern of 697 non-repetitive *Klebsiella* infections in livestock and companion species (1997–2019). The isolates were obtained from different clinical disorders from dogs ($n=393$), cattle ($n=149$), horses ($n=98$), cats ($n=27$), pigs ($n=22$), sheep ($n=5$), goats ($n=2$), and buffalo ($n=1$), except four isolates from subclinical bovine mastitis. Urinary ($223/697=32\%$), enteric ($117/697=16.8\%$), mammary ($85/697=12.2\%$), reproductive ($85/697=12.2\%$), and respiratory disorders ($67/697=9.6\%$) were the most common clinical manifestations. Other miscellaneous clinical pictures ($116/697=16.6\%$) included abscesses, otitis, hepatitis, conjunctivitis, pyodermitis, sepsis, and encephalitis. Norfloxacin ($183/245=74.7\%$) and gentamicin ($226/330=68.5\%$) were the most effective antimicrobials. High in vitro resistance of the isolates was seen to ampicillin ($326/355=91.8\%$), amoxicillin/clavulanic acid ($25/62=40.3\%$), and trimethoprim/sulfamethoxazole ($100/252=39.7\%$), and multidrug resistance to ≥ 3 classes of antimicrobials was found in 20.4% ($142/697$) isolates. Wide variety of clinical manifestations of *Klebsiella*-induced infections was observed, with a predominance of urinary, enteric, mammary, reproductive, and respiratory tract disorders, reinforcing opportunistic behavior of agent. Poor in vitro efficacy was observed to some conventional antimicrobials and $\sim 20\%$ of isolates exhibited resistance pattern, reinforcing the need for proper use of drugs on therapy approaches in domestic animals to avoid multidrug-resistant bacteria, an emergent global concern.

Keywords *Klebsiella pneumoniae* · Livestock · Companion animals · Clinical and epidemiological aspects · Multidrug-resistant bacteria

Introduction

Klebsiella species are well-known rod-shaped gram-negative, non-motile, lactose-fermenting, facultatively anaerobic bacteria belonging to the *Enterobacteriaceae* family. The

organism is found widely in the environment, i.e., soil, water, manure, and plants, as well as enteric tract, skin, and mouth microbiota of animals and humans [1–3]. Different routes of transmission are possible to *Klebsiella*-induced infections due to virulence potential and opportunistic nature of the bacterium, although ingestion of contaminated food and water [4], genitourinary, and intramammary [5] are common routes associated with the transmission of the pathogen in livestock [6] and companion animals [7].

✉ Márcio Garcia Ribeiro
marcio.ribeiro@unesp.br

Extended author information available on the last page of the article

The pathogenicity of *Klebsiella* species, particularly *K. pneumoniae*, has been attributed to a set of virulence factors, including capsular serotypes (K1 and K2), adhesins (*fimH-1*, *mrkD*), iron-acquired systems (siderophores, *iucC*), lipopolysaccharides of cell wall, bacteriocins (*entB*), and serum resistance (*traT*) [8–10]. A great variety of clinical signs are related to *Klebsiella* infections in domestic animals, although urinary, respiratory, mammary, and reproductive tract disorders have been predominantly reported [5, 6, 11, 12].

In humans, *K. pneumoniae* is intimately associated with hospital-acquired infections [2, 13] causing mainly pneumonia, urinary tract disorders, and sepsis [4]. Neonates, elderly, and immunocompromised patients have been related to a significant morbimortality rate, caused mainly by multidrug-resistant *K. pneumoniae* isolates [2, 4], an emergent global One Health issue [14]. In addition, a dangerous hypervirulent *K. pneumoniae* variant has been increasingly reported in some countries, with the ability to develop serious life-threatening community-acquired infections related mainly to pneumonia, abscesses, sepsis, and encephalitis [15].

Besides a great variety of virulence mechanisms, genomic diversity, multidrug resistance to conventional antimicrobials, and public health relevance of *Klebsiella*-induced infections [2–4, 14], there are scarce comprehensive studies that have focused on the main epidemiological and clinical aspects related to the pathogen from the non-human origin [10], especially involving a great number of domestic animals. In addition, domestic species and food products and derivatives from animal origin may represent transmission sources of pathogenic *Klebsiella* species from animals to humans [3, 10]. In this scenario, we retrospectively investigated selected epidemiological and clinical aspects of 697 non-repetitive cases of *Klebsiella*-induced infections naturally acquired isolated from a great variety of clinical disorders from cattle, dogs, pigs, horses, cats, sheep, goats, and buffalo for 22 years (1997–2019), as well as in vitro susceptibility pattern of isolates.

Material and methods

Study design

A cross-sectional study of the clinical aspects and selected epidemiological data in 697 *Klebsiella*-induced infections isolated from domestic animals in the Laboratory of Microbiology at Veterinary Hospital of School of Veterinary Medicine and Animal Sciences (FMVZ) of the São Paulo State University (UNESP), Botucatu, SP, Brazil, from 1997 to 2019, was retrospectively investigated.

Animals, criteria for case selection and database of study

All six hundred ninety-seven cases of *Klebsiella* infections isolated from different disorders from dogs, cattle, horses, cats, pigs, sheep, goat, and buffalo recorded at Laboratory of Microbiology over a 22-year period were included in the study. All the *Klebsiella* isolates were recovered from non-repetitive 697 cases among domestic animals sampled. Only four subclinical cases of bovine mastitis were included in this trial. The animals enrolled came from the State of São Paulo, Paraná, and Minas Gerais, located in the southeast and southern regions of Brazil. The database of the study consisted exclusively of paper records analyzed manually.

Epidemiological and clinical data

Selected epidemiological data were represented by age, gender (male/female), and season of cases in the spring (September to November), summer (December to February), autumn (March to May), and winter (June to August). Due to the isolation of the pathogen from diverse breeds and cross-breeds among different domestic animals sampled, this data was not used to further analysis. Age of dogs was stratified as < 1 year old, 1 to < 5 years old, ≥ 5 to ≤ 10 years old, and > 10 years old, while livestock species were subdivided among < 3 years old, 3 to 10 years old, and > 10 years old.

The diagnosis was based on clinical data available in the medical records, complementary exams, and microbiological identification of *Klebsiella* isolates. Clinical specimens were obtained mainly from urine, feces, milk, semen, uterus secretion, bronchoalveolar lavage fluid, auditive and ocular secretions, abscesses content, cerebrospinal fluid, and different fragments of organs at necropsy. Some clinical manifestations from the same organic system were grouped as respiratory (sinusitis, pharyngitis, bronchitis, pneumonia, nasal fistula), urinary tract (cystitis, pyelonephritis, urethritis), and reproductive disorders (vaginitis, pyometra, abortion, seminal vesiculitis, prostatitis, epididymitis, and orchitis), while other various clinical abnormalities were grouped as miscellaneous. Clinical outcome (number of surviving and mortality) represented poor consistent or missing data and was not used to further analysis.

Bacteriological diagnosis

Along the retrospective study from 1997 to 2019, all the samples were plated on defibrinated sheep blood agar (5%)

and MacConkey agar, incubated aerobically at 37 °C for 72 h, and diagnosis of *Klebsiella* isolates in 697 cases was based on conventional biochemical tests [1].

Diagnosis of bovine mastitis and the clinical score of severity

Subclinical mastitis was diagnosed by conventional California mastitis test (1+ to 3+ scores) [6]. The clinical mastitis cases and three severity scores were diagnosed in quarter/animal level as follows: mild cases (or score 1) were characterized by the presence of macroscopic abnormalities in the milk appearance (e.g., flakes, pus, blood) using strip cup test; moderate cases (or score 2) when quarter of animals showed an altered appearance of milk and udder inflammation (redness to congestion, edema, swelling, and pain in the affected mammary gland); whereas animals with additional clinical signs of inappetence, fever, tachypnea, tachycardia, decubitus, or ruminal motility alterations were classified as severe cases (or score 3) [16]. When more than one quarter had been infected by *Klebsiella* sp., only one strain (i.e., animal) was considered to analyze.

In vitro antimicrobial susceptibility test and multidrug-resistant isolates

Along 1997–2019, results of the in vitro antimicrobial disk diffusion test (Clinical and Laboratory Standards Institute guidelines, CLSI) [17, 18] from 697 *Klebsiella* isolates were retrospectively analyzed. Among these 22 years of retrospective study, 12 antimicrobials from six different classes were used as follows: (1) synthetic or derivative penicillins (ampicillin 10 µg, amoxicillin/clavulanic acid 30 µg), (2) cephalosporins (ceftiofur 30 µg, ceftriaxone 30 µg, cephalexin 30 µg), (3) fluoroquinolones (ciprofloxacin 5 µg, enrofloxacin 5 µg, norfloxacin 10 µg), (4) amphenicols (florfenicol 30 µg), (5) aminoglycosides (amikacin 30 µg, gentamicin 10 µg), and (6) sulfonamides (trimethoprim-sulfamethoxazole 25 µg). Isolates that exhibited simultaneous resistance to ≥ 3 different classes (groups) of antimicrobials were considered multiresistant [19]. Intermediate results of in vitro antimicrobial pattern were not included in analysis of multiresistant isolates.

Multiple antimicrobial resistance (MAR) indices were calculated by determining the ratio of the number of antimicrobial class(es) against which each isolate was resistant and the total number of tested classes [20].

Data analyses

The Chi-square (or Fisher's exact) test was used to compare the association between clinical manifestations and selected epidemiological data of *Klebsiella* isolates. Statistical

analyses were conducted using SPSS version 14 for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) and the level of statistical significance was set at 0.05.

Results

Epidemiological and clinical data

Dogs (393/697 = 56.4%), cattle (149/697 = 21.4%), and horses (98/697 = 14.1%) were the domestic species most frequently affected by *Klebsiella*-induced infections, followed by a minor number of cases in cats (27/697 = 3.9%), pigs (22/697 = 3.1%), sheep (5/697 = 0.7%), goats (2/697 = 0.3%), and buffalo (1/697 = 0.1%). Data of clinical manifestations versus livestock and companion species infected by *Klebsiella* sp. are shown in Table 1. Out of 697 cases, urinary tract infections (223/697 = 32%), diarrhea (117/697 = 16.8%), clinical and subclinical mastitis (89/697 = 12.8%), reproductive abnormalities (85/697 = 12.2%), and respiratory infections (67/697 = 9.6%) were the most common disorders. Nevertheless, the pathogen was also isolated from other miscellaneous clinical conditions (116/697 = 16.6%), e.g., otitis (32/116 = 27.6%), abscesses (24/116 = 20.7%), hepatitis (20/116 = 17.2%), pyodermitis (8/116 = 6.9%), sepsis (4/116 = 3.4%), conjunctivitis (3/116 = 2.6%), encephalitis (1/116 = 0.9%), and from different fragments of organs at necropsy (24/116 = 20.7%).

Respiratory infections were clinically manifested by pneumonia (39/67 = 58.2%), bronchitis (17/67 = 25.4%), sinusitis (9/67 = 13.4%), pharyngitis (1/67 = 1.5%), and nasal fistula (1/67 = 1.5%). Urinary tract infections (UTI) were represented by cystitis (169/223 = 75.8%), pyelonephritis (32/223 = 14.3%), and urethritis (22/223 = 9.9%). Reproductive disorders were clinically observed predominantly as seminal vesiculitis (46/85 = 54.1%) and pyometra (29/85 = 34.1%), followed by low frequency of equine abortion (3/85 = 3.5%), vaginitis (2/85 = 2.3%), and isolated cases of bovine abortion (1/85 = 1.2%), equine orchitis (1/85 = 1.2%), ovine prostatitis (1/85 = 1.2%), ovine epididymitis (1/85 = 1.2%), and ovine orchitis (1/85 = 1.2%) (Table 1).

Of all animals enrolled, 57.2% (399/697) were female, 40.5% (282/697) male, and there was no information/missing data about the gender of 2.3% (16/697) animals.

The age of the 697 domestic animals ranged from 1 day to 20 years old, with mean age of 7.1 years. The most common age of canine pneumonia occurrence ranged from 1- to < 5 years old (23/46 = 50%), followed by < 1 year old (7/46 = 15.2%), ≥ 5 to ≤ 10 years old (8/46 = 17.4%), and > 10 years old (8/46 = 17.4%). Dogs that manifested enteritis were affected mainly < 1 year old (35/55 = 63.6%), followed by 1 to < 5 years old

Table 1 Clinical disorders caused by *Klebsiella*-induced infections in 697 companion and livestock species, Brazil, 1997–2019

Clinical manifestations	Mastitis ¹	Diarrhea	Respiratory infections ²	Urinary infections ³	Reproductive disorders ⁴	Miscellaneous ⁵	Total (%)
Animal species	N isolates (%)	N isolates (%)	N isolates (%)	N isolates (%)	N isolates (%)	N isolates (%)	
Dogs	-	55 (14)	46 (11.7)	204 (51.9)	13 (3.3)	75 (19.1)	393 (100)
Cattle	89 (59.7)	21 (14.1)	8 (5.4)	1 (0.7)	17 (11.4)	13 (8.7)	149 (100)
Horses	-	26 (26.5)	7 (7.1)	1 (1)	52 (53.1)	12 (12.3)	98 (100)
Cats	-	-	-	17 (63)	-	10 (37)	27 (100)
Pigs	-	13 (59.1)	4 (18.2)	-	-	5 (22.7)	22 (100)
Sheep	-	-	2 (40)	-	2 (40)	1 (20)	5 (100)
Goats	-	1 (50)	-	-	1 (50)	-	2 (100)
Buffalo	-	1 (100)	-	-	-	-	1 (100)
Total (%)	89 (12.8)	117 (16.8)	67 (9.6)	223 (32)	85 (12.2)	116 (16.6)	697

N number, % percentage

¹Clinical ($n=85$), subclinical ($n=4$)

²Pneumonia ($n=39$), bronchitis ($n=17$), sinusitis ($n=9$), pharyngitis ($n=1$), nasal fistula ($n=1$)

³Cystitis ($n=169$), pyelonephritis (32), urethritis ($n=22$)

⁴Seminal vesiculitis ($n=46$), pyometra ($n=29$), equine abortion ($n=3$), vaginitis ($n=2$), bovine abortion ($n=1$), equine orchitis ($n=1$), prostatitis ($n=1$), ovine epididymitis ($n=1$), and ovine orchitis ($n=1$)

⁵Miscellaneous=otitis ($n=32$), abscesses ($n=24$), hepatitis ($n=20$), pyodermitis ($n=8$), sepsis ($n=4$), conjunctivitis ($n=3$), encephalitis ($n=1$), and from fragment of organs ($n=24$)

(9/55 = 16.4%), ≥ 5 to ≤ 10 years old (7/55 = 12.7%), and > 10 years old (4/55 = 7.3%). Canine urinary tract infection occurred predominantly among animals > 10 years old (108/204 = 53%), followed by ≥ 5 to ≤ 10 years old (61/204 = 29.9%), 1 to < 5 years old (27/204 = 13.2%), and < 1 year old (8/204 = 3.9%). Equine reproductive tract infections occurred mainly > 10 years old (27/52 = 52%) animals, followed by 3 to 10 years old (23/52 = 44.2%), and few cases < 3 years old (2/52 = 3.8%). Seventy-eight cases of clinical mammary infections occurred predominantly in cows between 3 and 10 years old (69/78 = 88.5%), followed by a minor number > 10 years old (4/78 = 5.1%) animals, while there was no information/missing data about age of 5 (5/78 = 6.4%) cows.

Eighty-five clinical cases of bovine mastitis occurred predominantly along with the summer (36/85 = 42.4%) and autumn (24/85 = 28.2%), followed by an equivalent number of cases in spring (13/85 = 15.3%) and winter (12/85 = 14.1%). Among forty-six dogs affected by pneumonia, the clinical manifestation occurred mainly in the winter (21/46 = 45.6%), followed by a minor number of cases in autumn (12/46 = 26.1%), spring (9/46 = 19.6%), and summer (4/46 = 8.7%). Fifty-five cases of canine enteritis occurred with an equivalent distribution throughout the summer (17/55 = 30.9%), spring (14/55 = 25.5%), autumn (13/55 = 23.6%), and winter (11/55 = 20%) periods. Among 204 canine urinary tract infections, the clinical manifestations occurred mainly in summer (68/204 = 33.3%), followed by winter (52/204 = 25.5%), spring (46/204 = 22.6%), and

autumn (38/204 = 18.6%). Fifty-two cases of reproductive disorders in horses revealed an equivalent distribution of cases in winter (15/52 = 28.8%), spring (13/52 = 25%), summer (14/52 = 27%), and autumn (10/52 = 19.2%).

Diagnosis of bovine mastitis and the clinical score of severity

Among 89 isolates from bovine mastitis, 95.5% (85/89) and 4.5% (4/89) were clinical and subclinical cases, respectively. Of 78 clinical cases, data regarding clinical scores were available in 47 (60.2%) cases, of which 23.4% (11/47), 40.4% (19/47), and 36.2% (17/47) showed mild, moderate, and severe level, respectively.

In vitro antimicrobial susceptibility test and multidrug-resistant isolates

The most in vitro effective drugs against *K. pneumoniae* isolates were norfloxacin (183/245 = 74.7%) and gentamicin (226/330 = 68.5%). In contrast, high resistance rates of the isolates were observed mainly to ampicillin (326/355 = 91.8%), amoxicillin/clavulanic acid (25/62 = 40.3%), and trimethoprim/sulfamethoxazole (100/252 = 39.7) (Table 2). One hundred forty-two (142/697 = 20.4%) isolates from dogs ($n=82$), cattle ($n=37$), horses ($n=16$), pigs ($n=3$), cats ($n=2$), and small ruminants ($n=2$) exhibited simultaneous resistance to ≥ 3 antimicrobials of different groups of drugs and were

Table 2 In vitro antimicrobial susceptibility pattern of *Klebsiella* isolates from diseased companion animals and livestock, Brazil, 1997–2019

Animal species Classes of drugs	Antimicrobials	Dogs				Cattle				Horses				Pigs				Cats				Total			
		N of strains (%)				N of strains (%)				N of strains (%)				N of strains (%)				N of strains (%)				N of strains (%)			
		S	I	R		S	I	R		S	I	R		S	I	R		S	I	R		S	I	R	
Amino- glyco- sides	Amikacin	33/66 (50)	8/66 (12)	25/66 (38)	-	-	-	-	28/44 (64)	7/44 (16)	9/44 (20)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	61/110 (55.4)	15/110 (13.6)	34/110 (31)		
	Gen- tamicin	99/155 (64)	9/155 (6)	47/155 (30)	78/101 (77)	15/101 (15)	8/101 (8)	8/101 (8)	43/65 (66)	10/65 (15)	12/65 (19)	5/6 (83)	-	1/6 (17)	1/3 (33)	-	2/3 (67)	226/330 (68.5)	34/330 (10.3)	70/330 (21.2)					
Ampheni- cols	Florfeni- col	20/67 (30)	9/67 (13)	38/67 (57)	57/88 (65)	11/88 (12)	20/88 (23)	5/26 (19)	2/26 (73)	3/7 (43)	1/7 (43)	-	-	-	-	-	-	99/188 (52.7)	23/188 (12.2)	66/188 (35.1)					
	Amoxicil- lin/clavulanic acid	29/62 (46.8)	8/62 (12.9)	25/62 (40.3)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	29/62 (46.8)	8/62 (12.9)	25/62 (40.3)					
Beta- lactams and deriva- tives	Ampicil- lin	5/145 (3)	3/145 (2)	137/145 (95)	7/92 (8)	4/92 (4)	81/92 (88)	53/61 (87)	2/61 (3)	2/55 (3.6)	-	53/55 (96.4)	-	2/2 (100)	-	-	-	20/355 (5.6)	9/355 (2.6)	326/355 (91.8)					
	Cefalexin	56/131 (43)	21/131 (16)	54/131 (41)	45/70 (64)	10/70 (14)	15/70 (22)	-	-	-	-	-	-	1/3 (33)	-	2/3 (67)	102/204 (50)	31/204 (15.2)	71/204 (34.8)						
Cephalo- sporins	Ceftiofur	29/164 (18)	60/164 (36)	75/164 (46)	25/50 (50)	15/50 (30)	10/50 (20)	29/59 (49)	13/59 (22)	17/59 (29)	-	-	-	-	-	-	2/2 (100)	83/275 (30.2)	88/275 (32)	104/275 (37.8)					
	Ceftriax- one	38/84 (45)	14/84 (17)	32/84 (38)	-	-	-	18/27 (67)	5/27 (18)	4/27 (15)	-	-	-	-	-	-	56/113 (49.6)	19/113 (16.8)	38/113 (33.6)						
Fluoro- qui- nolones	Ciproflox- acin	76/159 (48)	25/159 (16)	58/159 (36)	-	-	-	33/40 (83)	2/40 (5)	5/40 (12)	-	-	-	-	-	-	109/201 (54.2)	27/201 (13.4)	65/201 (32.4)						
	Enroflox- acin	77/177 (44)	34/177 (19)	66/177 (37)	56/93 (60)	23/93 (25)	14/93 (15)	46/65 (71)	11/65 (17)	8/65 (12)	1/6 (17)	-	4/6 (66)	1/3 (33)	-	2/3 (67)	181/344 (52.6)	69/344 (20.1)	94/344 (27.3)						
Sulfona- mides	Norfloxa- cin	122/180 (68)	9/180 (5)	49/180 (27)	-	-	-	60/63 (95)	1/63 (2)	2/63 (3)	-	-	-	1/2 (50)	-	1/2 (50)	183/245 (74.7)	10/245 (4.1)	52/245 (21.2)						
	Trimeth- oprim- sul- fameth- oxazole	78/153 (51)	8/153 (5)	67/153 (44)	19/33 (58)	2/33 (6)	12/33 (36)	36/57 (63)	2/57 (4)	19/57 (33)	4/6 (67)	2/6 (33)	-	1/3 (33)	-	2/3 (67)	138/252 (54.8)	14/252 (5.5)	100/252 (39.7)						

N number, % percentage, S susceptible, I intermediate, R resistant

considered multiresistant. These multidrug-resistant isolates were recovered mainly from clinical mastitis (30/37 = 81.1%) and diarrhea in cattle (6/37 = 16.2%); urinary tract infections (25/82 = 30.5%), diarrhea (23/82 = 28%), and pneumonia (10/82 = 12.2%) in dogs; pyometra (5/16 = 31.2%), seminal vesiculitis (3/16 = 18.8%), and pneumonia (2/16 = 12.5%) in horses; and diarrhea in pigs (2/3 = 66.7%). MAR indices of cattle, dogs, horses, pigs, and cats were 0.413, 0.348, 0.272, 0.227, and 0.123, respectively.

Data analyses

No statistical association was observed between age and canine pneumonia ($p = 0.21$), age and canine enteritis ($p = 0.22$), age and canine urinary tract infection ($p = 0.26$), canine pneumonia and seasons ($p = 0.15$), and bovine mastitis and seasons ($p = 0.15$).

Discussion

This study revealed a great variety of clinical manifestations of *Klebsiella*-induced infections in domestic animals retrospectively investigated over 22 years, with a predominance of urinary, enteric, mammary, reproductive, and respiratory disorders, a fact that reinforces the pathogenicity and opportunistic nature of the organism [4], since this pathogen is found widely in the environment and enteric tract of livestock and companion animals [1, 2]. In addition, ~20% of the isolates revealed multidrug resistance to conventional antimicrobials, an emergent public health issue worldwide.

For decades, gram-positive contagious bacterium represented the major causes of bovine mastitis globally. Nevertheless, dairy farms that reached success on programs to control this group of pathogens facing a novel scenario targeted to control environmental pathogens, particularly coliforms, e.g., *Escherichia coli* and *K. pneumoniae* [21]. *K. pneumoniae* is a well-known pathogen of mammary infections in livestock, especially as a primary causal agent of clinical mastitis in cows. The organism is widely distributed in dairy farm environment [5], i.e., manure, feces, water, and different types of bedding (sand, sawdust, straw). In the current study, 87.6% of cows with mammary infections showed clinical manifestations, which agrees with studies published previously [22, 23], which described the predominance of clinical bovine mastitis-related *Klebsiella* infections.

E. coli and *K. pneumoniae* have been described as the main enterobacteria causing clinical bovine mastitis around the world [24], although differences in the pathogenicity have been noted among mammary infections induced by these enterobacteria [5]. High severity of clinical episodes, longer duration of infection, poor-to-moderate response to vaccination, inefficacy of antimicrobial therapy, and high

risk of culling or death have been seen in mammary infections caused by *Klebsiella* species compared to *E. coli* [5, 25]. In addition, clinical severity scores of bovine mastitis have been traditionally investigated among mastitis-related *E. coli* infections [16], although the influence of virulence factors and the specific genes that determine the severity scores of clinical cases has not been fully determined [26]. In this regard, few comprehensive studies have addressed the severity scores of bovine clinical mastitis-related *Klebsiella* species [3]. A study that investigated the etiology of clinical mastitis in 50 large-scale dairy farms from the USA revealed 30.2% mild, 37.2% moderate, and 32.6% severe scores of mammary infections-related *K. pneumoniae* [22]. In this study, 23.4%, 40.4%, and 36.2% of cows from Brazil exhibited mild, moderate, and severe clinical scores, respectively, indicating a predominance of *Klebsiella* infections as a primary agent of moderate-to-severe clinical cases of bovine mastitis. In fact, the severity of bovine mammary infections-related *Klebsiella* species reinforces concern in dairy farms with clinical cases induced by this pathogen, which may need an emergency therapy approach [5, 27].

Classically, *Klebsiella* species are considered a causal agent of bovine mastitis from environment [5] and an opportunistic, non-contagious agent of bovine mastitis, which implicates that mammary infection is related to different sources of the dairy environment [28]. Nevertheless, a binary behavior, i.e., environmental and contagious nature, has been noted currently in *Klebsiella pneumoniae* [29, 30] and other pathogens (*Streptococcus uberis* and *Streptococcus agalactiae*) that cause bovine mastitis [31], which may represent a new challenge to the control and preventive approaches of bovine mastitis. Besides these new perceptions related to the ability of *K. pneumoniae* to infect bovine mammary glands, the optimization of the immune response of cows, milking hygiene practices, environmental hygiene conditions [5], and novel vaccines produced with modern purposes [32] remains as important measures to prevent/control bovine mastitis-related to this pathogen. In addition, the clinical cases of bovine mastitis by *Klebsiella* sp. in the current study predominantly ranged from 3- to 10 years old in summer and autumn. High frequency of mastitis along this period of age may be related to cow's production peak, which predisposes to mammary infections, particularly in the summer period due to the increase of pluviometry that may facilitate the proliferation and environmental contamination of enterobacteria, such as *Klebsiella* species [5, 21].

Klebsiella pneumoniae are well-known inhabitant of enteric microbiota of livestock and companion animals [1]. Besides multifactorial nature of enteritis in livestock [6, 33] and companion species [7, 34], which involves bacteria, virus, and/or protozoa as causal agents, little attention has been deserved to *Klebsiella* species as a potential cause of enteric disorders. Here, among domestic animals sampled,

enteric manifestations were seen as a major clinical sign of *Klebsiella*-induced infections in pigs (59.1%), as well as moderately frequent in horses (26.5%), cattle (14.1%), and dogs (14%), indicating that this pathogen should be considered in the diagnosis of enteric manifestations among these domestic species. Among dogs retrospectively studied, enteritis occurred mainly < 1 year old, a finding that agrees with similar studies where diarrhea has predominated in young animals [35]. Furthermore, no clear association between canine enteritis and season periods in the current study suggests that enteritis by the pathogen may occur along all year.

Pulmonary involvement is another clinical disorder caused by *Klebsiella* species in domestic animals. The pulmonary tract-related *K. pneumoniae* infections may occur by aerosols or secondary to systemic dissemination of the pathogen from other sites of infection [6, 7]. In this regard, *Klebsiella* spp. were reported as a primary cause of pneumonia in 46 horses from the USA [11]. In the current study, pulmonary infections by *Klebsiella* isolates, represented mainly by pneumonia, bronchitis, and sinusitis signs, were reported in sheep (40%), pigs (18.2%), dogs (11.7%), horses (7.1%), and cattle (5.4%), reinforcing the pathogenicity of the agent to the pulmonary tract of domestic animals. In addition, canine pulmonary infection occurred mainly along to winter (45.6%), whose transmission of the pathogen in this period could be favored by aerosolization [7] and cold temperatures that may reduce the immune response of the animals [36].

Urinary tract infections represent one of the most common infectious diseases in veterinary practices, which affects particularly older females of companion animals [7]. The disease is polymicrobial, although enterobacteria have been reported as the main group of pathogens, i.e., *E. coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, and *Proteus* species. Various predisposing factors have been related to canine and feline UTIs, affecting animals that have disorders of the urinary tract or underlying conditions, including impaired immunity, chronic kidney diseases, diabetes, hyperthyroidism, lithiasis, neoplasia, anatomic abnormalities, and transurethral procedures (catheter) [37]. Typically, *K. pneumoniae* has been reported as a primary agent of UTI, which infects the domestic animals by fecal contamination of lower urinary tract from the perirectal region, contaminated environment, and, occasionally, spread of the pathogen from other diseased foci or intestines, since this pathogen may be found as an inhabitant of the enteric tract of domestic animals [1]. In Brazil, 67 *K. pneumoniae* isolated from different clinical manifestations from domestic animals and wildlife revealed a predominance of urinary abnormalities ($11/67 = 16.4\%$), followed by enteric ($10/67 = 14.9\%$) and pulmonary ($9/67 = 13.4\%$) infections [12]. These data align with the current study since > 50% of dogs and cats

enrolled showed UTI, represented predominantly by cystitis, pyelonephritis, and urethritis, reinforcing the pathogenicity of *Klebsiella* species to the urinary system, particularly to companion animals.

Most canine UTI in the current study occurred > 10 years old, male, and in the summer period. Likewise, a study revealed the predominance of urinary infections in older dogs, since this group of animals is more predisposed to underlying conditions, impaired immune response, or chronic diseases that affect the urinary system [37]. In fact, the proximity of the lower urinary tract of females with the perirectal region or fecal contamination from the environment of animals may predispose urinary infections by enterobacteria, including *Klebsiella* species. Similar to bovine mammary infections in this study, the high number of canine UTI cases in the summer period (33.3%) may have been influenced by the increase of rainfall that favors proliferation and environmental contamination of enterobacteria in this period.

Reproductive disorders in domestic males and females constitute another pathogenic manifestation of *K. pneumoniae*-induced infections [6]. Among domestic animals retrospectively studied, seminal vesiculitis (54.1%) and pyometra (34.1%) represented the most frequent reproductive disorders observed among horses and cows, respectively. The possibilities of fecal contamination of genitalia of females and ureteral canal of males, due to proximity with the perirectal region or by fecal contamination from the environment of livestock, are factors that may contribute to ascendent infection of enterobacteria, e.g., *Klebsiella* species, to genital organs of domestic males and females [38]. Also, only three mares and one cow developed abortion, showing that it is an uncommon clinical condition secondary to *K. pneumoniae* infections of the uterus. In this way, atypical coinfection by *Klebsiella oxytoca* and *Rhodococcus equi* has been reported in abortion of thoroughbred mare [39].

Miscellaneous clinical manifestations related to *Klebsiella* sp. were also reported among domestic animals retrospectively assessed, represented by otitis, abscesses, hepatitis, pyodermitis, sepsis, conjunctivitis, and encephalitis. This wide spectrum of pathogenicity of *Klebsiella* species may be credited to its opportunistic behavior, ability to evade the immune system response, and/or the presence of a set of virulence mechanisms, including capsular antigens, adhesins, iron-acquired systems, bacteriocins, serum resistance, lipopolysaccharides of cell wall structure [8, 9], and resistance to conventional antimicrobials [5, 10], indicating that, virtually, any organ or tissue of domestic animals may be infected by this pathogen. Few numbers of sheep, goats, and buffalos retrospectively investigated herein showed clinical diseases associated with *Klebsiella*-induced infections. This data could be attributed to less expressive breeds of these animal species in the studied region.

Fluoroquinolones, aminoglycosides, cephalosporins (third or higher generations), and amoxicillin-clavulanate appear to be the main groups of antimicrobials used in the therapy of domestic animals related to *Klebsiella*-induced infections [6, 7, 31, 37]. Likewise, norfloxacin (74.7%), a fluoroquinolone, and gentamicin (68.5%), an aminoglycoside, were the most effective antimicrobials against *Klebsiella* isolates recovered from most domestic animals retrospectively investigated here, indicating that they may be considered possibilities of drugs to therapy approach against the pathogen in livestock and companion animals. Despite in vitro susceptibility of our isolates to some antimicrobials, poor efficacy has been observed in therapy practices of *K. pneumoniae*-induced infections among domestic animals, particularly clinical bovine mastitis cases [5, 31], sepsis, pneumonia, and complicated UTI in companion animals [7, 36, 37]. The inefficacy of conventional therapy to *K. pneumoniae*-induced infections may be credited to a set of bacterial evasion mechanisms against the antimicrobials, including inactivation of enzymatic degradation of drugs, changes of membrane permeability, and modification of target site of antimicrobials by bacterial mutation [10].

Multidrug-resistant *K. pneumoniae* isolates have been referred as an emergent human [4, 14] and animal [10, 40] global concern [14]. Conversely, few comprehensive studies have been addressed to antibiotic resistance of *Klebsiella* species from a non-human origin [10, 40]. In this regard, in vitro antimicrobial susceptibility pattern of 67 *K. pneumoniae* isolated from domestic and wildlife species from Brazil revealed high resistance of the isolates to metronidazole (65/67 = 97%), ampicillin (65/67 = 97%), amoxicillin (62/67 = 93%), and sulfonamides (62/67 = 93%) [12]. Likewise, high in vitro resistance rates of our *Klebsiella* isolates were observed mainly to ampicillin (91.8%), amoxicillin/clavulanic acid (40.3%), and trimethoprim/sulfamethoxazole (39.7%). Herein, the high resistance of isolates to ampicillin and trimethoprim/sulfamethoxazole may be credited by the rise of selective pressure of resistant bacteria [19] because these drugs have been used for more than 30 years in different veterinary therapy approaches. In turn, high resistance of our isolates to amoxicillin/clavulanic acid obtained from dogs was not expected, because this combination of drugs has been recommended to therapy of *Klebsiella*-induced infections in domestic animals, particularly companion animals [36, 37]. These findings reinforce that antimicrobial therapy of *Klebsiella* infections in domestic animals should be, if possible, based on microbiological culture and in vitro antimicrobial profile, which enables rational use of antimicrobial agents and continuous epidemiological vigilance of multiresistant bacteria [37, 40]. In fact, the responsible use of antimicrobials for therapy approaches of bacterial infections from animal origin is an emergent issue [3, 10],

avoiding unnecessary use of some antimicrobials in animals [41] that are critically important to humans [14].

Approximately 20% of the *Klebsiella* isolates retrospectively investigated in the current study exhibited in vitro simultaneous resistance to ≥ 3 classes of antimicrobials tested, being classified as multidrug-resistant strains. The isolates were recovered predominantly from clinical bovine mastitis (81.1%), urinary tract infections (30.5%), diarrhea (28%), and pneumonia (12.2%) in dogs, and pyometra (31.2%) in horses, which is consistent with other studies published elsewhere, which revealed in vitro resistance pattern and/or poor treatment efficacy of *Klebsiella*-induced infections related to clinical bovine mastitis [5, 31], sepsis [7], pneumonia [36], and complicated UTI in companion animals [37]. In addition, the major MAR index among animals retrospectively studied was seen in cattle, dogs, and horses, indicating that these species may be potential sources of transmission of isolates harboring resistance genes of antimicrobials [20].

The increase transmission of pathogenic bacteria from animal to humans by foods or direct contact represents a worldwide problem and a matter of One Health concept. One Health is a collaborative, multisectoral, and multi-professional worldwide effort aiming to achieve optimal health and well-being outcomes recognizing the interconnections between people, animals, plants, and their environment [42]. Food safety, the control potential zoonotic agents, and multidrug-resistant bacteria are areas particularly relevant in One Health approaches, which includes infections by *Klebsiella* species in domestic animals [14]. Nevertheless, minor attention has been deserved to *Klebsiella* species as a foodborne pathogen [10], besides its presence as a primary agent of bovine mastitis and elimination by milk [5, 31]. In addition, the close contact of owners and their companion animals in modern society increases the risk of interspecies transmissions of pathogens, including by *Klebsiella* species. A study in Portugal described evidence of dogs as a reservoir of pathogenic *K. pneumoniae* to humans, since dogs shared isolates that were genetically indistinguishable based on pulse-field gel electrophoresis and multilocus sequencing typing [43]. In this way, mammary infections of cows and diarrhea and UTIs in dogs were seen as the most common *Klebsiella*-induced infections in the current study, highlighting human risks represented by this pathogen as a contaminant of milk and derivatives, as well as an agent that may be eliminated by feces, urine, and other organic humors of companion animals, potentially infective to their owners due to close contact.

No speciation by the polymerase chain reaction, mass spectrometry (MALDI-TOF MS), or sequencing methods was used to diagnosis *Klebsiella* isolates, which may be considered a limitation of the current study.

Overall, we highlight the variety of clinical manifestations and opportunistic nature of *Klebsiella*-induced infections among domestic animals retrospectively studied, with a predominance of urinary, enteric, mammary, reproductive, and respiratory infections, reinforcing the opportunistic nature of the pathogen. In addition, low in vitro efficacy of some conventional antimicrobial agents was observed, and ~20% of isolates exhibited a multiresistant pattern, which reinforces the need for rational use of antimicrobials in therapy approaches to avoid the increase of bacterial resistance, an emerging One Health issue worldwide.

Acknowledgements The authors thank Professor Paulo Martins da Costa and Inês Couto Rodrigues at Abel Salazar Biomedical Sciences Institute-ICBAS, University of Porto, Portugal, for the critical review of the manuscript. This research was supported by the Sao Paulo Research Foundation (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP), Brazil, grant 2015/19688-8. We thank also the National Council for Scientific and Technological Development (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq), Brazil, for research productivity fellowship (PQ) given to Márcio Garcia Ribeiro.

Author contribution MGR made a substantial contribution to the conceptualization, interpretation of data, and article writing. ABCM, ACA, CADB, CLP, FVRP, GNJ, GHBL, LSAM, LSM, RMR, STG, TSB, AKS, ABB, FJPL, LFGS, and ACP made a substantial contribution to the collection, analysis, and/or interpretation of data. CADB and STG made a substantial contribution to the statistical analysis. All the authors approved and revised critically the final version of the manuscript.

Declarations

Ethics approval This study was carried out in accordance with guidelines for the ethical use of animals approved by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA) of the School of Veterinary Medicine and Animal Sciences, São Paulo State University, UNESP, Botucatu, SP, Brazil (protocol number 0136/2017).

Competing interests The authors declare no competing interests.

References

- Quinn PJ, Markey BK, Leonard FC, Fitzpatrick ES, Fanning S, Hartigan PJ (2011) Veterinary microbiology and microbial diseases, 2nd edn. Wiley-Blackwell, Oxford, p 928p
- Martin RM, Bachman MA (2018) Colonization, infection, and the accessory genome of *Klebsiella pneumoniae*. Front Cell Infect Microbiol 8:1–15
- Yongqiang Y, Higgins CH, Rehman R, Galvao KN, Brito IL, Bicalho ML, Song J, Wang H, Bicalho RC (2019) Genomic diversity, virulence, and antimicrobial resistance of *Klebsiella pneumoniae* strains from cows and humans. Appl Environ Microbiol 85:e02654–e2718
- Bengoechea JA, Sa Pessoa J (2019) *Klebsiella pneumoniae* infection biology: living to counteract host defences. FEMS Microbiol Rev 43:123–144
- Schukken Y, Chuff M, Moroni P, Gurjar A, Santisteban C, Welcome F, Zadoks R (2012) The “other” gram-negative bacteria in mastitis. *Klebsiella*, *Serratia*, and more. Vet Clin North Am Food Anim Pract 28:239–256
- Constable PD, Hinchliff KW, Done S, Gruenberg W (2016) Veterinary medicine: a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs, and goats, 11th edn. Saunders, Philadelphia, p 2278p
- Greene CE (2012) Infectious Diseases of the Dog and Cat. 4th Edition. St. Louis, Saunders Elsevier, 1376p
- Highsmith AK, Jarvis WR (1985) *Klebsiella pneumoniae*: selected virulence factors that contribute to pathogenicity. Infect Contr Hosp Epidemiol 6:75–77
- Lin CT, Wu CC, Chen YS, Chen Y, Lai Y, Chi C, Lin J, Chen Y, Peng H (2011) Fur regulation of the capsular polysaccharide biosynthesis and iron-acquisition systems in *Klebsiella pneumoniae* CG43. Microbiol 157:419–429
- Wareth G, Neubauer H (2021) The animal-foods-environment interface of *Klebsiella pneumoniae* in Germany: an observational study on pathogenicity, resistance development and the current situation. Vet Res 52:16
- Estell KE, Young A, Kozikowski T, Swain EA, Byrne BA, Reilly CM, Kass PH, Aleman M (2016) Pneumonia caused by *Klebsiella* spp. in 46 horses. J Vet Intern Med 30:314–321
- Sousa ATHI, Makino H, Bruno VCM, Candido SL, Nogueira BS, Menezes IG, Nakazato L, Dutra V (2019) Antimicrobial resistance profile of *Klebsiella pneumoniae* isolated from domestic and wild animals. Arq Bras Med Vet Zootec 71:584–593
- Ranjbar R, Kelishadrokhi AF, Chehelgerdi M (2019) Molecular characterization, serotypes and phenotypic and genotypic evaluation of antibiotic resistance of the *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from different types of hospital-acquired infections. Infect Drug Resist 12:603–11
- Effah CY, Sun T, Liu S, Wu Y (2020) *Klebsiella pneumoniae*: an increasing threat to public health. Ann Clin Microbiol Antimicrob 19:1–9
- Alyssa SS, Bajwa RPS, Russo TA (2013) Hypervirulent (hyper-mucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*. Virulence 4:107–118
- Pinzón-Sánchez C, Ruegg PL (2011) Risk factors associated with short-term post-treatment outcomes of clinical mastitis. J Dairy Sci 94:3397–3410
- Clinical and Laboratory Standards Institute-CLSI (2020) Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility test for bacteria isolated from animals (CLSI VET 015). 5th edition. Wayne, PA, 250p
- Clinical and Laboratory Standards Institute-CLSI (2020) Performance standards of antimicrobial susceptibility testing. 30th Edition. Wayne, PA, 332p
- Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, Harbarth S, Hindler JF, Kahlmeter G, Liljequist BO, Paterson DL, Rice LB, Stelling J, Struelens MJ, Vatopoulos A, Weber JT, Monnet DL (2012) Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. Clin Microbiol Infect 18:268–81
- Krumperman PH (1983) Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods. Appl Environ Microbiol 46:165–170
- Ruegg PL (2017) A 100-year review: mastitis detection, management, and prevention. J Dairy Sci 100:10381–10397
- Oliveira L, Hulland C, Ruegg PL (2013) Characterization of clinical mastitis occurring in cows on 50 large dairy herds in Wisconsin. J Dairy Sci 96:7538–7549
- Osman KM, Hassan HM, Orabi A, Abdelhafez AST (2014) Phenotypic, antimicrobial susceptibility profile and virulence factors of *Klebsiella pneumoniae* isolated from buffalo and cow mastitic milk. Pathog Glob Health 108:191–199

24. Cobirka M, Tancin V, Slama P (2020) Epidemiology and classification of mastitis. *Animals* e10:2212
25. Fuenzalida MJ, Ruegg PL (2019) Negatively controlled, randomized clinical trial to evaluate intramammary treatment of nonsevere, gram-negative clinical mastitis. *J Dairy Sci* 102:5438–5457
26. Guerra ST, Orsi H, Joaquim SF, Guimarães FF, Lopes BC, Dalan-ezi FM, Leite DS, Langoni H, Pantoja JCF, Rall VLM, Hernandez RT, Lucheis SB, Ribeiro MG (2020) Investigation of extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* virulence genes, bacterial motility, and multidrug resistance pattern of strains isolated from dairy cows with different severity scores of clinical mastitis. *J Dairy Sci* 103:3606–3614
27. Silva N, Costa GM (2001) An outbreak of acute bovine mastitis caused by *Klebsiella pneumoniae* in a dairy herd. *Arq Bras Med Vet* 53:1–5
28. Paulin-Curlee GG, Singer RS, Sreevastan S, Isaacson R, Reneau J, Foster D, Bey R (2007) Genetic diversity of mastitis-associated *Klebsiella pneumoniae* in dairy cows. *J Dairy Sci* 90:3681–3689
29. Munoz MA, Welcome FL, Schukken YH, Zadoks RN (2007) Molecular epidemiology of two *Klebsiella pneumoniae* mastitis outbreaks on a dairy farm in New York State. *J Clin Microbiol* 45:3964–3971
30. Schukken YH, Bennett GJ, Zurakowski MJ, Sharkey HL, Rauch BJ, Thomas MJ, Ceglowski B, Saltman RL, Belomestnykh N, Zadoks RN (2011) Randomized clinical trial to evaluate the efficacy of 5-day ceftiofur hydrochloride intramammary treatment on nonsevere gram-negative clinical mastitis. *J Dairy Sci* 94:6203–6215
31. Klaas IC, Zadoks RN (2018) An update on environmental mastitis: challenging perceptions. *Transb Emerg Dis* 65(suppl. 1):166–185
32. Tomazi T, Tomazi ACC, Silva JCC, Brighenti L, Bravo MLMC, Rodrigues MX, Bicalho RC (2021) Immunization with a novel recombinant protein (*YidR*) reduced the risk of clinical mastitis caused by *Klebsiella* spp. and decreased milk losses and culling risk after *Escherichia coli* infections. *J Dairy Sci* 104:4787–4802
33. Olivo G, Lucas TM, Borges AS, Silva ROS, Lobato FCF, Siqueira AK, Leite DS, Brandão PE, Gregori F, de Oliveira-filho JP, Takai S, Ribeiro MG (2016) Enteric pathogens and coinfections in foals with and without diarrhea. *Biomed Res Intern* e:1–12
34. Gizzi ABR, Oliveira ST, Leutenegger CM, Estrada M, Kozem-jakin DA, Stedile R, Marcondes M, Biondo AW (2014) Presence of infectious agents and co-infections in diarrheic dogs determined with a real-time polymerase chain reaction-based panel. *BMC Vet Res* 10:23
35. Saevik BK, Skancke EM, Trangerud C (2012) A longitudinal study on diarrhoea and vomiting in young dogs of four large breeds. *Acta Vet Scand* 54:8
36. Viesion MD, Piñero P, LeRoith T (2012) A review of the pathology and treatment of canine respiratory infections. *Vet Med Res Rep* 3:25–39
37. Byron JK (2019) Urinary tract infection. *Vet Clin Small Anim* 49:211–221
38. Siqueira AK, Ribeiro MG, Leite DS, Tiba MR, Moura C, Lopes MD, Prestes NC, Salerno T, Silva AV (2009) Virulence factors in *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infection and pyometra cases and from feces of healthy dogs. *Res Vet Sci* 86:206–210
39. Gressler LT, Kowalski AP, Balzan C, Tochetto C, Botton SA, Ribeiro MG, Vargas AC (2014) Coinfection by avirulent *Rhodococcus equi* and *Klebsiella oxytoca* as a cause of atypical abortion in a thoroughbred mare. *JMM Case Rep* 1:e001768–e001768
40. Siqueira AK, Alves TS, Franco MMJ, Ferraz MMG, Riboli DFM, de Paula CL, da Cunha MLRS, Ribeiro MG, Leite DS (2020) Multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* phylogroup KPI in dogs and horses at Veterinary Teaching Hospital. *Vet Med Public Health J* 1:41–47
41. Ribeiro MG, Riseti RM, Bolaños CAD, Caffaro KA, de Moraes ACB, Lara GHB, Zamprogna TO, Paes AC, Listoni FJP, Franco MMJ (2015) *Trueperella pyogenes* multispecies infections in domestic animals: a retrospective study of 144 cases (2002 to 2012). *Vet Quart* 35:1–6
42. Couto RM, Brandespim DF (2020) A review of the One Health concept and its application as tool for police-markers. *Intern J One Health* 6:83–89
43. Marques C, Belas A, Aboim C, Cavaco-Silva P, Triguero G, Gama LT, Pomba C (2019) Evidence of sharing of *Klebsiella pneumoniae* strains between health companion animals and cohabiting humans. *J Clin Microbiol* 57:1–12.e01537-18

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Authors and Affiliations

Márcio Garcia Ribeiro^{1,2}  · Amanda Bonalume Cordeiro de Moraes¹ · Ana Carolina Alves¹ · Carmen Alicia Daza Bolaños³ · Carolina Lechinski de Paula¹ · Fábio Vinicius Ramos Portilho¹ · Geraldo de Nardi Júnior⁴ · Gustavo Henrique Batista Lara¹ · Lorrayne de Souza Araújo Martins¹ · Lucieny Sierra Moraes¹ · Rafaela Mastrangelo Riseti¹ · Simony Trevizan Guerra¹ · Thaís Spessotto Bello¹ · Amanda Keller Siqueira¹ · Amanda Bezerra Bertolini¹ · Carolina Aparecida Rodrigues¹ · Natália Rodrigues Paschoal¹ · Beatriz Oliveira de Almeida¹ · Fernando José Paganini Listoni¹ · Luísa Fernanda García Sánchez¹ · Antonio Carlos Paes¹

¹ Department of Animal Production and Preventive Veterinary Medicine, Sao Paulo State University-UNESP, Botucatu, SP, Brazil

² School of Veterinary Medicine and Animal Science, São Paulo State University-UNESP, Botucatu, SP 18618-681, Brazil

³ Department of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine and Animal Sciences, Antonio Nariño University, Bogota, Colombia

⁴ Technology Faculty, FATEC, Botucatu, SP, Brazil

ANEXOS

ANEXO 1



ATESTADO

Atesto que o Projeto "Identificação fenotípica e genotípica de *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemases (KPC) em diferentes afecções de cães e gatos." **Protocolo CEUA 0197/2018**, a ser conduzido por Carolina Lechinski de Paula, responsável/orientador Márcio Garcia Ribeiro, para fins de pesquisa científica/ensino - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA.

Finalidade	PESQUISA CIENTÍFICA
Vigência do projeto	15/09/2018 a 04/03/2019
Nome Comum / Espécie / Linhagem	//
Raça	
Nº de animais machos	0
Nº de animais fêmeas	0
Nº de animais sexo indefinido	0
Peso médio de animais machos	0
Peso médio de animais fêmeas	0
Peso médio de animais sexo indefinido	0
Idade	ano(s) e 0 mes(es) e 0 dia(s).
Procedência	cães e gatos

Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEUA em 12/09/2018

JOSÉ NICOLAU PRÓSPERO PUOLI FILHO
Presidente da CEUA da FMVZ, UNESP - Campus de Botucatu