

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ – UNIOESTE
CAMPUS DE CASCAVEL
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AGRÍCOLA

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE BACTÉRIAS
MULTIRRESISTENTES EM EFLUENTE NÃO TRATADO DE UM HOSPITAL NO BRASIL**

MONICA TEREZA SULDOFSKI

CASCAVEL- PR

2021

MONICA TEREZA SULDOFSKI

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE BACTÉRIAS
MULTIRRESISTENTES EM EFLUENTE NÃO TRATADO DE UM HOSPITAL NO BRASIL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Agrícola, em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Doutor em Engenharia Agrícola, área de concentração em Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Ralpo Rinaldo dos Reis
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Rita de Cássia Garcia Simão

CASCADEL- PR

2021

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Suldofski, Mônica Tereza

Caracterização fenotípica e identificação molecular de bactérias multirresistentes em efluente não tratado de um hospital no Brasil / Mônica Tereza Suldofski; orientador Ralpo Rinaldo dos Reis; coorientadora Rita de Cássia Garcia Simão. -- Cascavel, 2021.

87 p.

Tese (Doutorado Campus de Cascavel) -- Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, 2021.

1. KPC. 2. ESBL. 3. Carbapenêmicos. 4. Resistência antimicrobianos. I. Rinaldo dos Reis, Ralpo , orient. II. Garcia Simão, Rita de Cássia , coorient. III. Título.

MÔNICA TEREZA SULDOFSKI

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE BACTÉRIAS MULTIRRESISTENTES EM EFLUENTE NÃO TRATADO DE UM HOSPITAL NO BRASIL

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Doutora em Engenharia Agrícola, área de concentração Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental, linha de pesquisa Saneamento Ambiental, APROVADA pela seguinte banca examinadora:



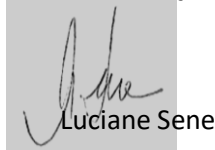
Orientador - Ralpho Rinaldo dos Reis

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Cascavel (UNIOESTE)



Vagner Fagnani Linartevichi

Centro Universitário da Fundação Assis Gurgacz (FAG)



Luciane Sene

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Cascavel (UNIOESTE)



Valdir Mano

Universidade Federal de São João Del-Rei



José Luis da Conceição Silva

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Cascavel (UNIOESTE)

Cascavel, 28 de outubro de 2021.

BIOGRAFIA

Monica Tereza Suldotski, natural de Nova Aurora, Paraná, Brasil, nascida no dia 23 de outubro de 1971, formou-se no curso de Farmácia e Bioquímica da Universidade Estadual de Ponta Grossa, Paraná – UEPG, em 1992. Possui mestrado em Ciências no Programa de Pós-Graduação de Engenharia Elétrica e Informática Industrial, área de concentração Engenharia Biomédica pelo Instituto Federal do Paraná (CEFET), no ano de 2003. Atualmente, ministra aulas na disciplina de Bioquímica Clínica do curso de Farmácia da Universidade Estadual do Oeste do Paraná- UNIOESTE, campus de Cascavel. Tem experiência na área de Análises Clínicas, atuando principalmente nos seguintes temas: Controle de Qualidade em Laboratório Clínico e Análises Gasométricas. Ingressou no Programa de Pós-graduação stricto sensu em nível de doutorado no Programa De Pós-Graduação em Engenharia Agrícola (PGEAGRI), área de concentração Recursos Hídricos e Saneamento ambiental da Universidade Estadual do Oeste do Paraná- UNIOESTE, campus de Cascavel, no ano de 2018. Desenvolve tese junto à linha de Prospecção de Microrganismos e Substâncias Bioativas com Aplicações Biotecnológicas e em Saúde, orientada pela Professor Dr. Ralplo Rinaldo dos Reis e coorientada pela Professora Dra. Rita de Cassia Garcia Simão. Atualmente, é coordenadora do curso de Farmácia da Universidade Estadual do Oeste do Paraná- UNIOESTE, campus de Cascavel.

AGRADECIMENTOS

Desde o início até esse momento em que concluo este trabalho de Tese de Doutorado, sempre tive a ajuda e incentivo de muitas pessoas, assim, sou muito grata. Posso dizer que contei com o incentivo e disposição de pessoas muito especiais, que estiveram presentes nessa caminhada. Agradeço a DEUS, por mais essa conquista. Sou imensamente grata à minha família, que sempre foi minha base e meu alicerce. Os valores passados, desde a infância, que perduram por esses 50 anos de vida, foram primordiais para que eu me tornasse quem sou e pudesse me encontrar no caminho profissional. Meus pais, Vanir e Geraldo, foram e são os pontos-chaves desse processo de crescimento pessoal e profissional. Gostaria de agradecer também ao meu esposo Marcos, pelo companheirismo, amizade e pela convivência diária, paciência e compreensão; pelas vezes em que não pude estar presente devido à realização deste trabalho! Agradeço também aos meus filhos, Carolina e Gustavo (sim, uma dupla), que sempre me acompanharam e sempre foram companheiros da mamãe. Sei que sozinha eu não teria forças suficientes para chegar hoje até aqui. Amo vocês! Agradeço à minha cunhada, Silvana Tomazelli, pela ajuda especial neste projeto!!!! Agradeço à Prof^a Dr^a Rita de Cassia Garcia Simão, que foi minha primeira orientadora, hoje coorientadora, por ter me incentivado e ter acreditado no meu potencial; sem os seus questionamentos e experiências, teria sido muito mais difícil chegar até esse momento. Agradeço, de forma especial, aos profissionais do Laboratório de Microbiologia do HUOP, local onde estive diariamente presente por muitas vezes; às Bioquímicas, Monique da Silva Picolotto e Sulem Bassam Brandt, Prof^a Luzia Neri Cosmo e Prof^a Nereida Mello da Rosa Gioppo, bem como a todos os estagiários. Agradecimento especial ao técnico de laboratório, Algemiro de Oliveira, pelo auxílio na coleta das amostras, e à Prof Dr^a Simone Damaceno Gomes, pelas orientações referentes ao processo de coleta das amostras. Agradeço também ao Professor Paulino Yassuda Filho, chefe do Laboratório de Análises Clínicas do HUOP. Agradeço à Bioquímica, Arlete Munaro, da 10^a Regional de saúde, pelo envio das amostras ao Laboratório Central do Paraná (LACEN/PR). Gostaria de agradecer especialmente à Dr^a Lavinia Nery Villa Stangler Arend LACEN/PR, pela realização do sequenciamento genético. Agradeço, de maneira especial, ao meu orientador Professor Dr. Ralpho Rinaldo dos Reis, primeiro como professor, momento em que decidimos pela escolha do tema para realização deste trabalho, e depois como orientador: muito obrigada!!!

Muito obrigada!

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE BACTÉRIAS MULTIRRESISTENTES EM EFLUENTE NÃO TRATADO DE UM HOSPITAL NO BRASIL

RESUMO

Suldofski, Mônica Tereza. **Caracterização fenotípica e identificação molecular de bactérias multirresistentes em efluente não tratado de um hospital no Brasil**. Orientador: Ralpho Rinaldo dos Reis; Coorientadora: Rita de Cássia Garcia Simão. 2021. 87f. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel – Paraná, 2021.

Nas últimas décadas, as bactérias da família Enterobacteriaceae têm adquirido um papel cada vez mais importante nas infecções hospitalares devido à sua prevalência e altos índices de resistência a antimicrobianos associados à mortalidade. Essa resistência, devido à produção de carbapenemase, é reconhecida mundialmente como um grande problema emergente para pacientes hospitalizados, por conta da localização de genes em elementos transferíveis, facilitando sua disseminação. O objetivo deste trabalho foi caracterizar, fenotípica e geneticamente, enterobactérias produtoras de carbapenemase em efluentes hospitalares não tratados. Foram realizadas coletas sazonais do verão à primavera de 2019, considerando a ausência de chuva para a sua realização. A análise fenotípica identificou 30 cepas; dentro desses grupos, foi possível registrar cinco espécies, distribuídas em oito cepas identificadas ao longo do ano, que expressaram β -lactamases de espectro estendido (ESBLs). Além disso, entre as ESBLs registradas, quatro apresentaram perfil de resistência bla_{KPC} . A identificação genotípica, pela técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), detectou uma cepa de *K. pneumoniae* ssp. *pneumoniae* isolada no outono, a qual apresentou um fenótipo positivo para ESBL. A cepa de *K. pneumoniae* ssp. *Pneumoniae*, isolada na amostra de verão, apresentou resistência aos carbapenens (Meropenem, Ertapenem e Imipenem), em que a carbapenemase foi codificada pelo gene bla_{KPC} , além de produzir ESBL. No período do outono, foi isolada uma cepa com características fenotípicas de *Enterobacter cloacae*, com perfil de resistência ao ertapenem, meropenem e ao imipenem; o perfil genotípico detectado foi carbapenemase, codificada pelo gene bla_{KPC} . No inverno, foi isolada uma cepa de *klebsiella oxytoca* e *Escherichia coli*, ambas resistentes aos carbapenens, codificada pelo gene bla_{KPC} , em que o isolado continha o gene bla_{KPC} . Com base neste estudo, pudemos detectar a presença do gene bla_{KPC} entre espécies de enterobactérias. Além disso, pode estar sendo carregado com outros determinantes de resistência, dificultando ainda mais o tratamento do ambiente hospitalar. O aparente predomínio de algumas linhagens multirresistentes em todo o mundo enfatiza a importância de elucidar o modo de disseminação e a epidemiologia de isolados de bactérias multirresistentes em hospitais, em nível regional, nacional e em escala global. Este estudo também sustenta a hipótese de que esgotos hospitalares não tratados podem atuar como reservatórios de bactérias multirresistentes, clinicamente importantes, constituindo um risco potencial à saúde humana e animal.

Palavras-chave: KPC. ESBL. Carbapenêmicos. Resistência antimicrobianos.

PHENOTYPIC CHARACTERIZATION AND MOLECULAR IDENTIFICATION OF MULTIDRUG-RESISTANT BACTERIA IN UNTREATED EFFLUENT FROM A HOSPITAL IN BRAZIL

ABSTRACT

Suldofski, Mônica Tereza. **Phenotypic characterization and molecular identification of multidrug-resistant bacteria in untreated effluent from a hospital in Brazil.** Advisor: Ralpho Rinaldo dos Reis; Co-Advisor: Rita de Cássia Garcia Simão. 2021. 87f. Thesis (PhD Programme in Agricultural Engineering) – Western Paraná State University, Cascavel – Paraná, 2021.

In recent decades, bacteria of the Enterobacteriaceae family have acquired an increasingly important role in hospital infections due to their prevalence and high rates of antimicrobial resistance associated with mortality. This resistance due to carbapenemase production is recognized worldwide as a significant emerging problem for hospitalized patients due to the localization of genes in transferable elements, facilitating their spread. This study aimed to characterize phenotypically and genetically carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in untreated hospital wastewater. Seasonal collections were performed from summer to spring 2019, considering the absence of rain for its realization. The phenotypic analysis identified 30 strains, from which it was possible to register five species, distributed in eight strains identified throughout the year, that expressed extended-spectrum β -lactamases (ESBLs). Moreover, among the ESBLs registered, four presented a blaKPC resistance profile. Genotypic identification by Polymerase Chain Reaction (PCR) technique detected one strain of *K. pneumoniae* ssp. *pneumoniae* isolated in the fall, which showed a positive phenotype for ESBL. The strain of *K. pneumoniae* ssp. *pneumoniae* isolated in the summer sample showed resistance to carbapenems (Meropenem, Ertapenem, and Imipenem), where the blaKPC gene encoded the carbapenemase in addition to producing ESBL. In the fall period, a strain with phenotypic characteristics of *Enterobacter cloacae* with a resistance profile to Ertapenem, Meropenem, and Imipenem was isolated. In this case, the genotypic profile detected was carbapenemase encoded by the blaKPC gene. In winter, a strain of *Klebsiella oxytoca* and *Escherichia coli* were isolated, both resistant to carbapenems encoded by the blaKPC gene. Through this study, we detected the presence of the blaKPC gene among enterobacterial species. In addition, it may be being carried with other resistance determinants, increasing the difficulty in treating the hospital environment. The apparent predominance of some multidrug-resistant strains worldwide emphasizes the importance of elucidating the mode of dissemination and epidemiology of multidrug-resistant bacterial isolates in hospitals on a regional, national, and global scale. This study also supports the hypothesis that untreated hospital effluent may act as reservoirs for clinically meaningful multidrug-resistant bacteria, posing a potential risk to human and animal health.

Keywords: KPC. ESBL. Carbapenems. Antimicrobial resistance.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	18
2.1 OBJETIVO GERAL	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA	20
3.1.1 Modificação dos alvos gênicos	22
3.1.2 Inativação de antimicrobianos.....	23
3.1.3 Efluxo ativo	23
3.2 DEGRADAÇÃO DA DROGA	25
3.2.1 β -lactâmicos	25
3.2.2 β -lactamases	27
3.3 <i>KLEBSIELLA PNEUMONIAE</i>	29
3.3.1 Resistência aos antimicrobianos em <i>K. pneumoniae</i>	30
3.3.2 Aspectos Moleculares do Gene <i>bla_{KPC}</i>	38
3.4 TESTES MOLECULARES	43
3.5 EFLUENTES HOSPITALARES.....	44
4 MATERIAIS E METODOS	46
4.1 CARACTERIZAÇÃO DA ESTAÇÃO DE ESGOTO E AMOSTRAGEM	46
4.1.1 Área de estudo	48
4.2 METODOLOGIAS DE TIPAGEM DE <i>K. PNEUMONIAE</i>	48
4.3 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO	49
4.3.1 Culturas bacterianas	49
4.4 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA.....	50
4.4.1 Identificação e teste de suscetibilidade aos antimicrobianos por MIC ($\mu\text{g/mL}$).....	50
4.5 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DAS CEPAS.....	52
4.5.1 Identificação da presença do gene <i>bla_{KPC}</i> e <i>bla_{NDM}</i>	52
4.6 PCR EM TEMPO REAL qRT-PCR.....	53
4.6.1 Validação do método.....	53
4.6.2 Controles para qRT-PCR.....	53
4.6.3 Realização do ensaio de triagem por PCR do gene <i>bla</i>	54
4.6.4 Análise dos dados	54
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
5.1 PERFIL FENOTÍPICO	55

<i>5.1.1 Perfis de suscetibilidade e resistência das cepas isoladas aos carbapenêmicos.....</i>	<i>62</i>
5.2 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR	64
5.3 DISCUSSÃO.....	66
6 CONCLUSÃO.....	71
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
ANEXO A: TERMO DE CIÊNCIA DO RESPONSÁVEL PELO CAMPO DE ESTUDO	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Classificação dos principais antimicrobianos disponíveis para tratamento de infecções bacterianas.....	25
Tabela 2 Classificação das β -lactamases segundo Bush e Jacoby (2010).....	31
Tabela 3 Caracterização das cassetes montadas para as bactérias Gram-negativas e Gram-positivas.....	51
Tabela 4 Oligonucleotídeos utilizados para identificação molecular.....	53
Tabela 5 distribuição das cepas identificadas de acordo com a estação do ano.....	56
Tabela 6 Interpretação da concentração inibitória mínima (MIC) de acordo com o CLSI 2019 para antimicrobianos utilizados para enterobactérias	56
Tabela 7 Frequência de resistência aos antimicrobianos das cepas isoladas de cada um dos microrganismos e a respectiva estação do ano correspondente a coleta do material cultivado SC: Suscetibilidade; MIC: concentração inibitória mínima; out: outono; in: inverno; prim: primavera; ver: verão.....	58
Tabela 8 Interpretação da concentração inibitória mínima (MIC) de acordo com o CLSI 2019 para antimicrobianos da classe dos carbapenems.....	62
Tabela 9 Cepas produtoras de ESBL identificadas fenotipicamente no efluente não tratado do HUOP.....	62
Tabela 10 Perfil fenotípico de resistência aos carbapenêmicos das cepas KPC isoladas no efluente não tratado do HUOP.....	62
Tabela 11 Suscetibilidade aos antimicrobianos e concentração inibitória mínima (MIC) para os isolados com perfil ESBL	63
Tabela 12 Perfil fenotípico realizado pelo sistema VITEK-2 versus perfil genotípico pelo método RT-PCR. R: Resistente	64

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Resistência aos antimicrobianos versus mecanismo de atividade antimicrobiana.	21
Figura 2: Mecanismos intrínsecos de resistência (BLAIR, 2014)	22
Figura 3: Estrutura da penicilina comparada (superior) com as cefalosporinas (inferior).	26
Figura 4: Esquema representativo do Transposon Tn4401, elemento genético que tem sido associado ao gene bla _{KPC} -2.....	39
Figura 5: Gene bla _{KPC}	40
Figura 6: Mapa linear mostrando a estrutura genética dos plasmídeos circulares pACM1, pARM26 e pIGT15.....	42
Figura 7: Mapa circular do plasmídeo pEh1A do IncFIIK de <i>Enterobacter hormaechei</i>	43
Figura 8: Ponto de coleta do esgoto do Hospital Universitário do Oeste do Paraná (HUOP), sendo a) visão superior da saída do efluente e os resíduos com vazamento; b) outro ângulo da mesma saída mostrando a proximidade com o estacionamento do vazamento; c) ângulo da mesma saída mostrando a proximidade com as instalações prediais do Hospital; d) coordenadas com a localização do ponto de coleta.....	47
Figura 9: mapa de localização do rio das antas (Pertencente a Bacia do Paraná 3) e do Hospital Universitário do Oeste do Paraná (HUOP), localizados no município de Cascavel – PR, Brasil.....	48
Figura 10: Diluição e Crescimento	49
Figura 11: Cultivo de bactérias Gram-negativas.	50
Figura 12: Gráfico de Frequência absoluta do número de microrganismos isolados por estação do ano.....	55
Figura 13: Distribuição dos genes bla _{KPC}	64

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABC: Cassete ligação a ATP
AMES: Enzimas Modificadoras de Aminoácidos
AMI: Acimacina;
AMP: Ampicilina;
Ampc: Adenorina Monofosfato Cíclico
ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AR: Resistência Antimicrobiana
ASB: Ampicilina/Sulbactam;
ATP: Trifosfato de adenosina
BHI: Brain Heart Infusion
BLA: β -lactamases
CATs: Chloramphenicol Acetyltransferases
CAZ: Ceftazidima;
CDC: Centros de Controle e Prevenção de Doenças
CFO: Cefoxitina;
CIP: Ciprofloxacina;
CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute
COL: Colistina.
CPM: Cefepima;
CRO: Ceftriaxona;
CRX: Cefuroxima axetil;
CTX-M: Cefotaxina
DNA: Ácido desoxirribonucleico
ERT: Ertapenem;
ESBL: β -lactamases de espectro estendido
ETAR: Estação de tratamento de águas residuais
GEN: Gentamicina;
GES: Guiana Extended Spectrum
GIM: Global Index Medicus
HGT: Transferência Horizontal de Genes
HLGR: Resistência de Alto Nível a Gentamicina
HLSR: Resistência de Alto Nível a Estreptomicina
HUOP: Hospital Universitário do Oeste do Paraná
IMI: Imipenem hydrolising β -lactamase

IMP: Imipenemose
InA: Integron de classe 1 A
InB: Integron de classe 1 B
Inc: Grupo de Incompatibilidade Plasmidial
IPM: Imipenem;
kb: Kilobase
KPC: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase
LACEN-PR: Laboratório Central do Estado do Paraná
MATE: Efluxo de multidrogas e moléculas tóxicas
MBL: Metallo- β - lactamase
MDR: Microrganismos resistentes à múltiplas drogas
MF: Facilitador Maior
MIC: Concentração Inibitória Mínima
MLST: Multilocus Sequence Typing
MPM: Meropenem;
NDM: New Delhi Metallo- β -lactamase
NMC Not Metalloenzyme Carbapenemase
NMC: Not metalloenzyme carbapenemase
OMP: Diminuição da Expressão de Porinas
OMS: Organização Mundial da Saúde
OXA: Oxacilinase
pAmpc: Plasmid-mediated
PAR: Sistema de particionamento
pb: Pares de base
PBP: Proteínas Ligantes de Penicilina
PME: *Pseudomonas aeruginosa*
PTZ: Piperacilina/Tazobactam;
R1 : Radical 1
R2: Radical 2
REP: Sistema de replicação
RND: Resistência, Modulação e Divisão
rRNA: ribonucleic acid
SC: Suscetibilidade
SAMMED: Sistema de Acompanhamento de Mercado de Medicamentos
SME: *Serratia marcescens* Enzima
SMR: Pequena Multirresistência
STM: Sulphide Indole Mokility

tetM: Tetracycline resistance protein

TIG: Tigeciclina;

tnpA: transportasse

tnpR: resolvase

TRA: Sistema de transferência conjugal

TSA: Teste de Suscetibilidade aos Antimicrobianos

UASB: Reator anaeróbico de fluxo ascendente de alta resistência

UTI: Unidade de Terapia Intensiva

VIM: Verona imipenemase

VITEK-2: Sistema Automatizado de Identificação Microbiana

VRE: Enterococcus resistentes à vancomicina

XDR: Microrganismos extensivamente resistentes a drogas

1 INTRODUÇÃO

Este planeta e sua população enfrentam um número crescente de desafios. Eles são tão diversos quanto nossas culturas e ambientes, mas todos podem ser abordados com base em uma combinação de ciência, política e ação. O consumo desenfreado de bens e serviços transforma o meio ambiente, provocando o aparecimento de novas doenças, o que faz com que a ciência busque combatê-las, desenvolvendo medicamentos mais eficientes.

A descarga de resíduos municipais hospitalares, agrícolas e industriais no meio ambiente faz com que a concentração de antibióticos, em muitos rios, sedimentos e solo seja elevada, o que impulsiona a evolução de bactérias resistentes. Sendo assim, é necessário que os governos, o setor empresarial e a sociedade civil enfrentem essas ameaças emergentes à saúde deste planeta e de sua população.

Medicamentos antibióticos são usados em todo o mundo para tratar e prevenir infecções bacterianas em humanos, animais e até plantas. Eles também têm sido amplamente usados como promotores de crescimento para aumentar a produção de carne. Enquanto o uso indevido de antibióticos, em práticas médicas e agrícolas, estiver ligado ao aumento da resistência, o papel do ambiente natural, no surgimento e disseminação dessa recusa, irá receber relativamente pouca atenção.

A resistência aos antimicrobianos pode ser intrínseca ou adquirida. Resistência adquirida pode ocorrer por meio de uma mutação no DNA das bactérias ou com base na aquisição de genes de resistência pela transferência horizontal, ou seja, quando o DNA se “move” de uma bactéria para a outra. Resistência adquirida ocasiona a falha nos tratamentos de infecções em ambientes clínicos e veterinários e é atualmente um assunto que causa preocupação.

Quando começaram a formar-se os aglomerados populacionais, as águas de uso doméstico, hoje comumente chamadas de esgoto sanitário, tornaram-se uma preocupação. A água que não recebe tratamento adequado é um veículo de proliferação de parasitas e microrganismos causadores de doenças, o que evidencia grande risco à saúde da população que a consome.

O desenvolver da sociedade e o aumento do número de estabelecimentos de saúde, responsáveis pelo tratamento das mais variadas enfermidades, fez com que aumentasse a produção de efluentes a serem descartados. Se não houver o correto tratamento antes do despejo nos corpos hídricos, esse efluente contaminará tais recursos. Atualmente, a preocupação com relação à problemática dos resíduos líquidos está crescendo, porém, constata-se que a bibliografia que aborda o tratamento e destino de efluentes está focada nos efluentes de origem doméstica e industrial.

O tratamento de efluentes hospitalares deve ser realizado buscando qualidade e padrão definido por normativas pré-estabelecidas, usando os níveis de tratamento e eficiência necessários. O efluente hospitalar gera um impacto silencioso, que carece de fiscalização, em que são necessárias medidas de gestão para reduzir seus efeitos. A matéria é polêmica e os danos ambientais são evidentes, devendo o Poder Público encontrar mecanismos para minimizar os efeitos dessa espécie de efluente, sobre o meio ambiente e a Saúde Pública. É necessário o estímulo à pesquisa de instrumentos que minimizem esse impacto, visando à importância do desenvolvimento do bem-estar social, que provém do tratamento prévio desses resíduos.

Os antimicrobianos e os seus metabólitos são excretados com a urina e as fezes em águas residuais. A baixa eficácia do tratamento hospitalar de esgoto ou a falta de qualquer tratamento podem contribuir para a difusão de bactérias multirresistentes de efluentes hospitalares para o esgoto municipal, bem como para o meio ambiente por meio dos corpos hídricos.

Na última década, a resistência a antimicrobianos tem sido frequente nas unidades hospitalares e fora delas. A disseminação das cepas produtoras de enzimas relacionadas às β -lactamases de espectro estendido (ESBL) tem sido reportada como uma preocupação mundial devido ao aumento da morbimortalidade. Estudos, para a elucidação da diversidade e prevalência de bactérias produtoras de ESBLs, em ambientes clínicos e destes para os efluentes hospitalares, tornam-se necessários à compreensão dos mecanismos de disseminação dos genes de resistência no meio ambiente, à geração de efluentes e sua liberação. Concentrações elevadas de cepas ESBL positivas, nos efluentes dos hospitais e nas estações de tratamento de esgoto, podem transformá-los em reservatórios para a seleção de bactérias resistentes.

A identificação dos genes de resistência, principalmente dos carbapenems, é fundamental para determinar o perfil da multirresistência prevalente na nossa região. A caracterização dos diferentes genes entre as cepas produtoras de betalactamase permitirá a análise da ocorrência e frequência desses genes, nos efluentes, em comparação com dados de pesquisas realizadas em outros estados e países. Esses dados podem gerar subsídios para discussões sobre o uso racional dos antimicrobianos, além das instituições de saúde e o comportamento dessa transição entre o ambiente hospitalar e o meio ambiente. Além disso, possibilitará propor medidas visando à diminuição da contaminação ambiental por meio de tratamento dos resíduos hospitalares, anteriormente à destinação à estação de tratamento, objetivando métodos eficazes e seguros para a sua eliminação.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo foi investigar o fenótipo e o genótipo relacionados ao padrão de resistência à ESBL e carbapenemases do tipo KPC e NDM, em amostras de efluente não tratado, provenientes de um hospital público no Brasil, durante as quatro estações do ano de 2019.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a identificação fenotípica das cepas bacterianas isoladas;
- Analisar os isolados bacterianos quanto ao perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos com perfil de resistência as betalactamases e aos carbapenêmicos imipenem, meropenem e ertapenem.
- Investigar a presença dos genes *bla*_{KPC} e *bla*_{NDM} por técnicas de biologia molecular RT-PCR.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A dispersão de bactérias hospitalares no meio ambiente é uma séria preocupação clínica e de saúde pública em todo o mundo (ROCA *et al.*, 2015). O uso irrestrito de antimicrobianos na agricultura, pecuária e medicina humana e veterinária causou uma ampla resistência antimicrobiana (AR) entre bactérias clinicamente importantes, que pode encontrar o seu caminho em ambientes aquáticos (MARSHALL; LEVY, 2011).

Ambientes aquáticos têm sido diretamente afetados por descargas de grandes quantidades de águas residuais urbanas, resíduos animais e efluentes hospitalares (FINLEY *et al.*, 2013; BAJAJ, 2015), em que a presença de bactérias multirresistentes (MDR) constitui um importante problema de saúde pública (BEN SAID *et al.*, 2016). Consequentemente, nas áreas urbanas, esses ambientes podem atuar como reservatórios de MDR e bactérias virulentas, contribuindo para a dissipação entre humanos e animais (MONTEZZI *et al.*, 2015; ARAÚJO *et al.*, 2016; RODRIGUES *et al.*, 2016). Além disso, os ecossistemas aquáticos são ideais para a troca de material genético entre espécies bacterianas, o que, de fato, auxilia a disseminação de genes de resistência a patógenos clinicamente significativos (BERGLUND, 2015). No Brasil, o maior país da América do Sul, têm sido relatados os sintomas clínicos relacionados a bactérias produtoras de β -lactamase pertencentes a linhagens hospitalares, em águas residuais, poluídas e águas costeiras de recreio, com um aumento constante nos últimos anos (MONTEZZI *et al.*, 2015).

Bactérias resistentes têm elevado potencial de disseminação, seja em instituições de saúde ou na comunidade e no ambiente, fazendo com que seja cada vez mais complexo controlar infecções. A disseminação de bactérias resistentes pode causar problemas diversos em ambientes propensos à aglomeração, em especial, em hospitais e ambulatórios. Com a mobilidade da população, a qual gera uma disseminação de patógenos para diferentes regiões, o controle dessas bactérias torna-se ainda mais complexo, pois tornam possível que mecanismos de resistência se espalhem mundialmente (DZIDIC; KOS, 2008). Outro fator que intensifica a formação de resistência das bactérias é o uso de antimicrobianos como promotores de crescimento em animais de criação intensiva e a disponibilidade restrita de saneamento básico para a população mundial (LANDERS *et al.*, 2012; FLETCHER, 2015).

A resistência aos antimicrobianos ocorre quando o fármaco deixa de ter capacidade de provocar a morte da população bacteriana ou de controlar sua multiplicação. Esse fenômeno de perda de capacidade pode ocorrer quando uma bactéria possui ou adquire características fenotípicas e genotípicas específicas, como mecanismos de resistências naturais ou adquiridos, deixando, assim, de ser suscetível a determinado antibiótico ou agente quimioterapêutico. Além disso, muitas vezes, a perda de suscetibilidade ocorre devido ao uso incorreto e/ou excessivo da terapêutica antimicrobiana (NIKAIDO, 2010; SAVAGE, 2017). As

bactérias podem ser resistentes a determinado antibiótico, de forma natural ou por meio da aquisição de resistência. A resistência é consequência de características estruturais e funcionais específicas de cada bactéria, porém, pode ser adquirida por meio de mutações em genes cromossomais ou aquisição de novo material genético (BLAIR *et al.*, 2015).

3.1 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA

Os antimicrobianos disponíveis geralmente se enquadram em uma das seguintes classes: penicilinas, cefalosporinas, macrolídeos, fluoroquinolonas, sulfonamidas, tetraciclina e aminoglicosídeos. Com a rápida e elevada expansão de espécies patogênicas resistentes aos antimicrobianos um ou mais desses tiveram uma significativa diminuição em sua eficácia. A situação tornou-se tão perigosa que a Organização Mundial da Saúde (OMS) estabeleceu uma lista de 12 famílias de espécies bacterianas classificadas como patógenos prioritários. Essa lista de patógenos tem uma subdivisão de 3 categorias de acordo com a urgência para novas opções de terapia medicamentosa: Prioridade crítica: *Acinetobacter*, *Pseudomonas* e *Enterobacteriaceae*; alta prioridade: VRE (Vancomycin Resistant *Enterococcus*), MRSA (Methicillin Resistant *S. Aureus*) e *Salmonella*; prioridade média: *Streptococcus* e *Shigella* (SAVAGE *et al.*, 2017).

Os antimicrobianos têm o efeito de intervir na síntese da parede celular, tornando-os específicos para determinadas bactérias (penicilina e cefalosporinas), na síntese proteica (tetraciclina, macrolídeos e aminoglicosídeos), na síntese de ácidos nucleicos (fluoroquinolonas), na inibição de vias metabólicas (sulfonamidas) ou ruptura da membrana celular bacteriana (polimixina) (SHAIKH *et al.*, 2015).

Algumas espécies bacterianas e fúngicas têm o potencial de sintetizar e secretar agentes antimicrobianos capazes de prevenir a proliferação de outras espécies bacterianas em sua proximidade. Por essa razão, a resistência a antimicrobianos é algo que espécies bacterianas exibem como mecanismos de sobrevivência em resposta a uma ameaça em seu habitat (MUNITA; AIRAS, 2016).

Considera-se uma bactéria resistente quando espécies bacterianas começam a exibir resistência aos agentes antimicrobianos, os quais eram eficazes anteriormente, causando problemas com terapias antibióticas. Essas características defensivas podem ser compartilhadas entre os microrganismos patogênicos por transferência horizontal de genes (HGT) de ácido desoxirribonucleico (DNA) plasmidial, um processo evolutivo de transferência de informação genética entre espécies. Esses mecanismos de resistência são desenvolvidos por uma bactéria, por meio de mutações que modificam alvos genéticos de antimicrobianos, limitando a entrada de substância antimicrobiana na célula, além de remover o composto

antibiótico após entrada na célula ou desativando o antibiótico via degradação enzimática (HERSHBERG, 2017).

Os principais mecanismos estão expostos na Figura 1.

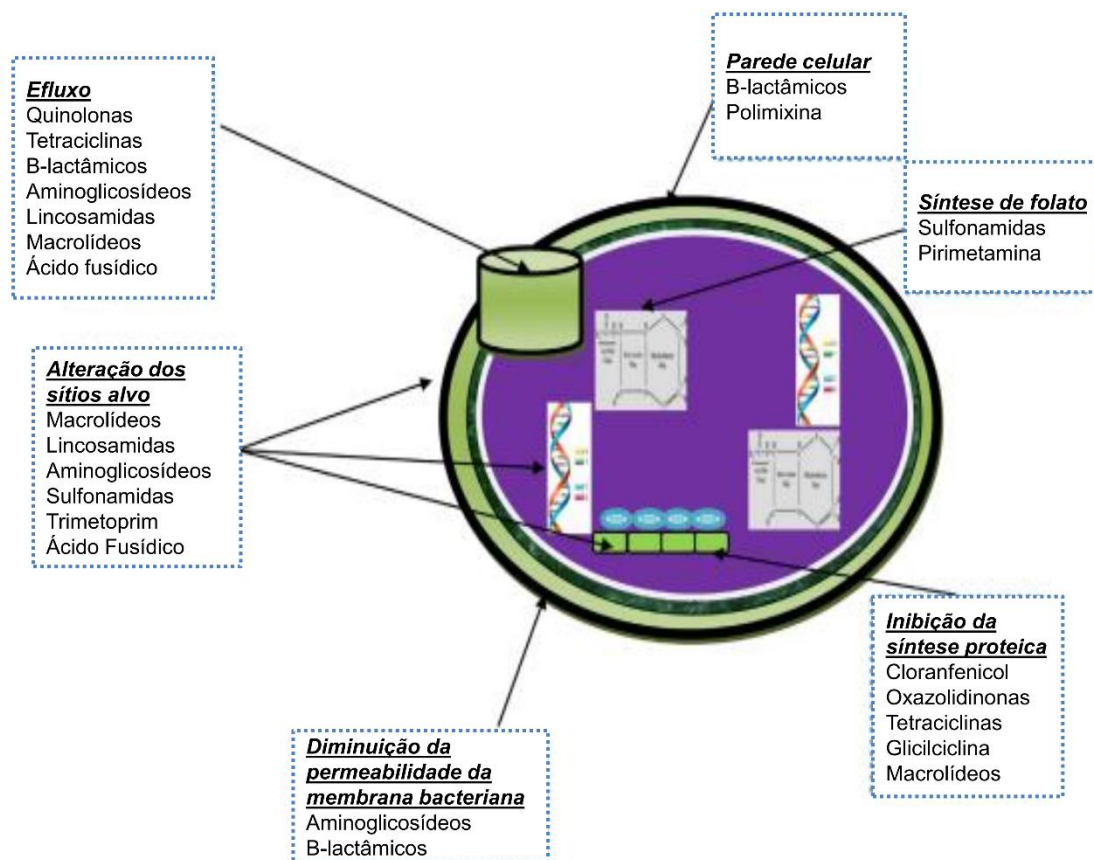


Figura 1: Resistência aos antimicrobianos versus mecanismo de atividade antimicrobiana.

A parede celular da bactéria é responsável pela forma do microrganismo, prevenindo a lise celular e é responsável pela virulência da célula bacteriana (VRANAKIS *et al.*, 2014). Todos os antimicrobianos β -lactâmicos interferem na síntese do peptidoglicano, que é um dos principais componentes da parede celular bacteriana e que mantém sua integridade (RANG *et al.*, 2016).

Conforme a estrutura química, os principais β -lactâmicos são agrupados em penicilinas, cefalosporinas, carbapenens e monobactâmicos. As bactérias utilizam três estratégias principais para se proteger contra os β -lactâmicos: alteração nas PBPs (Penicillin-binding proteins), o que reduz a afinidade dos β -lactâmicos, bombas de efluxo que removem o antibiótico do espaço periplásmico bacteriano e produção de β -lactamases (BLA), ou seja, enzimas que hidrolisam o anel dos β -lactâmicos, sendo este último a principal causa de resistência em diversas bactérias Gram-negativas (MASTER *et al.*, 2013; BLAIR *et al.*, 2015;) conforme mostra a Figura 2.

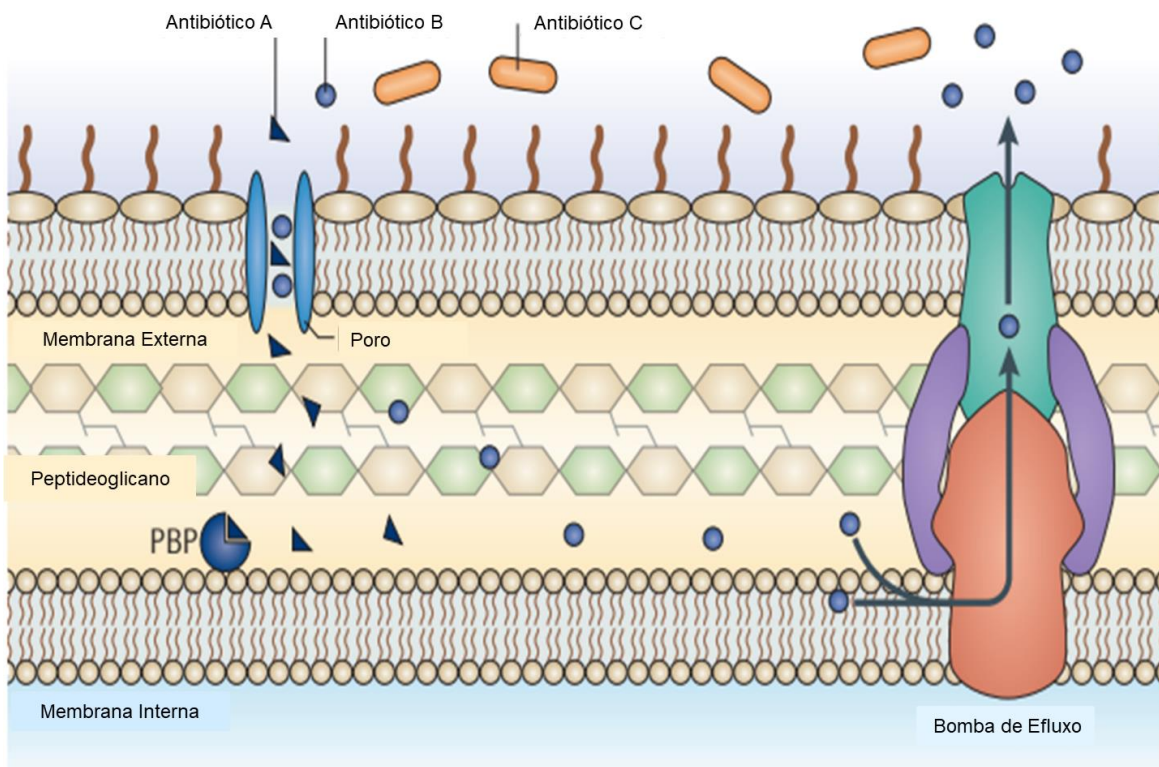


Figura 2: Mecanismos intrínsecos de resistência (BLAIR, 2014)

A Figura 2 mostra uma visão geral dos mecanismos de resistência natural. Na Figura 2, o antimicrobiano β -lactâmico visa a uma PBP, sendo que o antibiótico A pode entrar na célula pela proteína de membrana (porina), alcançar o alvo inibindo a síntese de peptidoglicano. O antibiótico B pode entrar na célula por uma porina, mas, diferentemente do antibiótico A, é removido de forma eficiente por efluxo. O antibiótico C não atravessa a membrana externa sendo incapaz de acessar o PBP alvo (BLAIR *et al.*, 2014).

3.1.1 Modificação dos alvos gênicos

Existem dois métodos pelos quais as bactérias modificam seus genes para prevenir a morte celular: uma mutação em um gene que afetará a ação do agente antimicrobiano e obtenção de DNA estranho que codifica mecanismos de resistência via Transferência Horizontal de Genes (HGT). A resistência resultante de mutações em genes bacterianos é frequentemente o subproduto de um mecanismo de sobrevivência dessa espécie (HERSHBERG, 2017). Os genes da resistência são transferidos entre as espécies por transdução, conjugação ou transformação de qualquer um dos plasmídeos (DNA circular de cadeia dupla) ou transposons (peças de DNA que podem se mover para posições diferentes no genoma) (MACGOWAN; MACNAUGHTON, 2017). Em comunidades de biofilme em que o

compartilhamento de genes é um fenômeno comum, a resistência pode se espalhar dentro da comunidade conferindo várias espécies com resistência à desinfecção com antimicrobianos, química e por soluções. Após a exposição a antimicrobianos, para que haja a sobrevivência, as bactérias que possuem mecanismos de AR têm uma vantagem distinta sobre células não resistentes, visto que a sobrevivência é mais difícil; assim, resultam na eliminação da estirpe mais fraca e proliferação das bactérias com mecanismos de resistência.

3.1.2 Inativação de antimicrobianos

Os antimicrobianos β -lactâmicos agem inibindo a síntese da parede celular e impedindo a ligação cruzada estrutural dos peptidoglicanos. Atualmente, são agentes terapêuticos comuns para o tratamento de infecções bacterianas (SHAIKH *et al.*, 2015). O primeiro relato de uma enzima bacteriana para inativar a penicilina foi uma β -lactamase AmpC produzida por *Escherichia coli* com efeito de degradação no anel β -lactâmico, fazendo com que a droga se tornasse ineficaz. Em espécies de bactérias Gram-positivas, a resistência aos β -lactâmicos é alterada no sítio alvo do anel β -lactâmico, as PBPs. Normalmente, os antimicrobianos carbapenêmicos são base para o tratamento de infecções e produção por espécies de enzimas carbapenemase, que degradam os antimicrobianos carbapenêmicos, tornando o antibiótico ineficaz (MUNITA; ARIAS, 2016).

Antimicrobianos aminoglicosídeos são usados para tratar muitas bactérias Gram-negativas. Resistência aos antimicrobianos aminoglicosídicos provém da produção de Enzimas Modificadoras de Aminoácidos (AMEs), que modificam as ligações covalentes, os grupos hidroxila ou amino da molécula aminoglicosídeo (MUNITA; ARIAS, 2016). O antibiótico cloranfenicol é um inibidor específico e excelente para síntese proteica em bactérias Gram-negativas, Gram-positivas, aeróbicas e anaeróbicas (VAN HOEK *et al.*, 2011). A mudança enzimática desse antibiótico envolve a modificação química do cloranfenicol pela expressão de acetiltransferases, conhecidas como CATs (*Chloramphenicol Acetyltransferases*). Esses genes CAT foram identificados em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e são classificadas em dois tipos principais: TIPO A, que resulta em resistência de alto nível, e TIPO B, sendo relacionada a resistência baixa ao cloranfenicol (MUNITA; ARIAS, 2016).

3.1.3 Efluxo ativo

O efluxo de drogas é dependente de energia e estão sendo cada vez mais reconhecidos como diretores de resistência antimicrobiana, com atividade limitada ou de variado espectro (LEVY, 2002). As bombas de efluxo podem ser localizadas cromossomicamente ou adquiridas por bactérias. Um AcrAD (transportador multidroga) é a

principal bomba de efluxo em bactérias Gram-negativas, incluindo *Escherichia coli* e *Salmonella entérica* (GARNEAU-TSODIKOVAA; LABBY, 2016).

AcrAD abrange o envelope celular, a membrana celular mais interna e o periplasma, onde se liga a moléculas de drogas e as transporta para a superfície exterior com uso de energia trifosfato de adenosina (ATP). Sistema de efluxo AcrAB é responsável pela remoção de uma ampla gama de antimicrobianos, por exemplo, as fluoroquinolonas, cefalosporinas, tetraciclina, dentre outras drogas (ANES *et al.*, 2015). Particularmente, as espécies pertencentes à família *Enterobacteriaceae* estão entre as bactérias Gram-negativas comumente associadas à resistência e infecções nosocomiais (YZLI; LI, 2012). Essas espécies expressam β -lactamases de espectro estendido (ESBLs), que causam resistência a β -lactâmicos. ESBL também demonstra resistência a aminoglicosídeos, sulfonamidas e fluoroquinolonas (EL-BADAWY *et al.*, 2017).

Os primeiros registros de resistência à vancomicina foram em espécies de *Enterococcus* resistentes à vancomicina (VRE), que, atualmente, apresentam desafios para a terapia medicamentosa eficaz. O tratamento do VRE consiste em antimicrobianos aminoglicosídeos, gentamicina e estreptomicina. Recentemente, surgiram problemas com resistência de alto nível à gentamicina (HLGR) e resistência de alto nível à estreptomicina (HLSR), resultando em dificuldades para tratar infecções e morbidade do paciente (NUI *et al.*, 2016). Devido à ocorrência elevada de isolados MDR e extensivamente resistentes a drogas (XDR) de *Acinetobacter baumannii*, essa espécie foi identificada como um dos principais patógenos que ameaçam o sistema de saúde. Nessa espécie, a resistência aos antimicrobianos é principalmente consequência da transferência genética de genes de resistência via plasmídeos e a mutação dos genes alvo (QUINN, 2013).

A classificação dos principais antimicrobianos e seus mecanismos de ação podem ser observados na Tabela 1, a seguir:

Tabela 1 Classificação dos principais antimicrobianos disponíveis para tratamento de infecções bacterianas

Mecanismo de Ação	Classe (Exemplo de antimicrobiano)	Mecanismo de ação específico
Interferência na síntese da parede celular	β -lactâmicos (Penicilinas, Cefalosporinas, Carbapenens e Monobactâmicos)	Ligação às PBPs, inibindo a síntese do peptideoglicano
	Fosfomicina	Inibição da enzima MurA, inibindo a primeira etapa da síntese de peptideoglicano
	Glicopeptídeos (Teicoplanina e Vancomicina)	Ligação a D-alanina, inibindo a síntese de peptideoglicano
Inibição da síntese proteica	Aminoglicosídeos (Acimacina e Gentamicina), Glicilciclina (Tigeciclina) e Tetraciclina	Ligam-se a subunidade ribossomal 30S, inibindo a síntese proteica
	Cloranfenicol, Macrolídeos, EstreptoGraminas, Lincosaminas (Clindamicina), Oxazolidinonas (Linezolida)	Ligam-se à subunidade ribossomal 50S, inibindo a síntese proteica
Interferência na síntese de ácidos nucleicos	Fluoroquinolonas (Ciprofloxacina)	Inibem a síntese de DNA através da ligação com DNA girase e DNA topoisomerase
	Rifampicina	Inibem a síntese de RNA através da ligação com RNA polimerase
Rompimento de membrana plasmática	Polimixinas (Polimixina B e Colistina)	Aumentam a permeabilidade da membrana através da interrupção das ligações que estabilizam o LPS
Inibição de vias metabólicas	Sulfonamidas e Pirimidinas	Inibe a via de síntese do ácido fólico

Fonte: adaptado de Tenover (2006).

Os mecanismos de resistência a antimicrobianos consistem na identificação de novas biomoléculas, que podem figurar como alvos para desenvolvimento de novos antimicrobianos, associados às práticas adequadas no controle de infecção; são estratégias fundamentais para minimizar indicadores negativos de infecção hospitalar e contribuir para o melhor manejo do paciente nas instituições de saúde (NUI *et al.*, 2016).

3.2 DEGRADAÇÃO DA DROGA

3.2.1 β -lactâmicos

Os β -lactâmicos são um grupo de antimicrobianos com um anel β -lactâmico. São de grande importância devido à sua excelente eficácia terapêutica e baixa toxicidade. O anel β -lactâmico determina o mecanismo de inibição da síntese do peptidoglicano e a baixa toxicidade direta, uma vez que atuam na parede celular, a qual não ocorre nas células eucariotas do homem. É determinante na resistência bacteriana dos grupos que produzem enzimas β -lactamases (BLA) (SUAREZ; GUDIOL, 2009). O anel β -lactâmico é formado por três átomos de carbono e um de nitrogênio (Figura 3), podendo se tornar ativo por conter vários radicais substituintes (CRAM, 2019).

A família dos β -lactâmicos é heterogênea, ou seja, mesmo que todos os indivíduos tenham o anel β -lactâmico, possuem química distinta e podem apresentar diferentes tipos de cadeias lineares, o que diferencia suas características, espectros de ação e resistências às BLA. Como demonstra a Figura 3, dependendo dos anéis presentes, formam-se quatro subfamílias de β -lactâmicos.

Os β -lactâmicos são formados por penicilinas, penicilinas, monobactâmicos e cefalosporinas. Inibidores de BLA podem ser considerados β -lactâmicos, uma vez que também possuem a estrutura base, como o ácido clavulânico, por exemplo. O anel β -lactâmico pode criar um grupo dessa família por meio de anéis fundidos, a saber: Penicilinas – um anel tiazolidina; cefalosporinas – anel dihidrotiazina; carbapenêmicos – anel pirrólico. No caso dos monobactâmicos, não possuem anel fundido ao seu anel principal.

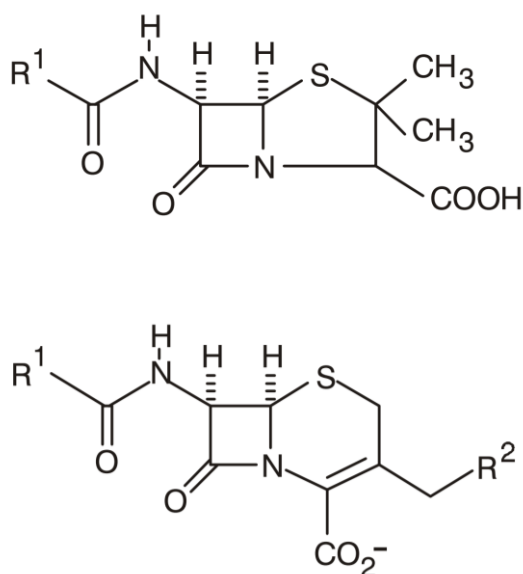


Figura 3: Estrutura da penicilina comparada (superior) com as cefalosporinas (inferior).

Nas cadeias das Penicilinas e das cefalosporinas, existem pontos em que podem ser acoplados radicais (ver R1 e R2 na figura 3), os quais modificam diversas propriedades da molécula base (figura 3). Esse fator fez com que pesquisadores direcionassem seus esforços

para buscar melhorar a estrutura básica de forma a obter moléculas mais solúveis, com diferentes vias de administração, com melhor farmacocinética, com amplo espectro de ação, resistente ao suco gástrico, entre muitas outras possibilidades (AZEVEDO, 2014).

3.2.2 β -lactamases

As β -lactamases catalisam a hidrólise do anel β -lactâmico do antibiótico, o que impossibilita sua atividade antimicrobiana. A produção de BLA é um importante mecanismo de resistência adquirido devido à sua alta prevalência, visto que representa uma vantagem adaptativa que garante a preservação da parede celular na presença do antimicrobiano. Causam uma alta taxa de falha terapêutica, uma vez que as BLAs hidrolisam o anel β -lactâmico. Os genes que codificam as BLAs têm localização cromossômica ou plasmidial e podem estar relacionados com plasmídeos quando transferidos entre as enterobactérias (LIVERMORE, 1995; WILKE; LOVERING; STRYNADKA, 2005; DRAWZ; BONOMO, 2010).

Sendo assim, esse mecanismo de resistência das bactérias Gram-negativas aos β -lactâmicos inativa os antimicrobianos, diminuindo a habilidade de alcançarem o sítio alvo, as PBPs (BIENDO *et al.*, 2008; CABRAL; LOPES, 2014). Alguns microrganismos produzem as enzimas BLAs com um grande espectro de ação. Dentre os mecanismos de resistência mais comuns em bactérias Gram-negativas, destacam-se as ESBL (β -lactamases de espectro estendido) (CABRAL; LOPES, 2014). Mutações pontuais nos genes para BLA ocasionaram o surgimento de cepas resistentes produtoras de ESBLs. A produção de enzimas ocorre predominantemente em *Klebsiella* spp. e em *Escheria coli*, mas podem ser encontradas em vários patógenos importantes clinicamente. Seu campo de ação estende-se aos antimicrobianos β -lactâmicos de amplo espectro, abrangendo as cefalosporinas de terceira geração e monobactâmicos, mas não são resistentes às cefoxitinas e carbapenêmicos (por exemplo, imipenem, meropenem, ertapenem e doripenem) (AL-JASSER, 2006; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012; CASTANHEIRA *et al.*, 2014).

As BLAs atuam por meio de éster de serina, no qual o anel β -lactâmico é alvo da hidroxila livre da cadeia lateral do resíduo de serina, que ativa o sítio da enzima fazendo a produção de um éster acil covalente. Depois disso, a hidrólise do éster causa a liberação da enzima ativa, fazendo com que a droga seja inativada (ROSSI; ANDREAZZI, 2005; BABIC *et al.*, 2006).

Conforme o tipo do substrato e a suscetibilidade aos inibidores de BLA, varia a atividade de hidrólise do β -lactâmico, sendo que os inibidores podem ser ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam. A resistência aos β -lactâmicos é dependente de fatores como a quantidade de enzima produzida, a habilidade de hidrolisar o antimicrobiano e a velocidade do β -lactâmico penetrar a membrana externa (BRADFORD, 2001). A importância clínica das

BLA é consequência da produção em elevadas concentrações. A síntese de ESBL ocorre em algumas espécies de bactérias ao longo da terapêutica antimicrobiana, visto que virtualmente todas as bactérias Gram-negativas são produtoras dessas enzimas (ADLER, 2016). A produção de BLAs é resultante da pressão seletiva que os antimicrobianos exercem e de um processo evolutivo (PAPP-WALLACE, 2011).

3.2.2.1 Resistência aos β -lactâmicos

Os antimicrobianos β -lactâmicos são amplamente utilizados em práticas clínicas, devido à sua toxicidade baixa. Todos têm a característica comum da molécula com o anel β -lactâmico. Age com base em um mecanismo de inibição de ligações cruzadas entre moléculas de peptidoglicano, as quais bloqueiam a síntese da parede celular. A D-alanina dos pentapeptídeos, que formam a parede de peptidoglicano, assemelham-se quimicamente ao anel β -lactâmico. Sendo assim, as transpeptidases (PBP) confundem o anel β -lactâmico com a D-alanina-D-alanina, fazendo com que ocorra a acilação das PBP, as quais ficam sem possibilidade de realizar suas funções corretamente, ou seja, causa a lise celular bacteriana (RANG *et al.*, 2016).

São quatro as classes de β -lactâmicos comerciais: penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenens. Dessas, a *K. pneumoniae* apresenta mecanismo de resistência aos antimicrobianos com base na redução da expressão de porinas (OMP), elevação da expressão de bombas de efluxo, bem como da produção de enzimas β -lactamases (DRAWZ, 2010). Referente à *K. pneumoniae*, vem sendo descrita a participação de redução da expressão de porinas na resistência de β -lactâmicos, como os carbapenens, por exemplo, ou a fluoroquinolonas, o cloranfenicol e a tetraciclina. OmpK35 e OmpK36 são as porinas mais importantes em *K. pneumoniae*, em que mutações pontuais, inserções e deleções nos genes que as codificam se associam à diminuição da suscetibilidade. Porém, a redução da expressão ou distinção de porinas geralmente causa a redução da vulnerabilidade a determinado β -lactâmico, não sendo suficiente para a produção de fenótipo de resistência plena aos β -lactâmicos (JACOBY; MILLS; CHOW, 2004).

Bombas de efluxo são descritas relacionadas com a resistência a β -lactâmicos em *K. pneumoniae*. São formadas por proteínas de transporte envolvidas na excreção de substratos tóxicos da parte interna das células bacterianas para o ambiente externo, sendo encontradas em bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e em organismos eucarióticos. Podem ser direcionadas a um determinado substrato, como a bomba MacABCToIC, que é direcionada ao transporte de macrolídeos em *Escherichia coli* (KOBAYASHI; NISHINO; YAMAGUCHI, 2011), ou transportam uma diversidade de compostos com diferentes estruturas. Entre os diversos procariotos, cinco famílias representam os transportadores de

efluxo, chamados de efluxo de multidrogas e moléculas tóxicas (MATE), Facilitador Maior (MF), Pequena Multirresistência (SMR), Resistência, Modulação e Divisão (RND) e cassete ligação à ATP (ABC). As bombas de efluxo, com maior relevância para *K. pneumoniae*, são AcrAB-TolC, AcrEF-TolC e EmrB, sendo a AcrAB-TolC, da família RND, a de maior importância relacionada à resistência aos β -lactâmicos, fluoroquinolonas, gliciliclinas e macrolídeos (SUN; DENG; YAN, 2014; PADILLA *et al.*, 2010).

3.3 *Klebsiella pneumoniae*

A família *Enterobacteriaceae* constitui um grupo grande e variado de bactérias Gram-negativas, fermentadores de glicose e outros açúcares, bem como produtores de catalase e citocromo-oxidase negativos. Algumas espécies compõem a microbiota comensal do intestino do homem e de outros animais, podendo ser encontradas em solos, plantas e águas. Ressalta-se que as enterobactérias são agentes de infecções do trato respiratório, urinário, gastrointestinal, septicemias, intra-abdominais, entre outras. Os gêneros mais comuns são *Escherichia* spp., *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Serratia* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Proteus* spp. e *Hafnia* spp. (KONEMAN *et al.*, 2008).

K. pneumoniae é a mais estudada devido à sua importância clínica. O gênero dessa espécie, pertencente à família *Enterobacteriaceae*, ordem Enterobacteriales, Classe Gammaproteobacteria, ao filo Proteobacteria. *Klebsiella*, foi um gênero definido como homenagem ao microbiologista alemão, Edwin Klebs (1834-1913), por Trevisan (1885), e vem sofrendo alterações em sua taxonomia desde então (DWORKIN *et al.*, 2006).

As principais características de *K. pneumoniae* são não esporulada, aeróbia facultativa, tamanho aproximado de 0,3 x 1,5 μ m a 0,4 x 2,0 μ m. Podem ocorrer em células únicas, em pares ou em cadeias curtas. Não produzem gás sulfídrico (H_2S) e enzima citocromo oxidase. Sua única fonte de carbono é o citrato e apresenta a enzima lisina descarboxilase. É negativa perante o teste de indol, imóvel e urease positiva (KONEMAN *et al.*, 2008).

Em 1994, a primeira amostra de *K. pneumoniae* teve seu genoma sequenciado por meio de um escarro de um paciente de 66 anos com pneumonia (a MGH 78578 – ATCC 700721 com número de acesso GenBank: NC_009648.1). A resistência dessa cepa se estende a diversos antimicrobianos, como ampicilina, gentamicina, ticarcilina, sulfametoxazole/trimetoprima. Além disso, é suscetível à ciprofloxacina, acimacina e imipenem. Seu genoma passou por um sequenciamento com uma cobertura de 8X, apresentando mais de 5.300.000 pares de bases e quase 6000 genes. O conteúdo de G/C do cromossomo foi, em média, de 58%, considerado o mais alto entre as espécies da sua família

(MCCLELLAND *et al.*, 2000). Hoje em dia, estão disponíveis no RefSeq (NCBI Reference Sequence Database) 53 genomas completos da espécie.

3.3.1 Resistência aos antimicrobianos em *K. pneumoniae*

A descoberta de antimicrobianos iniciou uma nova era na medicina. Todavia, a resistência a antimicrobianos de diversas espécies, bem como a persistência de cepas patogênicas dificulta cada vez mais o potencial de combate a doenças infecciosas. O fato é um potencial agravante quando se trata de antimicrobianos β -lactâmicos devido à profusão e variedade de BLA. A produção dessas enzimas por bactérias Gram-negativas é um fator prejudicial ao potencial do tratamento nesse grupo de antimicrobianos (BUSH, 2014).

A multirresistência, nas espécies da família *Enterobacteriaceae*, especialmente em *K. pneumoniae*, vem se agravando, sendo necessária atenção a esse problema, uma vez que são importantes agentes causadores de infecções hospitalares, associadas a pneumonias, infecções da corrente sanguínea, do trato urinário, entre outras manifestações intra-abdominais (KOTAPATI *et al.*, 2005; LOPES *et al.*, 2005; GROVER *et al.*, 2006; SUN *et al.*, 2006).

A descoberta das BLAs já foi classificada de formas distintas. Geralmente, tem como base seu espectro hidrolítico, suscetibilidade a inibidores e sua localização genética. Ainda tem alguns problemas na classificação fenotípica, pois a mutação pontual pode ter capacidade de modificar substancialmente a particularidade da enzima em função do substrato e o potencial dos inibidores, o que pode mudar o grupo no qual a enzima é classificada. Sendo assim, a classificação, proposta inicialmente por Ambler, em 1980, por meio da sequência peptídica, mostrou-se mais estável, uma vez que reflete as relações fundamentais entre as moléculas que não se modificam com base em mutações (BUSH; JACOBY, 2010).

Mesmo que a sequência de aminoácidos tenha se apresentado de forma interessante, visando à classificação das BLA, essa abordagem não foi eficaz na prática clínica, visto que ainda não é viável o uso único de ferramentas de biologia molecular para prever a função enzimática e o perfil de suscetibilidade do organismo que conduz a BLA. Além disso, para os clínicos, é necessário saber se o organismo avaliado é suscetível ou resistente a um antimicrobiano, fator mais necessário que o conhecimento da sequência de aminoácidos da BLA conduzida pela bactéria (BUSH, 2014).

Sendo assim, na prática clínica atual, a classificação de Bush, Jacoby e Medeiros (1995), revisada por Bush e Jacoby (2010), a qual combina a estrutura com características funcionais, é a classificação mais aceita, uma vez que é baseada em propriedades bioquímicas, na estrutura molecular e nas sequências nucleotídicas, agrupando as enzimas em quatro grupos funcionais e subgrupos (Tabela 2) (BUSH; JACOBY, 2010)

Tabela 2 Classificação das β -lactamases segundo Bush e Jacoby (2010)

Grupo Funcional Bush-Jacob	Classe Molecular	Exemplos	Características
1	C	AmpC de <i>P. aeruginosa</i> e <i>E. coli</i> ; CMY-2, FOX-1, MIR-1	Enzimas cromossômicas e plasmidiais produzidas por bactérias Gram-negativas. Confere resistência a todos os beta-lactâmicos, exceto os carbapenens. Não são inibidas por ácido clavulânico e tazobactam.
1e	C	GC1, CMY-37	Enzimas que promovem a hidrólise de penicilinas, cefamicinas, cefalosporinas de amplo espectro e monobactâmicos.
2a	A	PC1 e outras penicilinas de <i>Staphylococcus</i> sp.	Penicilinas produzidas por <i>Staphylococcus</i> spp. e <i>Enterococcus</i> spp. Conferem altos níveis de resistência à penicilina. Inibidas por ácido clavulânico e tazobactam.
2b	A	SHV-1, TEM-1, TEM-2, TEM-90	Enzimas que promovem a hidrólise eficiente de penicilinas e cefalosporinas das primeiras gerações, inibidas por ácido clavulânico e tazobactam.
2be	A	ESBL: CTX-M-15, CTX-M-44, PER-1, SFO-1, SHV-5, TEM-10, TEM-26	Conferem resistência às penicilinas, cefalosporinas de amplo espectro e monobactâmicos.
2br	A	TEM-30, TEM-76, TEM-103, SHV-1, SHV-26	Enzimas que possuem hidrólise eficiente de penicilinas e cefalosporinas das primeiras gerações, entretanto não são bem inibidas por ácido clavulânico.
2ber	A	TEM-50, TEM-68, TEM-89	Promovem a hidrólise de penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e são pouco inibidas por ácido clavulânico e tazobactam.
2c	A	PSE-1, CARB-3	Enzimas que hidrolisam a penicilinas e carbenicilina, inibidas por ácido clavulânico.
2d	D	OXA-1, OXA-10	Enzimas que hidrolisam a cloxacilina, levemente inibidas por ácido clavulânico.
2de	D	OXA-11, OXA-15	Hidrolisam penicilinas e cefalosporinas de amplo espectro, pouco inibidas por ácido clavulânico.
2df	D	OXA-23, OXA-48	Hidrolisam carbapenens e cloxacilina, pouco inibidas por ácido clavulânico.
2e	A	CepA	Cefalosporinas inibidas por ácido clavulânico e tazobactam, mas não por aztreonam.
2f	A	IMI-1, KPC-2, KPC-3, SME-1, GES-2	Enzimas que hidrolisam carbapenens e possuem uma serina no seu sítio alvo. Tais enzimas são pouco inibidas por ácido clavulânico e tazobactam.
3a	B	IMP-1, L1, NDM-1, VIM-1	Hidrólise de todos os beta-lactâmicos exceto monobactâmicos. Inibidas por EDTA e quelantes de metais, não inibidas por ácido clavulânico e tazobactam.

Grupo Funcional Bush-Jacob	Classe Molecular	Exemplos	Características
3b	B	CPHa, Sfh-1	Hidrólise preferencial de carbapenems. Inibidas por EDTA e quelantes de metais, não inibidas por ácido clavulínico e tazobactam.

Fonte: Bush e Jacoby (2010).

As BLA do tipo AmpC, em especial, as conhecidas como grupo CESP (*Citrobacter freundii*, *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Providencia* spp., *Morganella* spp. e *Hafnia alvei*), são cefalosporinases codificadas cromossomicamente por algumas bactérias da família *Enterobacteriaceae*. Nesse grupo, as enzimas do tipo AmpC são indutíveis e expressam, em níveis altos, por meio de mutações. Têm resistência à cefalotina, cefazolina, cefoxitina, à grande parte das penicilinas, bem como combinações de β -lactâmicos com inibidores. Dentre as enzimas do tipo AmpC, alguns exemplos são: ACT-1, MIR-1, CMY-1 e CMY-2 (JACOBY, 2009).

As *K. pneumoniae* são naturalmente resistentes a antibióticos, como amoxicilina, ampicilina carbenicilina, ticarcilina em função da expressão constitutiva de BLA codificadas cromossomicamente. Os genes *bla_{SHV}*, *bla_{OKP}* e *bla_{LEN}* foram evoluindo ao longo de milhões de anos e deram origem às BLAs cromossômicas, que hoje podemos observar nas amostras dessa espécie (HAEGGMAN *et al.*, 2004). Porém, a resistência a antimicrobianos dos bacilos Gram-negativos da família e enterobacteriaceae é um problema mundial, visto que são resistentes às cefalosporinas por meio da produção de ESBL. Essas são enzimas das classes moleculares A ou D, conforme a classificação de Ambler, ou também classificadas como grupos funcionais 2be ou 2de (BUSH; JACOBY, 2010). Têm potencial de hidrolisar penicilinas de amplo espectro, cefalosporinas de terceira e quarta geração e os monobactâmicos (BRADFORD, 2001).

Distintas ESBL já foram descritas; as que ocorrem com maior frequência são as TEM, SHV e CTX-M. Porém, as do tipo OXA, PER, VEB, BES e GES vêm sendo registradas com frequência na literatura (PATERSON, 2006). A família TEM consiste nas primeiras ESBLs descritas, as quais derivam da BLA TEM-1, sendo a TEM-12 a primeira enzima com o perfil ESBL da classe (HERITAGE *et al.*, 1992). As enzimas mais comumente encontradas em *K. pneumoniae* são do tipo SHV, nas quais o gene *bla_{SHV-1}* se encontra no cromossomo (fenótipo não-ESBL) (PATERSON; BONOMO, 2005).

As ESBL do tipo CTX-M são as mais disseminadas em todo o mundo atualmente. Elas têm preferência por hidrolisar cefotaxima e as do tipo CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8 e CTX-M-15 são registradas na literatura com maior frequência para distintos lugares no mundo (BONNET, 2004). Existem relatos que descrevem a presença de um clone prevalente de *E. coli*, pertencente ao ST131, identificados com base na *Multilocus Sequence Typing* (MLST) e transportando *bla_{CTX-M-15}* geralmente relacionado com infecções urinárias (MATHERS; PEIRANO; PITOUT, 2015). Há outros relatos dessa variante alélica, em distintas espécies de *Enterobacteriaceae*, como *K. pneumoniae* e *Enterobacter* spp. por exemplo (SEKI *et al.*, 2013; CARVALHO *et al.*, 2014).

Conforme aumentaram os isolamentos de amostras produtoras de ESBL, os carbapenens começaram a ser cada vez mais prescritos por clínicos como alternativa para

tratamento, uma vez que têm espectro de ação maior e mais estável sobre as ESBL. Com a frequente utilização desses antimicrobianos, foram registradas mais amostras com resistência. A resistência aos carbapenens é mediada por distintas formas, porém, a produção de carbapenemase é registrada como o mecanismo epidemiologicamente de maior importância (QUEENAN; BUSH, 2007). As enzimas carbapenemase têm grande versatilidade de hidrólise. Têm capacidade de atuação sobre as penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenens. Além disso, são classificadas nas classes moleculares A (serino-carbapenemase; ex.: KPC, GES), B (metalo-carbapenemase, ex: IMP, VIM e NDM) e D (oxacilinas, ex: OXA-48-like) e têm seus genes codificadores em cromossomos ou plasmídios (NORDMANN; POIREL, 2014).

As serinocarbapenemase, identificadas pela primeira vez em *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens* e *K. pneumoniae*, foram as NMC/IMI, SME e KPC. Além disso, a enzima GES também representa esse grupo, com variantes de perfil de carbapenemase (QUEENAN; BUSH, 2007). Uma nova serinocarbapenemase foi descrita nos últimos anos em três amostras de *K. pneumoniae* isoladas em São Paulo, chamadas de BKC-1 (NICOLETTI *et al.*, 2015). Considera-se a KPC a enzima mais importante em quesitos clínicos e epidemiológicos nessa classe (NORDMANN; POIREL, 2014).

As IMP e VIM são as metalocarbapenemase mais comumente descritas. Encontradas principalmente em países da Europa e nos Estados Unidos, bem como ocorrentes na Índia, Paquistão, Reino Unido e Estados Unidos, a NDM encontrada em *K. pneumoniae* (NORDMANN *et al.*, 2011). As oxacilinas mais comuns são as classificadas como OXA-23 e OXA-51 em *Acinetobacter* spp. e OXA-48-like em enterobactérias. Entre as carbapenemase, as mais associadas à *K. pneumoniae* são as do grupo KPC, NDM e OXA-48-like (NORDMANN; POIREL, 2014).

3.3.1.1 *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC)

As enzimas do tipo KPC de classe A são comumente apontadas como as mais significativas clinicamente entre as carbapenemase devido ao seu grande potencial de disseminação (NAAS *et al.*, 2008; CHEN *et al.*, 2012; BRYANT *et al.*, 2013; NORDMANN; POIREL, 2014; MARTINEZ *et al.*, 2016). O primeiro registro de isolado detectado, como produtor de KPC, foi um registro de 1996, de uma cepa de *K. pneumoniae* na Carolina do Norte – EUA. Essa cepa apresentou resistência a todos os β -lactâmicos e sua ocorrência foi restrita à Carolina do Norte por muitos anos. Porém, alguns anos depois, outros registros de uma variante da enzima surgiram, dessa vez em pacientes hospitalizados na costa leste dos Estados Unidos, e foram denominados de KPC-2 (CHEN *et al.*, 2012). Assim que comparadas

as cepas, pode-se constatar que se tratava da mesma variante descrita inicialmente como KPC-1, diferenciando-se apenas por um aminoácido (YIGIT *et al.*, 2001).

A KPC é uma enzima produzida por bactérias Gram-negativas, as quais apresentam resistência aos antimicrobianos carbapenens: meropenem, ertapenem, imipenem. Elas inativam os agentes β -lactâmicos: cefalosporinas, penicilinas e o aztreonam. Os carbapenens são uma classe ampla que é utilizada em tratamentos de diversas infecções, envolvendo *Enterobacteriaceae* (LANDMAN *et al.*, 2005; QUEENAN; BUSH, 2007; HANES *et al.*, 2009; KITCHEL *et al.*, 2009).

A KPC é frequentemente encontrada em cepas de *K. pneumoniae*. Elas têm alto potencial de dispersão e transferência de material genético, sendo assim, conseqüentemente, elevada capacidade de desenvolver genes de resistência (DEL PELOSO; BARROS; SANTOS, 2010). As *K. pneumoniae* carbapenemase, disseminadas globalmente, são enzimas do grupo funcional 2f e classe molecular A (BUSH; JACOBY, 2010). Assim, são associadas principalmente à *K. pneumoniae*, mesmo que surjam cada vez mais registros de vários gêneros identificados pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, por exemplo *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, *Salmonella* spp., *Escherichia coli* e *Pseudomonas* spp. (DIENSTMANN *et al.*, 2010), além de não fermentadoras como *Acinetobacter* (CHEN *et al.*, 2012; VANEGAS *et al.*, 2014).

Diversos genes variantes para KPC foram descritos, bem como várias espécies de bactérias Gram-negativas, incluindo *K. pneumoniae* (MONTEIRO *et al.*, 2009), *Enterobacter* spp. (TUON *et al.*, 2015; CABRAL *et al.*, 2016), *Pseudomonas aeruginosa* (JÁCOME *et al.*, 2012), *Acinetobacter* spp. (AZIMI *et al.*, 2015), *Salmonella enterica* (RODRÍGUEZ; BAUTISTA; BARRERO, 2014), *Serratia marcescens* (MARGATE *et al.*, 2015), *Citrobacter freundii* (YAO *et al.*, 2014), *Proteus mirabilis* (CABRAL *et al.*, 2015), e *Raoultella* spp. (CASTANHEIRA *et al.*, 2009).

No Brasil, Monteiro *et al.* (2009) publicaram o primeiro relato de quatro cepas de *K. pneumoniae* carreadores do gene de resistência *bla*_{KPC-2}, em um hospital terciário na cidade de Recife. Cabral *et al.* (2015), em Recife, relataram o isolamento da primeira cepa de *Proteus mirabilis* produtora de KPC no Brasil. Essa disseminação do gene *bla*_{KPC} ocorre por meio de bactérias de importância clínica no país. Em hospitais de Porto Alegre, Pinto *et al.* (2014) relataram uma predominância de 48,5% de isolados produtores de KPC, em espécies de *K. pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, seguido de *Enterobacter aerogenes*.

Há relatos de disseminação dessa carbapenemase, bem como o papel de destaque da *K. pneumoniae* e *Enterobacter aerogenes*, visto que possuem alta capacidade de causar infecções nosocomiais, bem como de acumular e transferir mecanismos de resistência. Em Recife-PE, Cabral *et al.* (2016) registraram a ocorrência de 85,7% isolados de *Enterobacter*

aerogenes carreadores do gene *bla_{KPC}*, em amostras provenientes de colonização e infecção em um hospital público.

3.3.1.2 New Delhi Metallo-β-lactamase (NDM)

O primeiro registro da enzima NDM-1 (New Delhi Metallo-β-lactamase-1) foi em 2008 nas espécies *K. pneumoniae* e *Escherichia coli*. O registro foi em um paciente indiano de 59 anos, residente da Suécia, que foi internado em Punjabi para tratamento de um abcesso na região glútea. Quando o paciente retornou para a Suécia, as duas bactérias foram identificadas como *K. pneumoniae*, na urina do paciente, e *Escherichia coli*, da coprocultura. Os testes fenotípicos realizados nas amostras apontaram a resistência aos carbapenêmicos por conta da produção de uma metalo-β-lactamase (MBL). O fato é que testes moleculares não registraram enzimas conhecidas. Para isso, estudos de clonagem e sequenciamento foram realizados para identificar um novo tipo de carbapenemase em que fosse possível compartilhar pouca identidade com as carbapenemase das classes descritas até então (a maior similaridade foi a VIM1-2, com até 32% de identidade). O registro desse gene em dois gêneros de bactéria diferentes apontou um indício de presença de elementos genéticos móveis, sendo o gene *bla_{NDM-1}* observado, de maneira que essas amostras em plasmídios são transferíveis de 180 e 140 kilobases (kb) (JOHNSON; WOODFORD, 2013).

Com base na primeira descrição dessa carbapenemase, outros relatos em pacientes que visitavam determinadas áreas de risco no Subcontinente Indiano foram surgindo (como Índia, Paquistão, Sri Lanka e Bangladesh). Os pacientes retornavam para os seus países de origem e a disseminação para esses países era relatada, como Reino Unido, Canadá e França (JOHNSON; WOODFORD, 2013). Assim, o maior acúmulo de registros dessa carbapenemase tem sido o Subcontinente Indiano, uma vez que é descrita não somente em pacientes, mas também no solo e no ambiente (JOHNSON; WOODFORD, 2013). Em comparação à NDM-1, as variantes NDM-4, NDM-5 e NDM-7 têm ação melhor contra os carbapenens. No estado ativo, bem como em outras MBL, possuem dois íons metálicos conectados à histidina e cisteína (NORDMANN; POIREL, 2014).

Similar às outras metalo-beta-lactamases (MBL), a New Delhi Metalobetalactamase (NDM) hidrolisa uma grande gama de β-lactâmicos e penicilinas, cefalosporinas e carbapenens, exceto monobactâmicos (JOHNSON; WOODFORD, 2013). Porém, grande parte das amostras produtoras de NDM possuem fenótipo de multirresistência de todos os β-lactâmicos, aminoglicosídeos, fluoroquinolonas e sulfonamidas. Esse é um padrão de resistência que pode ser explicado com a associação do gene *bla_{NDM-1}* com outros determinantes da resistência a antimicrobianos, como ESBL, AmpC, carbapenemase, a saber, OXA-48, VIM e KPC, os genes responsáveis pela resistência a aminoglicosídeos,

macrolídeos, rifampicina, quinolonas, cloranfenicol e sulfametoxazole (NORDMANN; POIREL, 2014). Entre as Enterobacteriaceae registradas, as *K. pneumoniae* e *Escherichia coli* são as relatadas com maior frequência como produtoras de NDM-1 (NORDMANN; POIREL, 2014).

A descrição do gene *bla*_{NDM-1} é registrada em distintas espécies, em especial, em plasmídios conjugativos pertencentes a vários grupos de incompatibilidade (IncA/C, IncF, IncL/M, ou não tipável). Além disso, vem sendo associado ao cromossomo, mesmo que de forma mais esporádica. Ao contrário do que tem sido observado para o gene *bla*_{KPC-2}, esse gene não é relacionado à disseminação de clones ou complexos clonais específicos, plasmídeos específicos ou estruturas genéticas únicas (DORTET; POIREL; NORDMANN, 2014).

Os estudos que avaliam o quadro genético dessa carbapenemase apontam a presença de uma estrutura genética preservada, que é relacionada ao gene *bla*_{NDM}, com sequência de inserção IS*Aba125* completa ou truncada na extremidade 5' do gene, bem como com o gene *bla*_{MBL} na extremidade 3', o qual representa a resistência à droga anticancerígeno bleomicina (NORDMANN et al., 2011). A primeira descrição do *bla*_{NDM-1} registrada no Brasil ocorreu no ano de 2013, em uma cepa de *Providencia rettgeri* registrada em um isolado coletado no estado do Rio Grande do Sul (CARVALHO-ASSEF et al., 2013). Esse trabalho foi base para um estudo retrospectivo que observou a presença de amostras de *Enterobacter hormaechei* produtoras de NDM-1, desde 2012, no Rio Grande do Sul (CARVALHO-ASSEF et al., 2014). Picolotto (2018) relatou o isolamento da primeira cepa de *K. pneumoniae* no estado do Paraná que era produtora de carbapenemase codificada pelo gene *bla*_{NDM}, em um paciente internado em uma Unidade de Terapia Intensiva (UTI) no oeste do Paraná.

3.3.1.3 OXA-48-like

As oxacilinases (OXA), também conhecidas como BLA de classe D, são as enzimas representadas pelas enzimas que apresentam agrupamento serina no seu sítio ativo. Entre as enzimas das classes de BLA, essa é a que apresenta maior diversidade de sequências nucleotídicas, aminoácidas, bem como espectro de atividade contra os β -lactâmicos, diversificando, desde um espectro de atividade contra penicilinas, até a ação contra carbapenens. Os genes codificadores das BLAs de classe D podem ser associados a elementos genéticos que são móveis como transposons e sequências de inserção. Diversos genes de oxacilinases vêm sendo registrados como sendo uma representativa fonte de resistência adquirida em bactérias Gram-negativas. Porém, estudos vêm apontando que essas BLAs são produzidas naturalmente por atores clinicamente representativos, mas também por espécies ambientais (POIREL; NAAS; NORDMANN, 2010).

Grande parte das enzimas que apresentam atividade de carbapenemase são encontradas em *Acinetobacter spp.* (EVANS; AMYES, 2014.). As carbapenemase mais observadas entre as enterobactérias dessa classe são a OXA-48 e suas variantes. Doze variantes de OXA-48-like foram registradas nos últimos anos, que se diferenciam por apresentarem substituições ou deleções de aminoácidos (OXA-48, -48b, -162, -163, -181, -199, -204, -232 -244, -245, -247, e -370). Dentre elas, a OXA-48 é a mais disseminada (POIREL; POTRON; NORDMANN, 2012). As enzimas pertencentes à família OXA-48-like apresentam atividade hidrolítica consideravelmente baixa contra os carbapenens, representado poder de hidrólise elevado contra o imipenem quando comparado ao meropenem (POIREL; NASS; NORDMANN, 2010).

O gene *bla*_{KPC} é registrado em diversos países desde 2008, geralmente, na espécie *K. pneumoniae*, bem como em outras espécies pertencentes à família *Enterobacteriaceae* (POTRON *et al.*, 2011). O *bla*_{OXA-48b} apresenta quatro formas de mutações silenciosas quando comparado à OXA-48 e a OXA-199 apresenta cinco formas de diferenças nucleotídicas, bem como três diferenças em função dos aminoácidos. Os dois genes foram registrados em regiões cromossômicas (SAMPAIO *et al.*, 2014).

Uma nova variante alélica descrita recentemente no Brasil foi designada OXA-370. Encontrada em uma amostra de *Enterobacter hormaechei*, o gene *bla*_{OXA-370} foi registrado no Rio Grande do Sul e se difere do *bla*_{OXA-48} pela substituição de uma serina por um ácido glutâmico na posição 212 da proteína. Porém, seu perfil hidrolítico diante dos demais β-lactâmicos não está totalmente estabelecido. A investigação da região flanqueadora desse gene aponta uma transposase *tnpA* truncada por uma sequência de inserção IS5075-like *upstream* a *downstream* observada ao gene, bem como outra transposase *tnpA* truncada por uma IS15-like (SAMPAIO *et al.*, 2014).

3.3.2 Aspectos Moleculares do Gene *bla*_{KPC}

A relação da capacidade de grande disseminação do gene *bla*_{KPC} é em função da associação com os elementos genéticos móveis, os quais facilitariam sua dispersão, como plasmídios conjugativos e transposons, com destaque ao transposon móvel de 10 kb (Tn4401), que é comumente localizado em plasmídeos conjugativos. Sua associação com esses elementos genéticos (Figura 4) faz com que contribuam para a transferência do gene intraespecífico e da disseminação de resistência em função dos carbapenens (CHERUVANKY *et al.*, 2017). O transposon faz parte da família dos transposons Tn3; em sua composição, há uma transposase (*tnpA*), uma resolvase (*tnpR*), o gene *bla*_{KPC}, as duas sequências de inserção IS*Kpn7* e a IS*Kpn6*, bem como as sequências invertidas repetidas de

39 pares de base, as quais flanqueiam o transposon com aproximadamente 10 kilobas (NAAS *et al.*, 2008; CHEN *et al.*, 2012; RIBEIRO *et al.*, 2013; SHEPPARD *et al.*, 2016).

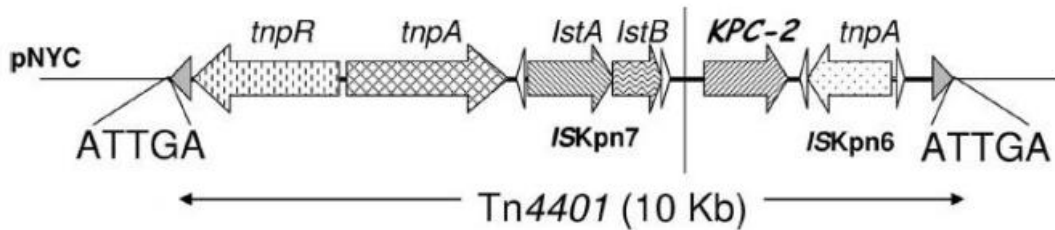


Figura 4: Esquema representativo do Transposon Tn4401, elemento genético que tem sido associado ao gene *bla*_{KPC-2}

Fonte: Adptado de Nass *et al.* (2008).

Há registro de seis isoformas (“a”, “b”, “c”, “d”, “e” e “f”) caracterizadas por suas variações ao longo da região de sequência de inserção *ISKpn7*. Dessas, as isoformas “a”, “b” e “c” são as encontradas com maior frequência (KITCHEL *et al.*, 2009). Além disso, a sequência de inserção *ISKpn7* com ausência de deleções é descrita como a isoforma “b” e seu produto de amplificação utiliza os iniciadores apresentados em 2009 de 703 pb (KITCHEL *et al.*, 2009). As outras isoformas apresentam diferentes deleções em sua região do *ISKpn7*. Nessa região, sua isoforma “a” desse transposon possui uma deleção de 99 pb e a isoforma “c” apresenta a deleção de 215 pb; ademais, a isoforma “d” apresenta uma deleção de 68 pb e a “e” diferencia-se com uma deleção de 255 pb (KITCHEL *et al.*, 2010; NAAS *et al.*, 2012;). Porém, algumas das demais plataformas genéticas foram registradas com associação à disseminação do gene *bla*_{KPC}. As amostras, registradas na China de *K. pneumoniae*, o gene *bla*_{KPC} foi descrito por uma plataforma genética híbrida, a qual continha partes do transposon Tn4401 e trechos dos transposons Tn3 e Tn1721, conforme mostra a Figura 5 (SHEN *et al.*, 2009; CHERUVANKY *et al.*, 2017).

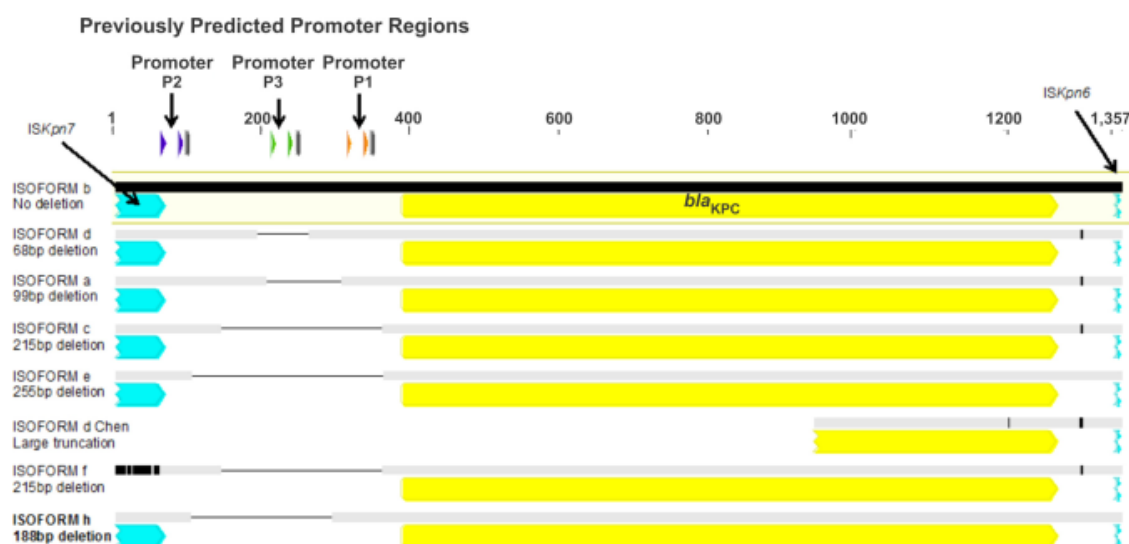


Figura 5: Gene *bla_{KPC}*

Fonte: Adaptado de Cheruvanky *et al.* (2017).

Na sequência, apresentada na Figura 5, a qual está destacada em amarelo, denota a sequência de referência Tn4401b (EU176013). Barras de sequência cinza denotam áreas de 100% de identidade com a referência; barras de sequência negra denotam áreas de variação de nucleotídeos.

3.3.2.1 Plasmídeos e grupos de incompatibilidade plasmidial (Inc)

Os genes *bla_{KPC}*, os quais codificam as KPCs, estão nos plasmídeos transferíveis sendo flanqueados por elementos transponíveis, o que permite, assim, que o gene se mova do plasmídeo para o cromossomo bacteriano e de volta (SHANMUGAM *et al.*, 2013). Dentre os principais fatores responsáveis pela resistência bacteriana a antimicrobianos, estão a pressão seletiva e a aquisição de genes de resistência. Os genes são importantes por codificar a resistência e são localizados no DNA cromossomal bacteriano ou em seus plasmídeos, transposons e integrons. A estabilidade do DNA devido ao seu tamanho consideravelmente grande, quando comparado ao DNA plasmidial, o qual é facilmente transportado de uma linhagem a outra por meio de conjugação bacteriana, permite a transferência de genes de resistência em conjunto (LIMA *et al.*, 2014; PEREIRA *et al.*, 2015).

Os plasmídeos são definidos como elementos genéticos comumente circulares e extracromossômicos com capacidade de replicação por meio de uma sequência de DNA, a qual serve como um ponto inicial (origem) para a replicação de seu DNA. Mesmo que a replicação plasmidial seja autônoma, os plasmídeos apresentam importantes formas de controlar a quantidade de cópias do mesmo plasmídeo em uma célula bacteriana (OZGUMUS *et al.*, 2008; SCHWARZ; JOHNSON, 2016). Com base na capacidade de transmissão dos

plasmídeos por meio da conjugação bacteriana, eles são classificados como plasmídeos conjugativos ou não conjugativos (CARATTOLI *et al.*, 2009; ROGERS; STENGER, 2012).

Sendo assim, os plasmídeos conjugativos podem apresentar incompatibilidade entre eles, o que impede a coexistência de tipos similares dentro de uma mesma célula, que pertence ao mesmo Inc (BERGER *et al.*, 2013). A incompatibilidade é uma forma de manifestar a relação entre os plasmídeos que compartilham controles de replicação comum (BERGER *et al.*, 2013).

A classificação e a identificação dos plasmídeos devem basear-se em características genéticas presentes e constantes. Esses critérios são mais bem atendidos por traços relacionados com a manutenção do plasmídeo, em especial, controles de replicação (RODRIGUES *et al.*, 2016). Desde 2005, está disponível um esquema de tipagem com base em PCR (*Polymerase Chain Reaction*), sendo o alvo os replicons das principais famílias de plasmídeos que ocorrem em *Enterobacteriaceae* (HI2, HI1, I1- α , X, L / M, N, FIA, FIB, FIC, W, Y, P, A / C, T, K, B / O) (CARATTOLI *et al.*, 2005). Os primeiros Inc's foram definidos da seguinte forma: Tipo Inc I, plasmídeos produtores de pili I, suscetíveis ao fago I_{fl}; Inc N, plasmídeos relacionados à N3, suscetíveis ao fago I_{Ke}; Inc F, plasmídeos produtores de Pili tipo F, e suscetíveis ao fago F_f e Inc P, plasmídeos RP4 e aptos ao fago PRR1. Em *Enterobacteriaceae*, são conhecidos 27 grupos Inc's da seção plasmidial da Coleção Nacional de Culturas (Londres, Reino Unido), incluindo seis variantes do IncF e três do IncI. Deve se ressaltar que também existem Inc's ainda não tipáveis (JACOBY *et al.*, 2006; CARATTOLI *et al.*, 2009; BERGER *et al.*, 2013).

Atualmente, sabe-se que os plasmídeos bacterianos estão fortemente relacionados à resistência aos carbapenêmicos clinicamente relevantes e às cefalosporinas de terceira geração (HARMER; HALL, 2015). Em função de resultantes das PCR de tipagem de replicons que foram sequenciados, apontou-se a porção relacionada para a tipagem do plasmídeo, o repA do plasmídeo A/C de referência RA1 não eram idênticos. Com isso, surgiram linhagens que foram designadas Inc A/C1 (RA1) e A/C2 (CARATTOLI *et al.*, 2005). Dentre os diversos plasmídeos conjugativos, há uma especial atenção para o plasmídeo Inc L/M, um dos seis grupos principais de plasmídeos de resistência identificados em *Enterobacteriaceae*. Plasmídeos representando esse grupo de incompatibilidade foram identificados como portadores de vários genes de resistência a β -lactâmicos e que codificam ESBLs, carbapenems de classe A, B e D, e BLA de classe C (ADAMCZUK *et al.*, 2015). A estrutura genética dos plasmídeos circulares está representada na Figura 6.

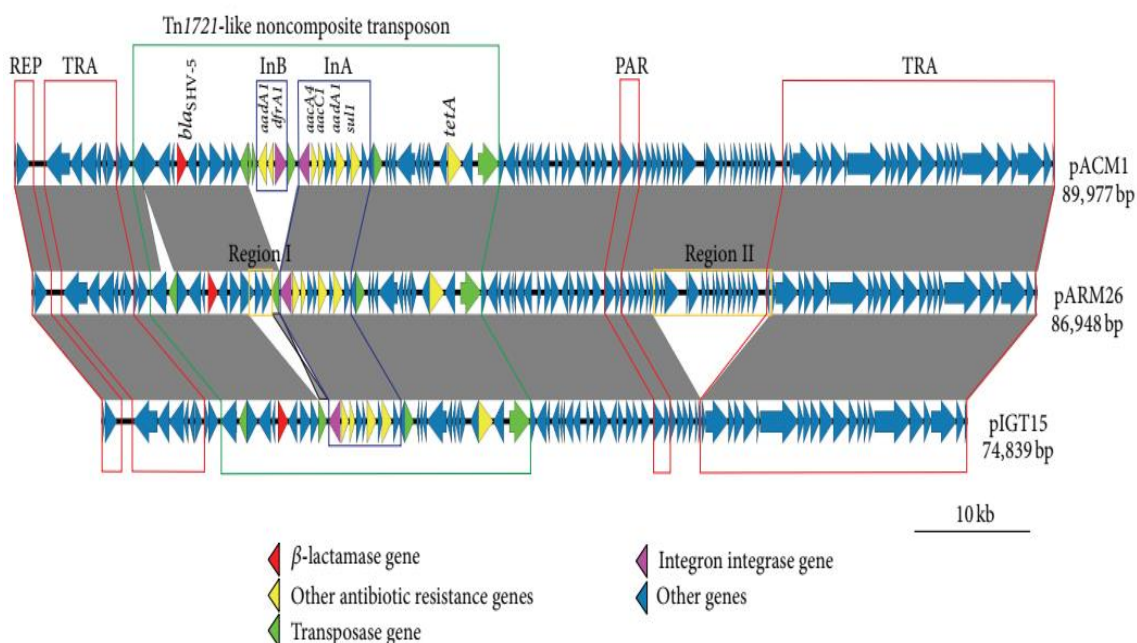


Figura 6: Mapa linear mostrando a estrutura genética dos plasmídeos circulares pACM1, pARM26 e pIGT15.

Fonte: Adamczuk (2015).

Na Figura 6, as setas apontam a direção da transcrição gênica. A área sombreada de cinza conecta regiões de DNA de diferentes plasmídeos com pelo menos 99% de identidade de sequência de nucleotídeos. Os quadros amarelos indicam regiões de DNA (I e II) de pARM26 não presentes no pIGT15. REP: sistema de replicação; TRA: sistema de transferência conjugal; PAR: sistema de particionamento; InA e InB: integrons de classe 1.

Em *Enterobacter aerogenes*, são comumente descritos os IncA/C (CARATTOLI, 2009; LINDSEY *et al.*, 2011), L/M (PRESTON *et al.*, 2014) e HI-2 (QUILES *et al.*, 2015; ADAMCZUK *et al.*, 2015); na Polônia, observaram a sequência genômica do plasmídeo IncL/M de *Enterobactérias* (*Klebsiella oxytoca*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Erwinia amylovora*, *Escherichia coli* e *Serratia marcescens*) e observaram a presença dos genes de resistência *aadA2*, *bla_{CTX-M-14}*, *bla_{FOX-7}*, *bla_{IMP-4}*, *bla_{IMP-34}*, *bla_{KPC-4}*, *dfrA1*, *dfrA12*, *mphA*, *strA* e *strB*, sugerindo que boa parte dos genes, que conferem resistência ao grupo dos β-lactâmicos, está localizada no plasmídeo IncL/M. Em Recife-PE, Cabral (2016) analisou a sequência completa do DNA genômico de dois isolados de *Enterobacter aerogenes* e dois de *Enterobacter cloacae*, de maneira que observaram a presença dos IncA/C e L/M em ambos isolados de *Enterobacter aerogenes* do estudo e o Inc HI-2 nos isolados de *Enterobacter cloacae*.

Os genes de resistência podem ser encontrados frequentemente inseridos no elemento móvel transposon. Adler (2016), em um estudo realizado em um Hospital de Israel, analisou a presença do gene *bla_{KPC}* inserido no Transposon Tn4401, nos plasmídeos IncFII e IncN, em isolados da família *Enterobacteriaceae*, incluindo *Klebsiella pneumoniae*,

blaNDM, responsáveis pela expressão das enzimas que conferem resistência à cepa (KPC e NDM) (BATISTA, 2020).

As técnicas moleculares podem ser aplicadas para detectar associações, estratificar e refinar dados com base em mensurações sensíveis e específicas, contribuindo para, em atividades epidemiológicas, incluir a vigilância de doenças, investigação de surtos, identificação de padrões de transmissão e fatores de risco, entre casos aparentemente distintos, caracterizar interações patógeno-hospedeiro, detectar organismos não cultiváveis, e permitir melhor entendimento da patogênese das doenças em um nível molecular (AREND, 2015). A alta sensibilidade da técnica permite a detecção do patógeno na amostra original.

3.5 EFLUENTES HOSPITALARES

Os efluentes hospitalares são comumente descritos como veículos de dispersão de diversos patógenos; assim, apresentam concentrações elevadas de antimicrobianos e medicamentos oriundos de resíduos humanos, como urina e fezes de origem dos pacientes hospitalizados. Quando não tratados, esses efluentes são importantes contaminantes de mananciais de água, tanto superficialmente quanto de forma subterrânea, e ascendências multirresistentes de antimicrobianos podem representar riscos à saúde pública se atingirem o sistema de abastecimento (SILVA *et al.*, 2011; VECCHIA *et al.*, 2009).

Pouco se sabe sobre a destinação adequada dos efluentes gerados em atividades hospitalares, bem como sobre tratamentos implementados nessas instituições que minimizem o impacto. No entanto, sabe-se que são efluentes liberados de forma direta (sem tratamento prévio) na rede pública coletora de esgoto (ABREU *et al.*, 2010).

A RDC nº 306, publicada em 07 de dezembro de 2004, dispõe sobre o regulamento técnico para o gerenciamento de resíduos de serviços de saúde:

“[...] Os resíduos líquidos provenientes de esgoto e de águas servidas de estabelecimento de saúde devem ser tratados antes do lançamento no corpo receptor ou na rede coletora de esgoto, sempre que não houver sistema de tratamento de esgotamento coletivo atendendo a área onde está localizado o serviço [...]” (BRASIL, 2004, p.11).

Vários estudos apontam esse tipo de efluentes, produzidos em clínicas e hospitais; apresentam concentrações elevadas de bactérias resistentes aos antimicrobianos quando comparados com efluentes provenientes de fontes, como os efluentes domésticos, por exemplo. Porém, a consistência dos resultados ainda é escassa, visto que não se pode confirmar essa hipótese (REINTHALER *et al.*, 2010). Quando avaliada a resistência às drogas eliminadas nos efluentes, Abreu *et al.* (2010) apontam que a eliminação desses recursos nos

hospitais pode ocorrer por meio de excreções e dos líquidos biológicos, ou de descartes de fármacos não consumidos, devido ao fato de estarem fora do prazo de validade.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DA ESTAÇÃO DE ESGOTO E AMOSTRAGEM

Este projeto foi autorizado pelo Hospital Universitário do Oeste do Paraná (HUOP), instituição onde foram coletadas as amostras de efluente (Anexo A). A estação de esgoto atende o HUOP, localizado na região oeste do estado do Paraná, Brasil. O esgoto vem das unidades do hospital, incluindo laboratórios, reabilitação, diálise, unidades de internação e cirurgia, clínicas, lavanderia e refeitório (Figura 8). O hospital atende uma média de 2000 pacientes por mês e tem 800 funcionários trabalhando diariamente. No ano de 2019, quatro amostras sazonais foram coletadas, garantindo a representação de todas as estações do ano. De acordo com métodos padrão para o exame de água e águas residuais(efluentes), 500 mL de efluente foram coletados em garrafas estéreis no ponto de despejo dos resíduos líquidos para a rede pública do sistema de captação do esgoto. As amostras foram coletadas em períodos de ausência de chuvas em cada uma das estações do ano, respectivamente: verão, outono, inverno e primavera, a fim de avaliar a sazonalidade dos microrganismos. Todas as amostras foram mantidas em refrigeração e encaminhadas para o laboratório de microbiologia clínica do Hospital Universitário do Oeste do Paraná, as quais foram processadas em até uma hora após a coleta.

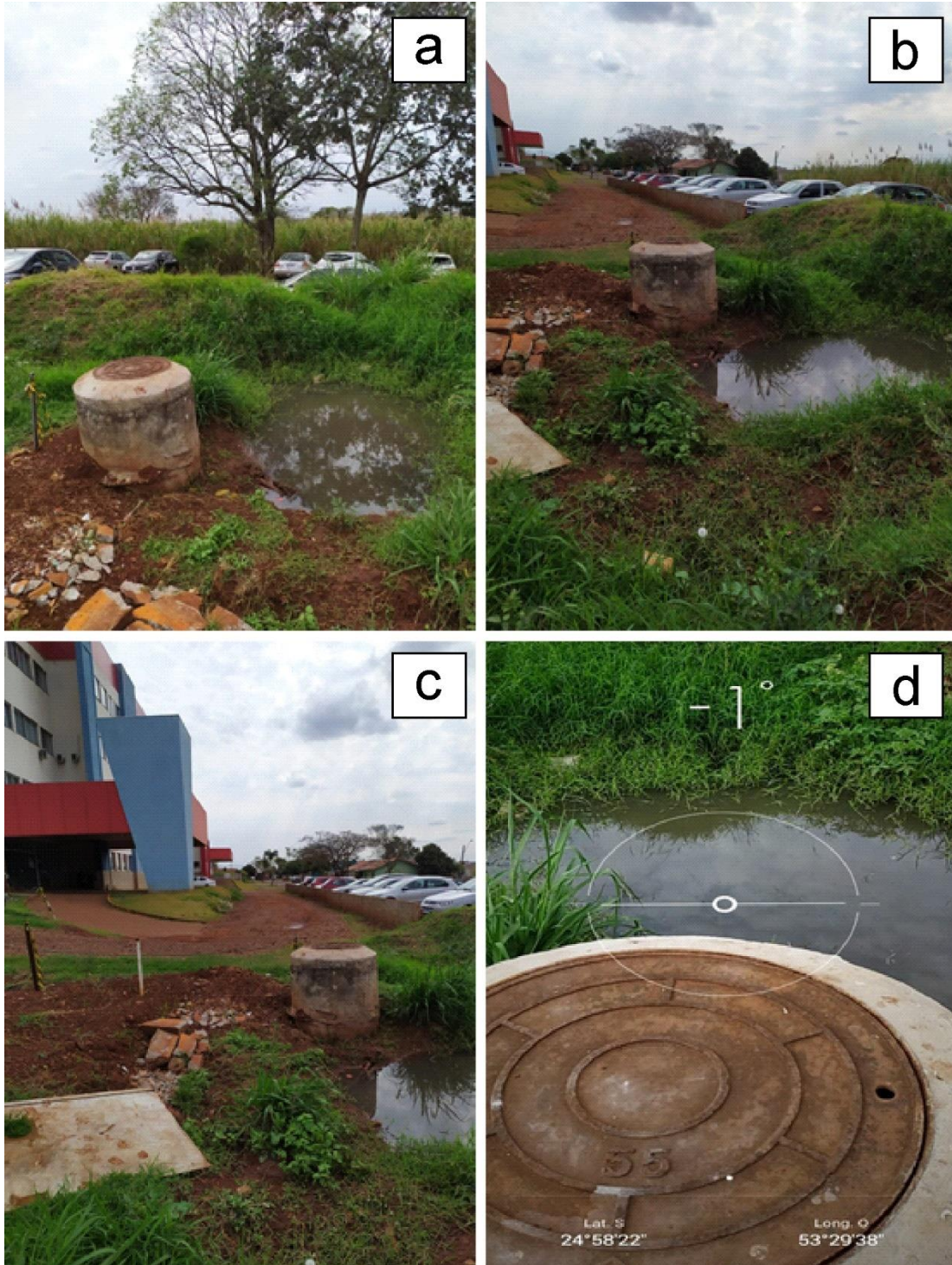


Figura 8: Ponto de coleta do esgoto do Hospital Universitário do Oeste do Paraná (HUOP), sendo a) visão superior da saída do efluente e os resíduos com vazamento; b) outro ângulo da mesma saída mostrando a proximidade com o estacionamento do vazamento; c) ângulo da mesma saída mostrando a proximidade com as instalações prediais do Hospital; d) coordenadas com a localização do ponto de coleta.

Fonte: A autora (2019).

4.1.1 Área de estudo

O córrego Bezerra tem sua nascente situada no perímetro urbano de Cascavel, conforme visto na Figura 9, e é afluente do Rio das Antas que pertence à bacia do rio São Francisco Verdadeiro, o qual, por sua vez, faz parte da bacia Paraná 3.

A bacia hidrográfica do Rio da Antas está inserida no retângulo envolvente compreendido pelas coordenadas geográficas: $\varphi = -24^{\circ} 49' 47''$ a $\varphi = -24^{\circ} 59' 02''$ de latitude e $\lambda = -53^{\circ} 26' 24''$ a $\lambda = -53^{\circ} 37' 53''$ de longitude. Abrange uma área de 134,53 Km², que corresponde a, aproximadamente, 1,7 % da área total da bacia hidrográfica do Paraná 3 (Figura 9).

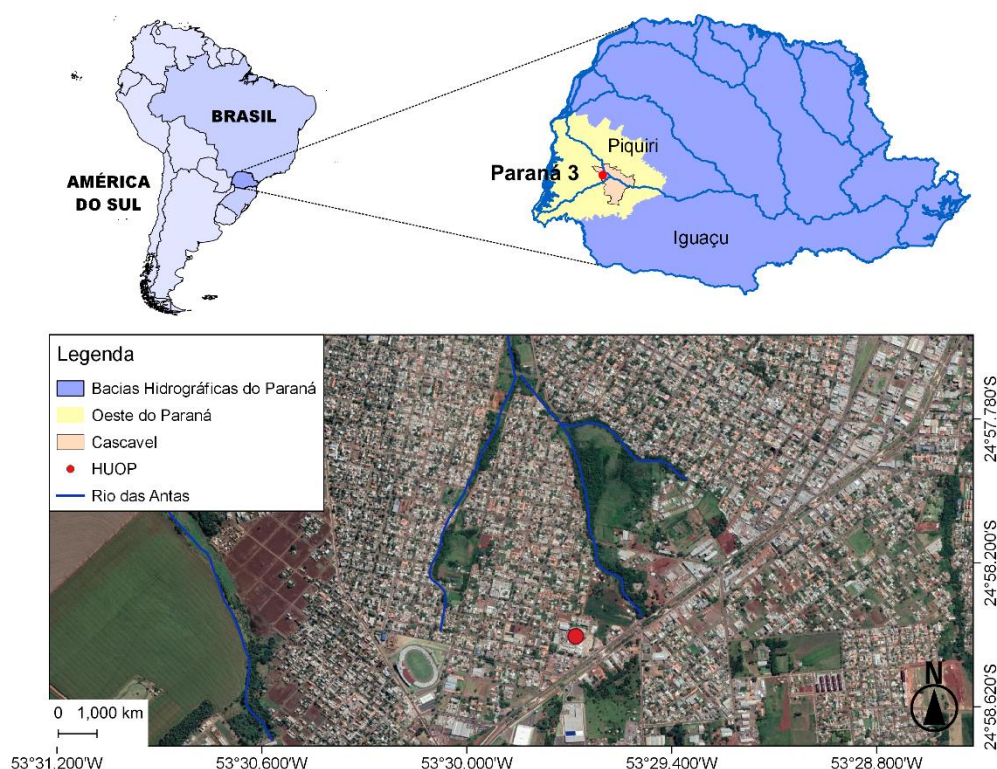


Figura 9: mapa de localização do rio das Antas (Pertencente a Bacia do Paraná 3) e do Hospital Universitário do Oeste do Paraná (HUOP), localizados no município de Cascavel – PR, Brasil.
 FONTE: Autora, 2021.

4.2 METODOLOGIAS DE TIPAGEM DE *K. pneumoniae*

Do ponto de vista epidemiológico, frequentemente, é necessária a determinação da relação clonal entre as cepas encontradas em diferentes partes do mundo, muitas vezes, envolvidas em surtos. Assim, estudos de tipagem bacteriana são extremamente necessários para a investigação da fonte de possíveis surtos e para identificar cepas epidêmicas ou endêmicas.

4.3 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO

4.3.1 Culturas bacterianas

Para as contagens bacterianas, amostras de efluente foram coletadas e diluídas em série de 10 vezes até 10^{-8} em solução salina estéril (0,9% NaCl). Alíquotas de 0,1 mL de cada diluição foram submetidas à cultura seletiva em diferentes meios de cultura (meios: Sangue, chocolate, MacConkey, CromoAgar, Chapman).

A menor diluição que produzir crescimento bacteriano foi submetida à identificação e possível teste de suscetibilidade aos antimicrobianos (Figura 10).

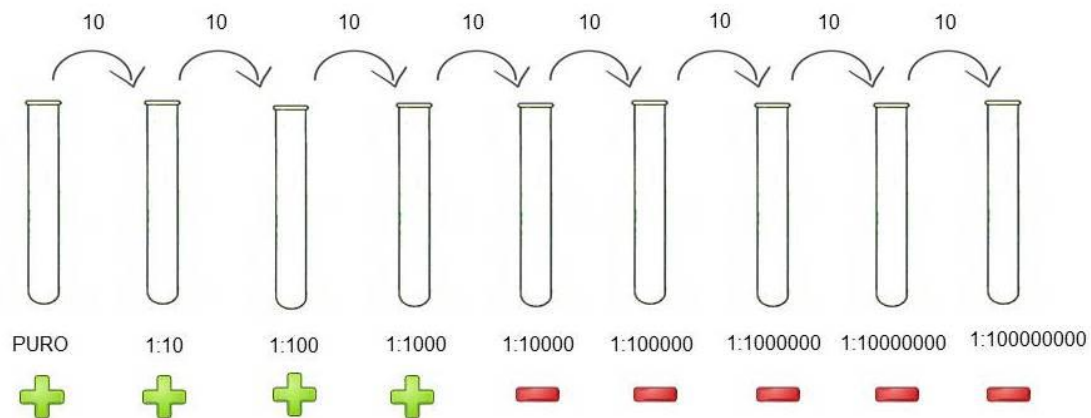


Figura 10: Diluição e Crescimento
Fonte: Autora, 2019.

As bactérias Gram-negativas foram avaliadas conforme crescimento em meio diferencial e seletivo (Ágar MacConkey), de forma a se obter colônias isoladas, incubando-se em estufa bacteriológica a 37°C , por 18-24 horas, como demonstrado na Figura 11.



Figura 11: Cultivo de bactérias Gram-negativas.
Fonte Autora, 2019.

Após o crescimento em ágar MacConkey, os isolados foram analisados quanto à sua pureza e morfologia e, após, foram encaminhados para a caracterização fenotípica e genotípica.

4.4 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA

4.4.1 Identificação e teste de suscetibilidade aos antimicrobianos por MIC ($\mu\text{g/mL}$)

Os isolados foram submetidos à identificação e teste de suscetibilidade aos antimicrobianos (TSA) no aparelho Vitek2® (Biomérieux, França), utilizando-se os cartões GN (BioMérieux®) e, para o antibiograma, o cartão AST239 (BioMérieux®), seguindo as recomendações do fabricante. Essa identificação foi realizada no Laboratório de microbiologia clínica do HUOP.

4.4.1.1 Procedimento operacional padrão das amostras inseridas no Vitek 2®

Após a incubação, as placas que obtiveram crescimento bacteriano foram conduzidas para identificação das colônias em questão, bem como ao teste de suscetibilidade aos antimicrobianos. Posteriormente, as colônias foram preparadas da seguinte maneira, conforme orientação do fabricante do sistema automatizado Vitek 2®, por meio de cartões de identificação e antibiograma.

1 - Foi montada uma cassete com um tubo de Khan estéril para cada cartão a ser utilizado, conforme a seguinte Tabela 3:

Tabela 3 Caracterização das cassetes montadas para as bactérias Gram-negativas e Gram-positivas

Microorganismo	Cartões de identificação	Idade da cultura	Densidade do inóculo	Diluição para AST
Bactérias Gram-negativas	GN	18 a 24 h	0,5 – 0,63 McFarland	-
Bactérias Gram-negativas	GN e AST 239	18 a 24 h	0,5 – 0,63 McFarland	145 µL em 3,0 mL salina

Fonte: Autora, 2019.

2 - Foram dispensados 3,0 mL de salina estéril em cada tubo.

3 - Para cada cartão de identificação (Gram-negativo), foi preparada uma suspensão de colônias puras obtidas de crescimento recente na densidade, mostrada na tabela acima.

4 - Foi transferido o volume indicado da suspensão para o tubo equivalente ao cartão de suscetibilidade, conforme indicação da tabela acima. Após, foi homogeneizada a suspensão;

5 - Foi colocada a cassete dentro da câmara de vácuo (FILLER) do Vitek 2[®], fechada a porta e apertado o botão START FILL;

6 - Foi aguardado o aviso sonoro indicando o término do ciclo de inoculação dos cartões;

7 - Após, foi removida a cassete e fechada a porta do vácuo. Foi, então, colocada a cassete no LOADER dentro de 10 min., após a inoculação;

8 - Após o sinal sonoro, foi retirada a cassete vazia do LOADER;

9 - Os cartões recém-inseridos foram localizados no programa de gerenciamento do Vitek 2[®] e identificados por meio da leitura do código de barras da amostra correspondente; analisou-se a MIC pelo programa Advanced Expert System, incluso no Vitek 2[®], empregando os critérios estabelecidos pelo CLSI, 2019. Os antimicrobianos testados foram os carbapenens (meropenem, ertapenem, imipenem), penicilinas (ampicilina, ampicilina/sulbactam, piperacilina/tazobactam), cefalosporinas (cefuroxima, cefuroxima axetil, ceftazidima, ceftriaxona e cefepima), cefamicinas (cefexetina), quinolona (ciprofloxacina), aminoglicosídeos (acimacina, gentamicina), glicilciclinas (tigeciclina), polimixina B e colistina.

Amostras resistentes a pelo menos um dos carbapenêmicos foram testadas para a detecção do gene *bla*_{KPC} e *bla*_{NDM}. Após a avaliação das características morfofenotípicas, as cepas foram estocadas em BHI (Brain Heart Infusion), contendo glicerol a 10% (v/v) em ultrafreezer (-80°C) para posterior avaliação molecular.

4.5 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DAS CEPAS

A identificação molecular das cepas resistentes a carbapenêmicos isoladas foi realizada em colaboração com o Laboratório de Biologia Molecular vinculado ao Laboratório Central do Estado do Paraná (LACEN-PR). A identificação foi realizada por PCR em tempo real utilizando-se a plataforma Applied Biosystems 7500 Fast (Thermo Fisher Scientific[®]), por meio da técnica de PCR, em tempo real, usando sondas TaqMan.

4.5.1 Identificação da presença do gene *bla_{kpc}* e *bla_{NDM}*

O DNA genômico total das cepas bacterianas de *K. pneumoniae* foi extraído de acordo com protocolo original do CDC americano (CDC, 2011).

A extração do DNA foi realizada pelo método de lise por fervura para as técnicas de PCR em tempo real. Para o preparo dos lisados da amostra, os isolados foram inoculados em placa de ágar de soja tripticase, contendo 5% (v/v) de sangue de ovelha estéril, submetidas a crescimento durante a noite. Para preparo dos extratos brutos, uma única colônia bacteriana foi retirada e inoculada em 25 µL de água estéril ultrapura em microtubos estéreis livres de DNase e RNAsases; em seguida, foram adicionados 25 µL de NaOH 100 mM e homogeneizado por inversão. O tubo foi acoplado em termobloco a 99°C por 10 minutos, resfriado em banho de gelo picado por 5 minutos; após isso, foi neutralizado para pH 8,0, adicionando-se 18 µL de Tris-HCl 500 mM; após, foram adicionados 400 µL de água ultrapura gelada a cada tubo, homogeneizado por inversão, seguido de centrifugação a 16.000 x g por 3 minutos. Após, o lisado contendo um volume aproximado de 400 µL foi transferido para um novo microtubo de 1,5 mL de capacidade, rotulado e armazenado em ultrafreezer (- 80°C) para posterior utilização. Essa suspensão foi utilizada diretamente para os ensaios de PCR em tempo real.

As sondas TaqMan e oligonucleotídeos foram desenhados para que pudessem amplificar regiões genômicas de sequência altamente conservadas para cada alvo, com uma cobertura para todos os alelos conhecidos e publicados até o ano de 2019. Assim, foram utilizados oligonucleotídeos específicos (Tabela 4) para a amplificação dos genes *bla_{kpc}* e *bla_{NDM}* que correspondem aos genes de resistência confirmatórios para KPC e NDM (FLORES *et al.*, 2016). Para a identificação da espécie bacteriana estudada e como controle endógeno, foram utilizados oligonucleotídeos (tabela 3) específicos para a região do gene para rRNA 16S. As sequências dos oligonucleotídeos foram verificadas com base em ferramenta BLASTnt do NCBI (National Center for Biotechnology Information); a temperatura de anelamento, probabilidade de formação de dímeros intra e inter-oligonucleotídeos diretos e

reversos e porcentagem do conteúdo GC (guanina e citosina) foram determinados utilizando o programa primers-BLAST (National Center for Biotechnology Information).

Tabela 4 Oligonucleotídeos utilizados para identificação molecular

Oligonucleotídeos	Sequência nucleotídica, 5'- 3'
KPC-F Primer	GGC CGC CGT GCA ATA C
KPC-R Primer	GCC GCC CAA CTC CTT CA
NDM-F Primer	GAC CGC CCA GAT CCT CAA
NDM-R Primer	CGC GAC CGG CAG GTT
16S rRNA-F	TGG AGC ATG TGG TTT AAT TCG A
16S rRNA-R	TGC GGG ACT TAA CCC AAC A

Fonte: CDC, 2011.

4.6 PCR EM TEMPO REAL qRT-PCR

Foi utilizado o procedimento para detecção de *bla*_{KPC} e *bla*_{NDM-1} por PCR usando sondas TaqMan Fast Advanced Master Mix® em uma única reação para bactérias Gram-negativas.

4.6.1 Validação do método

O ensaio foi validado no instrumento de PCR em tempo real ABI 7500 Fast (Thermo Fisher Scientific®), usando uma coleta de isolados positivos para NDM e KPC, bem como isolados contendo outros genes de resistência a antibióticos (ex.: AmpC, CTX-M, OXA, PME, VIM, IMP, GIM, SIM, SPM). Este ensaio demonstrou 100% de sensibilidade e especificidade para a detecção de NDM e KPC.

4.6.2 Controles para qRT-PCR

Um controle negativo sem adição de amostra foi incluído em todos os experimentos de qRT-PCR para testar a presença de provável DNA contaminante (como DNA de outras fontes ou produto de PCR de uma execução anterior).

Foram utilizadas cepas de controle de DNA em cada execução, sendo: controle negativo de KPC e NDM. Como controle negativo para KPC e NDM, foi usada a cepa *K. pneumoniae* ATCC BAA-1706; para controle positivo de KPC, a cepa *K. pneumoniae* ATCC BAA-1705 foi utilizada; e, para controle positivo NDM, foi usada a cepa *K. pneumoniae* ATCC BAA-2146.

4.6.3 Realização do ensaio de triagem por PCR do gene *bla*

O DNA extraído de acordo com o item 4.4.1 foi utilizado para amplificação. Os reagentes foram retirados do freezer e deixados em temperatura ambiente. Foi preparada uma solução contendo oligonucleotídeos direto e reverso (20 μM) e sonda a uma concentração final 10 μM . Os reagentes foram manipulados em banho de gelo picado, armazenados no gelo e cobertos com papel alumínio durante o descongelamento para proteger os fluoróforos da degradação pela luz. A reação foi preparada para um volume final de 20 μl , para cada amostra de teste e controle, e uma reação adicional caso houvesse perda por pipetagem. Foi realizada a homogeneização do tubo por pipetagem, seguida de centrifugação por 30 segundos a 6.000 rpm a 4°C.

Cada reação foi manipulada com solução tampão de PCR 2x Thermo Scientific®.

10 μL , mistura de sondas e oligonucleotídeos 5 μL , água estéril ultrapura 3 μL , totalizando um volume de 18 μL , Master Mix (+ 2 μL de template = 20 μL de reação), sendo que as concentrações finais foram de 500 nM de cada primer e 250 nM de cada sonda.

Durante a distribuição da solução obtida, foram pipetados 18 μL da solução principal final em cada poço de reação na placa de 96 poços, adicionados 2 μL de molde aos respectivos poços; certificamos que o controle sem molde foi adicionado e, finalmente, foi pipetado para cima e para baixo para misturar; após, foi coberta a placa com filme adesivo óptico. As reações de termociclagem foram realizadas nas seguintes condições: desnaturação 94°C, por 5 minutos, seguida de 35 ciclos a 94°C, por 45 segundos, 65°C, por 5 segundos, 72°C, por 45 segundos; uma extensão final de 72°C, por 7 minutos, e posterior purificação com 2 μL para cada 5 μL de produto de PCR; também, posterior incubação a 37°C, por 15 minutos e 80°C por 15 minutos. A coleta da fluorescência foi realizada durante a amplificação do material genético a 72°C. Para cada ensaio, foi determinada a linha basal (baseline) da curva de amplificação definida por padrão no equipamento. O mesmo "threshold" foi definido para todas as amostras realizadas na mesma placa, acima de qualquer ruído de fluorescência e na fase logarítmica das diferentes curvas de amplificação para todas as amostras da mesma placa.

4.6.4 Análise dos dados

Para a análise descritiva, assim como a tabulação e armazenamento dos dados, criação de tabelas e gráficos, foi utilizado o programa Microsoft Excel 2010.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PERFIL FENOTÍPICO

No gráfico apresentado na Figura 12, é mostrada a frequência de microrganismos isolados por estação do ano, de maneira que é possível observar que, na primavera, ocorreu uma maior frequência de microrganismos e, no verão, houve a menor frequência dessa ocorrência.

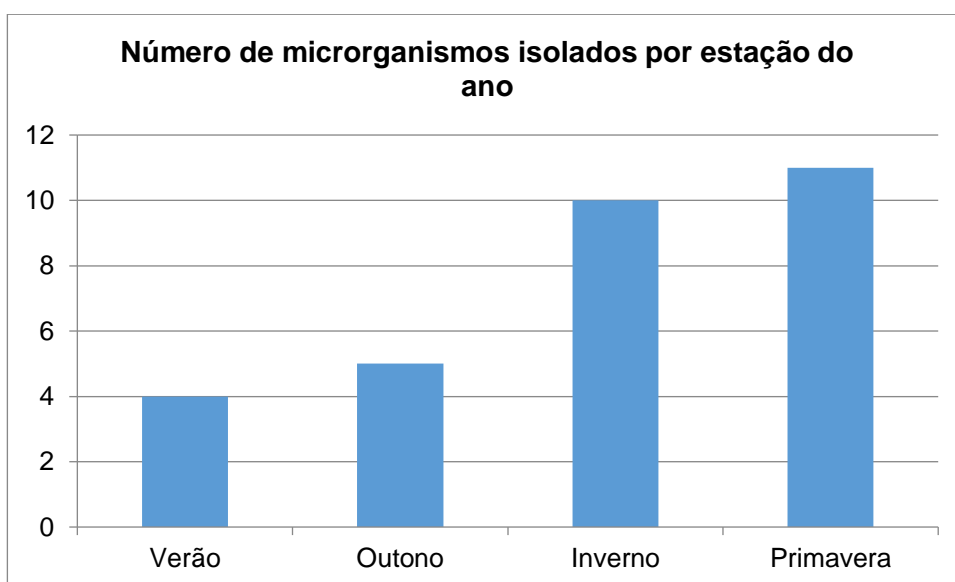


Figura 12: Gráfico de Frequência absoluta do número de microrganismos isolados por estação do ano.

A análise fenotípica para determinação de gênero/espécie apresentou as seguintes frequências (30 cepas identificadas): na amostra coletada durante o verão, foram identificadas 4 cepas, sendo: 1 cepa de *K. pneumoniae* ssp. *pneumoniae*, 1 cepa de *Vibrio fluvialis*, 1 cepa de *Aeromonas hydrophila* e 1 cepa de *Aeromonas sobria*. Já na amostra coletada durante o outono, foram identificadas 5 cepas: 2 cepas de *K. pneumoniae* ssp. *pneumoniae*, 2 cepas de *Enterobacter cloacae* complex e 1 cepa de *Aeromonas sobria*. No inverno, 3 cepas de *Escherichia coli*, 1 cepa de *Pseudomonas stutzeri*, 1 cepa de *Aeromonas hydrophila/caviae*, 1 cepa de *Pseudomonas putida*, 2 cepas de *Klebsiella oxytoca*, 1 cepa de *Serratia liquefaciens* e 1 cepa de *K. pneumoniae* ssp. *pneumoniae*. Na coleta referente à primavera, foram identificadas 11 cepas, sendo: 1 cepa de *Citrobacter freundii*, 3 cepas de *Escherichia coli*, 1 cepa de *Enterobacter cloacae* complex, 2 cepas de *K. pneumoniae* ssp. *pneumoniae*, 2 cepas de *Enterococcus gallinarum*, 1 cepa de *Aeromonas hydrophila/caviae* e 1 cepa de *Aeromonas sobria*. A distribuição das espécies identificadas em cada estação do ano é apresentada na Tabela 5.

Tabela 5 distribuição das cepas identificadas de acordo com a estação do ano

Estação do Ano	Gênero/Espécie
Verão	<i>Aeromonas hydrophila</i>
	<i>Aeromonas sobria</i>
	<i>K. pneumoniae</i> ssp. <i>Pneumoniae</i>
	<i>Vibrio fluvialis</i>
Outono	<i>Aeromonas sobria</i>
	<i>K. pneumoniae</i> ssp <i>pneumoniae</i>
	<i>Enterobacter cloacae</i> complex
	<i>K. pneumoniae</i> ssp <i>pneumoniae</i>
Inverno	<i>Aeromonas hydrophila</i>
	<i>Escherichia coli</i>
	<i>K. pneumoniae</i> ssp <i>pneumoniae</i>
	<i>Klebsiella oxytoca</i>
	<i>Pseudomonas putida</i>
	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
	<i>Serratia liquefaciens</i>
	<i>Escherichia coli</i>
	<i>Klebsiella oxytoca</i>
<i>Escherichia coli</i>	
Primavera	<i>Aeromonas hydrophila</i>
	<i>Aeromonas sóbria</i>
	<i>Citrobacter freundii</i>
	<i>Enterobacter cloacae</i> complex
	<i>Enterococcus gallinarum</i>
	<i>Escherichia coli</i>
	<i>K. pneumoniae</i> ssp <i>pneumoniae</i>
	<i>Escherichia coli</i>
<i>K. pneumoniae</i> ssp <i>pneumoniae</i>	
<i>Escherichia coli</i>	
<i>Enterococcus gallinarum</i>	

A Tabela 6 apresenta os valores da MIC de acordo com o CLSI 2019 para antimicrobianos utilizados para enterobactérias.

Tabela 6 Interpretação da concentração inibitória mínima (MIC) de acordo com o CLSI 2019 para antimicrobianos utilizados para enterobactérias

Antimicrobiano	MIC µg/mL		
	S	I	R
Ampicilina	≤8	16	≥32
Ampicilina/Sulbactam	≤8	16	≥32
Piperacilina/Tazobactam	≤16	32	≥128
Cefuroxima	≤8	16	≥32
Cefuroxima axetil	≤8	16	≥32
Cefoxitina	≤8	16	≥32
Ceftazidima	≤4	8	≥16
Ceftriaxona	≤1	2	≥4
Cefepima	≤2	-	≥16
Amicacina	≤16	32	≥64
Gentamicina	≤4	8	≥16
Ciprofloxacina	≤0,06	0,12-0,5	≥1

*S: sensível I: Intermediario R: Resistente

Cabe ressaltar que não há padronização para o antibiótico Tigeciclina no CLSI. O antibiótico Colistina é comumente usado para infecções por bactérias não fermentadoras da glicose, portanto, ele não tem padronização pelo CLSI para uso em infecções por enterobactérias, mas pode ser utilizado quando forem produtoras de carbapenemase servindo de escolha alternativa.

A Tabela 7 apresenta o perfil de resistência aos antimicrobianos das espécies isoladas no estudo.

Tabela 7 Frequência de resistência aos antimicrobianos das cepas isoladas de cada um dos microrganismos e a respectiva estação do ano correspondente a coleta do material cultivado SC: Suscetibilidade; MIC: concentração inibitória mínima; out: outono; in: inverno; prim: primavera; ver: verão.

		AMP	ASB	AMI	CPM	CFO	CAZ	CRO	CRX	CIP	COL	ERI	ERT	GEN	IPM	LIN	MPM	PTZ	TEI	TIG	VAN
<i>K. pneumoniae</i> <i>ssp pneumoniae</i>	out*5	MIC	≥32	≥32	≤2	4	≤4	≤1	16	≥64	1	≤0,5		≤0,5	≤1	≤0,25		≤0,25	8		≤0,5
		SC	R	R	S	I	S	S	R	R	S	S		S	S	S		S	S		S
	in*19	MIC	≥32	≥32	≤2	≥64	≤4	≥64	≥64	≥64	1	≤0,5		≤0,5	≤1	≤0,25		≤0,25	16		1
		SC	R	R	S	R	S	R	R	R	S	S		S	S	S		S	S		S
	prim* 27	MIC	≥32	≥32	32	8	≤4	16	≥64	≥64	≥4			≤0,5	8	≤0,25		≤0,25	32		
		SC	R	R	R	R	S	R	R	R	R			S	R	S		S	R		
	ver*1	MIC	≥32	≥32	16	16	≥64	≥64	≥64	≥64	≥4	≤0,5		≥8	≤1	≥16		≥16	≥128		≥8
		SC	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S		R	S	R		R	R		R
	out*7	MIC	≥32	≥32	≥64	4	≤4	4	32	≥64	1	≤0,5		≤0,5	≥16	≤0,25		≤0,25	32		≤0,5
		SC	R	R	R	I	S	I	R	R	S	S		S	R	S		S	I		S
prim* 24	MIC	8	≤2	≤2	≤1	≤4	≤1	≤1	≤1	≤0,25			≤0,5	≤1	≤0,25		≤0,25	≤4		≤0,5	
	SC	R	S	S	S	S	S	S	S	S			S	S	S		S	S		S	
in*15	MIC	≥32	≥32	≥16	≤1	≤4	4	8	≥64	≤0,5			8	1	1		4	≥128		≤0,5	
	SC	R	R	R	R	S	R	R	R	S			R	S	R		S	R		S	
in*10	MIC	≥32	≥32	4	≤1	≤4	4	8	≥64	1			≥8	≥16	8		1	≥128		≤0,5	
	SC	R	R	S	R	S	R	R	R	S			R	R	R		R	R		S	
in*13	MIC		≥32	≤2	≤1	≤4	≤1		≥64	1				≥16	≤0,25		≤0,25	32		≤0,5	

		AMP	ASB	AMI	CPM	CFO	CAZ	CRO	CRX	CIP	COL	ERI	ERT	GEN	IPM	LIN	MPM	PTZ	TEI	TIG	VAN	
<i>A. hydrophila / caviae</i>	prim* 26	SC		R	S	S	S	S		R	S				R	S		S	I		S	
		MIC				32	≥64		≥64			≥4					8					2
		SC			I	R		R			R						I					S
	ver*2	MIC	≥32	≥32	16	2	≤4	4	≥64	≥64	≥4	≤0,5			8	8		≥16	≥128			1
		SC	R	R	S	S	S	S	R	R	R	S			I	I		R	R			S
		MIC	≥32	≥32	≤2	2	8	≤1	≥64	≥64	≥4			≤0,5	≥16	≤0,25		≤0,25	≤4			≤0,5
in*11	SC	R	R	S	R	S	R	R	R	R			S	R	S		S	S			S	
	MIC	≤2	≤2	≤2	≤1	≤4	≤1	≤1	4	≤0,25			≤0,5	≤1	≤0,25		1	≥128			≤0,5	
	SC	S	S	S	S	S	S	S	S	S			S	S	S		S	R			S	
<i>E. coli</i>	in*18	MIC	≥32	≥32	≤2	≥64	≥64	≥64	≥64	≥64	2	≤0,5		≥8	8	4		≥16	TRM			4
		SC	R	R	S	R	R	R	R	R	I	S		R	I	R		R				R
		MIC	≥32	≥32	≤2	≤1	16	≤1	≤1	32	≥4			≤0,5	≤1	≤0,25		≤0,25	8			≤0,5
	prim* 21	SC	R	R	S	S	I	S	S	R	R			S	S	S		S	S			S
		MIC	≥32	≥32	≤2	2	8	≤1	≥64	≥64	≥4			≤0,5	≥16	≤0,25		≤0,25	≤4			≤0,5
		SC	R	R	S	*R	S	*R	R	R	R			S	R	S		S	S			S
in*15	MIC	≤2	≤2	≤2	≤1	≤4	≤1	≤1	4	≤0,25			≤0,5	≤1	≤0,25		≤0,25	≤4			≤0,5	
	SC	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S		S	S	S		S	S			S	
	MIC	≥32	≥32	16	≤1	≥64	4	2	32	1	≤0,5		4	≥16	1		1	16*			1	
<i>E. cloacae complex</i>	out*6	SC	R	R	S	R	R	R	R	R	S	S		R	R	R		R	R			S
		MIC				≤2	≤1	≥64	≤1	≤1		≥4		≤0,5	≤1	≤0,5		≤0,2	8			

		AMP	ASB	AMI	CPM	CFO	CAZ	CRO	CRX	CIP	COL	ERI	ERT	GEN	IPM	LIN	MPM	PTZ	TEI	TIG	VAN
	prim* 23	SC		S	S	R	S	S		R			S	S	S		S	S			
		MIC	≥32	≥32	32	≤1	≥64	2	≥64	≥64	1	≤0,5	≥8	8	≤0,25		TRM	≥128		2	
	out*9	SC	R	R	I	R	R	*R	R	R	S	S	R	I	R			R		I	
		MIC	≥32	≥32	≤2	≤1	≤4	≤1	≤1	4	≥4	≤0,5		≤1	1		1	TRM		≤0,5	
	out*8	SC	R	R	S	S	S	S	S	S	R	S		S	S		S			S	
		MIC			≥64	8		16							8					≤0,5	
<i>A. sobria</i>	prim* 29	SC		R	R		R								I					S	
		MIC		≥32	≤2	8	≥64	≤4	4	TRM	1	≤0,5		≥16	≤0,25			≥32		≤0,5	
	ver*3	SC		R	S	S	R	S	S		S	S		R	S			R		S	
		MIC	≥32	≥32	≤2	≤1	32	≤1	≤1	16	2	≤0,5	≤0,5	≤1	≤0,25		1	8		≤0,5	
<i>S. liquefaciens</i>	in*17	SC	R	R	S	S	R	S	S	I	I	S	S	S	S		S	S		S	
		MIC			≤2	8		4	≥64		≤0,25			≤1	1		4	32		1	
<i>P. stutzeri</i>	in*12	SC		S	S		S	R		S				S	S		S	I		S	
		MIC			≤2	4		≤1	16		≥4			≤1			1	≤4		1	
<i>P. putida</i>	in*14	SC		S	S		S	I		R				S			S	S		S	
		MIC		≥32	8	≥64	≥64	≥64	≥64	64	≥4	≤0,5		≥16	≤0,25		2	≥32		≤0,5	
<i>V. fluvialis</i>	ver*4	SC		R	S	R	R	R	R	I	R	S		R	S		S	R		S	
		MIC			≤2	8	≥64	4	≥64		2		≤0,5	≥16	≤0,25		≤0,25	16			
<i>C. freundii</i>		MIC			≤2	8	≥64	4	≥64		2		≤0,5	≥16	≤0,25		≤0,25	16			

		AMP	ASB	AMI	CPM	CFO	CAZ	CRO	CRX	CIP	COL	ERI	ERT	GEN	IPM	LIN	MPM	PTZ	TEI	TIG	VAN		
<i>E. galinarum</i>	prim* 20	SC		S	R	R	I	R		R				S	R	S		S	I				
		MIC	≤2										≥8			2			≤0,5	≤0,12	1		
	prim* 25	SC	S										R			S			S	S	R		
		MIC	≤2										≥8			2			≤0,5	≤0,12	1		
	prim* 28	SC	S										R			S			S	R	R		

AMP: Ampicilina; ASB: Ampicilina/Sulbactam; PTZ: Piperacilina/Tazobactam; CRX: Cefuroxima axetil; CFO: Cefoxitina; CAZ: Ceftazidima; CRO: Ceftriaxona; CPM: Cefepima; ERT: Ertapenem; IPM: Imipenem; MPM: Meropenem; AMI: Acimacina; GEN: Gentamicina; CIP: Ciprofloxacina; TIG: Tigeciclina; COL: Colistina.

5.1.1 Perfis de suscetibilidade e resistência das cepas isoladas aos carbapenêmicos

A Tabela 8 apresenta a MIC recomendada pelo CLSI 2019 para os antimicrobianos da classe carbapenens.

Tabela 8 Interpretação da concentração inibitória mínima (MIC) de acordo com o CLSI 2019 para antimicrobianos da classe dos carbapenens

Antimicrobiano	MIC µg/mL		
	S	I	R
Meropenem	≤1	2	≥4
Imipenem	≤1	2	≥4
Ertapenem	≤0.5	1	≥2

*S: sensível I: Intermediário R: Resistente

A Tabela 9 mostra a frequência dos perfis de identificação fenotípica das cepas confirmadas como produtoras de ESBL. O perfil fenotípico de resistência aos carbapenêmicos das cepas KPC, isoladas no efluente não tratado do HUOP, é apresentado na Tabela 10.

Tabela 9 Cepas produtoras de ESBL identificadas fenotipicamente no efluente não tratado do HUOP.

Microrganismos	Cepas identificadas fenotipicamente	%
<i>K. pneumoniae ssp pneumoniae</i>	4	33,3
<i>Enterobacter cloacae complex</i>	2	16,66
<i>Klebsiella oxytoca</i>	2	16,66
<i>Escherichia coli</i>	3	25
<i>Citrobacter freundii</i>	1	8,33
Total	12	100

Tabela 10 Perfil fenotípico de resistência aos carbapenêmicos das cepas KPC isoladas no efluente não tratado do HUOP.

Espécie	Estação do Ano	β-lactamase (s) Perfil de resistência por teste de difusão de disco	MIC (µg / mL) por Etest		
			ERT	IPM	MPM
<i>K. pneumoniae ssp pneumoniae</i>	Verão	AMP, ASB, CPM, CAZ, CRO, CRX, GEN, PTZ	≥8	≥16	≥16
<i>K. oxytoca</i>	Inverno	AMP, ASB, CPM, CAZ, CRO, CRX, GEN, PTZ	≥8	8	1
<i>E. coli</i>	Inverno	AMP, ASB, CPM, CFO, CAZ, CRO, CRX, PTZ, TIG	≥8	4	≥16
<i>E. doacae complex</i>	Outono	AMP, ASB, CPM, CAZ, CRO, CFO, CRX, GEN, PTZ	4	1	1

A Tabela 11 mostra a suscetibilidade aos antimicrobianos e concentração inibitória mínima (MIC) para os isolados com perfil ESBL.

Tabela 11 Suscetibilidade aos antimicrobianos e concentração inibitória mínima (MIC) para os isolados com perfil ESBL

Antibióticos	<i>K. oxytoca</i>				<i>E. coli</i>						<i>K. pneumoniae ssp pneumoniae</i>						<i>C. freundii</i>		<i>E. cloacae complex</i>					
	Inverno 1		Inverno 2		Inverno 1		Inverno 2		Inverno 3		Verão		Inverno		Primavera		Outono1		Outono2		Primavera		Outono	
	MIC	S C	MIC	S C	MIC	S C	MIC	S C	MIC	S C	MIC	S C	MIC	S C	MIC	S C	MIC	S C	MIC	S C	MIC	S C	MIC	S C
AMP	≥32	R	≥32	R	≥32	R	≥32	R	≥32	R	≥32	R	≥32	R	≥32	R	≥32	R	≥32	R			≥32	R
ASB	≥32	R	≥32	R	≥32	R	≥32	R	≥32	R	≥32	R	≥32	R	≥32	R	≥32	R	≥32	R			≥32	R
AMI	≥16	R	4	S	≤2	S	≤2	S	≤2	S	16	S	≤2	S	32	R	≥64	R	≤2	S	≤2	S	16	S
CPM	≤1	*R	≤1	*R	2	*R	2	*R	≥64	R	16	R	≥64	R	8	R	4	I	4	I	8	R	≤1	*R
CFO	≤4	S	≤4	S	8	S	8	S	≥64	R	≥64	R	≤4	S	≤4	S	≤4	S	≤4	S	≥64	R	≥64	R
CAZ	4	*R	4	*R	≤1	*R	≤1	*R	≥64	R	≥64	R	≥64	R	16	R	4	I	≤1	S	4	I	4	*R
CRO	8	*R	8	*R	≥64	R	≥64	R	≥64	R	≥64	R	≥64	R	≥64	R	32	R	16	R	≥64	R	2	*R
CRX	≥64	R	≥64	R	≥64	R	≥64	R	≥64	R	≥64	R	≥64	R	≥64	R	≥64	R	≥64	R			32	R
CIP	≤0,5	S	1	S	≥4	R	≥4	R	2	I	≥4	R	1	S	≥4	R	1	S	1	S	2	R	1	S
COL									≤0,5	S	≤0,5	S	≤0,5	S			≤0,5	S	≤0,5	S			≤0,5	S
ERT	8	*R	≥8	R	≤0,5	S	≤0,5	S	≥8	R	≥8	R	≤0,5	S	≤0,5	S	≤0,5	S	≤0,5	S	≤0,5	S	4	R
GEN	1	S	≥16	R	≥16	R	≥16	R	8	I	≤1	S	≤1	S	8	R	≥16	R	≤1	S	≥16	R	≥16	R
IPM	1	*R	8	*R	≤0,25	S	≤0,25	S	4	R	≥16	R	≤0,25	S	≤0,25	S	≤0,25	S	≤0,25	S	≤0,25	S	1	*R
MPM	4	S	1	*R	≤0,25	S	≤0,25	S	≥16	R	≥16	R	≤0,25	S	≤0,25	S	≤0,25	S	≤0,25	S	≤0,25	S	1	*R
PTZ	≥128	R	≥128	R	≤4	S	≤4	S	TR M		≥128	R	16	S	32	R	32	I	8	S	16	I	16	*R
TIG	≤0,5	S	≤0,5	S	≤0,5	S	≤0,5	S	4	R	≥8	R	1	S			≤0,5	S	≤0,5	S			1	S

S: sensível I: Intermediário R: Resistente

5.2 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

A Figura 13 apresenta o gráfico que nos mostra a distribuição dos genes *bla*_{KPC} por espécie bacteriana isolada.

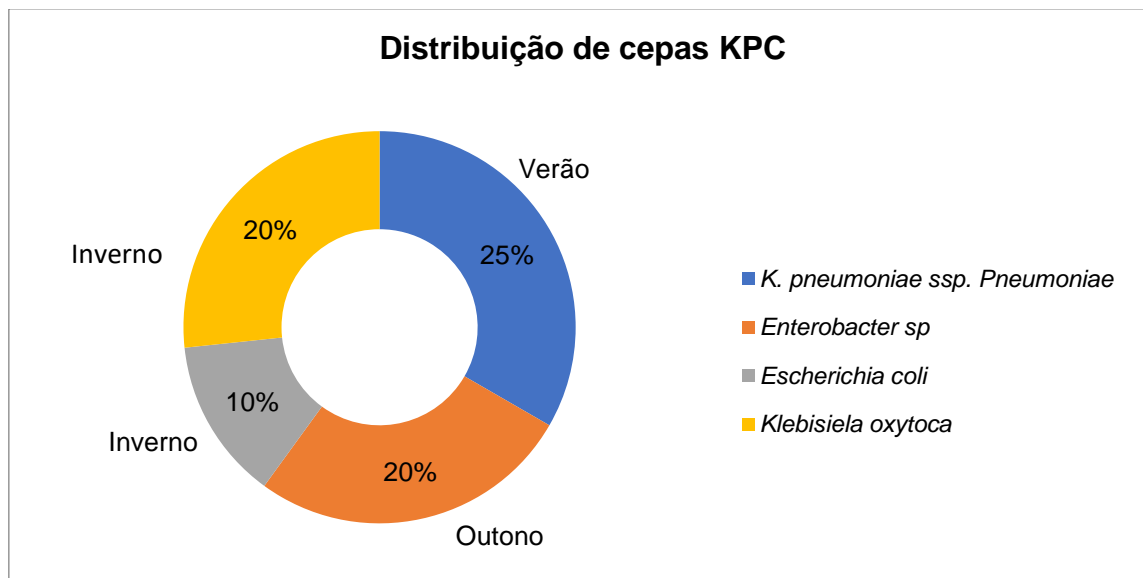


Figura 13: Distribuição dos genes *bla*_{KPC}.

**K. pneumoniae ssp pneumoniae* foi isolada no verão; *Enterobacter sp.* foi isolada no outono; *Escherichia coli* e *Klebsiella oxytoca* foram isoladas no inverno.

A cepa de *K. pneumoniae ssp. pneumoniae* isolada no outono apresentou um fenótipo positivo para ESBL. A cepa de *K. pneumoniae ssp. pneumoniae* isolada na amostra de verão produzia ESBL e apresentou resistência aos carbapenems (Meropenem, Ertapenem e Imipenem), em que a carbapenemase foi codificada pelo gene *bla*_{KPC}. No período do outono de 2019, foi isolada uma cepa com características fenotípicas de *Enterobacter cloacae*, com perfil de resistência ao ertapenem, meropenem e ao imipenem; o perfil genotípico detectado foi carbapenemase codificada pelo gene *bla*_{KPC}. No inverno, foi isolada uma cepa de *klebsiella oxytoca* e *Escherichia coli*, ambas resistentes aos carbapenems, codificadas pelo gene *bla*_{KPC}. (Tabela 12).

Tabela 12 Perfil fenotípico realizado pelo sistema VITEK-2 versus perfil genotípico pelo método RT-PCR. R: Resistente

espécie	estação	genótipo		fenótipo	
		RT-PCR	<i>bla</i> _{NDM}	VITEK-2	genótipo/fenótipo
<i>K. pneumoniae ssp pneumoniae</i>	verão	positivo	negativo	R	100%
<i>E. cloacae complex</i>	outono	positivo	negativo	R	100%
<i>K. oxytoca</i>	inverno	positivo	negativo	R	100%
<i>E. coli</i>	inverno	positivo	negativo	R	100%

5.3 DISCUSSÃO

O presente estudo registrou diversas cepas bacterianas isoladas ao longo do ano no efluente não tratado do HUOP, sendo inverno e primavera as que apresentaram maior riqueza de espécies registradas. Dentro desses grupos, foi possível registrar cinco espécies, distribuídas em oito cepas identificadas ao longo do ano, que expressaram β -lactamases de espectro estendido (ESBLs). Além disso, entre as ESBLs registradas, quatro apresentaram perfil de resistência *bla*_{KPC}. Os mecanismos de resistência não são novidade e estão se distribuindo mundialmente; embora cepas, como a KPC, tenham sido descritas em 2001, somente em 2005 é que aconteceu a sua primeira aparição no estado da Carolina do Norte - Estados Unidos e, em outubro de 2009, foi registrado o primeiro caso no estado do Paraná, Brasil (AREND *et al.*, 2014). Já a cepa de NDM, foi registrada primeiramente em 2008, na Índia, e, em 2013, teve seu primeiro surto na França, com primeiro caso descrito no Brasil (SILVA *et al.*, 2013; PICOLOTTO, 2018).

Efluentes hospitalares representam uma preocupação para a disseminação ambiental de bactérias portadoras de determinantes críticos de resistência antimicrobiana, uma vez que apresentam representativas concentrações de antimicrobianos. No Brasil, o consumo de antimicrobianos, bem como o perfil de resistência de cepas, que vêm sendo registradas, são preocupantes. Os dados do Sistema de Acompanhamento de Mercado de Medicamentos (SAMMED), em 2015, mostram que quase 73 milhões de embalagens de antimicrobianos foram comercializadas pela indústria farmacêutica (ANVISA, 2017). Apesar de não haver tendência de aumento na venda de antimicrobianos para a saúde humana, preocupa o fato de que a comercialização desses medicamentos também não diminuiu. Altas quantidades de doses subletais da maioria dos antibióticos administrados a humanos e animais são defecados como substâncias ativas, inevitavelmente alcançando ETARs por meio de águas residuais hospitalares (EBOMAH; OKOH, 2020).

Similarmente aos nossos resultados, um estudo no Rio de Janeiro - BR registrou dois isolados produtores de KPC-2 recuperados de efluentes de uma estação de tratamento de esgoto que atende um hospital. As cepas foram coletadas do efluente do tanque clarificador e efluente do tanque de contato de cloro, sendo todos os isolados de *K. pneumoniae* com resistência a cefalosporinas e carbapenêmicos de amplo espectro. Isolados produtores de KPC-2 continham outras enzimas de resistência β -lactamase detectadas pela presença dos genes *bla*_{KPC}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} em todas as cepas (CHAGAS *et al.*, 2011).

Picão *et al.* (2013) avaliaram a presença de bastonetes Gram negativos resistentes a antimicrobianos, com foco nos produtores de KPC, no efluente de um hospital universitário terciário, localizado em São Paulo- B; foram recuperados 312 bacilos Gram negativos no esgoto hospitalar e na ETAR. Nesse estudo, a família mais representada no esgoto hospitalar

foi Enterobacteriaceae, seguida por Aeromonadaceae. Esses isolados, como em nossos resultados, tiveram sua atividade carbapenemase confirmada, apresentando também representantes dos gêneros *Klebsiella* spp. *Enterobacter* spp entre os produtores de KPC-2.

Um estudo recente de Barancheshme e Munir (2018) sugeriu algumas estratégias para combater a resistência antimicrobiana (AMR) em ETARs, como atualizações de equipamentos com novos desenvolvimentos, e apontou que as águas residuais urbanas podem não sofrer idealmente procedimentos de tratamento ideais devido a instalações com avarias quando situadas principalmente nos países em desenvolvimento. Assim, os ambientes de recebimento são impactados negativamente por descargas de águas residuais e isso representa um risco significativo para a saúde pública, ou seja, o fato do efluente do HUOP estar exposto e apresentar grande potencial de contaminação ao rio das Antas torna-o um risco para a saúde da população.

Peirano *et al.* (2017) realizaram um estudo para determinar a distribuição global do complexo clonal e plasmídeos do tipo IncFII_{K2} com *bla*_{KPC} entre 522 isolados globais de *K. pneumoniae* produtores de *Klebsiella pneumoniae* (KPC), incluindo o Brasil. Segundo SAMPAIO (2017), a *Klebsiella pneumoniae* Enterobacteriaceae, produtora de carbapenemase, disseminou-se amplamente no Brasil na última década e a produção de KPC é atualmente o mecanismo de resistência mais frequente (96,2%) em *K. pneumoniae*; a KPC-2 é a única variante relatada no Brasil. A metalolactamase de Nova Déli foi detectada no Brasil, em 2013, sendo relatada em diferentes estados brasileiros, mas não está amplamente distribuída, o que corrobora nossos estudos, que detectaram apenas o gene *bla*_{KPC}.

As espécies registradas como ESBL pelos resultados também são relatadas em outros países de clima distinto. Said *et al.* (2016) analisaram a presença de β-lactamase de espectro estendido e Enterobacteriaceae produtora de β-lactamase mediada por plasmídeo AmpC (ESBL-Eb e pAmpC-Eb, respectivamente) de águas residuais e águas superficiais na Tunísia, país de clima temperado a semiárido. Ambas continham ESBL-Eb registrando os genes de β-lactamase *bla*_{CTX-M-1} (*Escherichia coli*), *bla*_{CTX-M-15} (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Citrobacter freundii*), *bla*_{CTX-M-14} (*Escherichia coli*) e *bla*_{CMY-2} (*Escherichia coli*). Prado *et al.*, (2007) estudaram amostras de uma estação de tratamento de esgoto hospitalar na região metropolitana da cidade do Rio de Janeiro – BR; analisado o esgoto bruto, efluente do reator UASB, efluente filtrado e lodo. *K. pneumoniae*, produtoras de ESBL foram detectadas em todas as amostras analisadas. Zhang *et al.* (2020) realizaram um estudo em Sichuan- China, clima temperado, e caracterizaram os isolados resistentes a cefalosporinas, carbapenem de esgoto hospitalar e rios receptores. Os resultados mostraram que os genes ESBL (*bla*_{CTX-M}) e carbapenemase (*bla*_{NDM} e *bla*_{KPC}) foram amplamente detectados em várias espécies bacterianas diferentes. Esses genes de resistência foram alojados principalmente em Enterobacteriaceae. Rodriguez *et al.* (2020), na Colombia, em clima tropical, também

registraram *bla*_{KPC-2} nos grupos Enterobacteriaceae, Aeromonaceae e Pseudomonaceae. Daoud *et al.* (2018), no Líbano, país de clima mediterrânico, também registraram resistência de bacilos Gram-negativos multirresistentes em duas estações de tratamento de esgoto hospitalar, detectando cepas de *Escherichia coli* e *Klebsiella spp.produtoras* de ESBL.

É fato que a resistência desses grupos de bactérias apresenta desafios para a terapia medicamentosa eficaz, porém, a proximidade do efluente não tratado com a nascente de um riacho pertencente a uma bacia de grande importância torna esse risco ainda maior. Schwermer; Uhl (2021) avaliaram a diferença nas cargas de nove marcadores genéticos (*bla*_{TEM-1D}, *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{CTX-M-32}, *bla*_{KPC-3}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{OXA-58}, *sul1*, *tetM* e *mcr-1*), decorrentes de ETARs, que não recebem águas residuais de hospitalares; ETARS, que recebem parcialmente águas residuais de hospitais; e ETAR, que recebe água residual hospitalar. A concentração de bactérias foi comparativamente alta nos efluentes das três ETARs. Nas taxas médias de fluxo do rio, o efluente da ETAR contribui com 5-15% da carga de genes de resistência a antimicrobianos no rio.

Outros estudos ainda detectaram as cepas similares às encontradas no efluente. Khan *et al.* (2018), por exemplo, realizaram um estudo em ambientes aquáticos, tendo feito uma comparação com isolados de hospitais locais na Suécia, por meio de análises fenotípicas e genotípicas de resistência a antibióticos carbapenêmicos, em amostras ambiental e clínica. Com esse estudo, foi possível identificar *Klebsiella oxytoca*, nas águas residuais do rio receptor, que carregavam genes carbapenemase (*bla*_{VIM-1}, *bla*_{IMP-29}), o que aparece em nossos resultados como positiva para *bla*_{KPC}. Ainda, nesse estudo, a *K. oxytoca*, isolada do rio, foi genotipicamente relacionada a dois isolados clínicos recuperados de pacientes (KHAN, 2018). A similaridade entre isolados ambientais e clínicos sugere a dispersão de *bla*_{VIM-1}, produzindo *K. oxytoca* ST172 do hospital para o ambiente aquático e a probabilidade de sua presença na comunidade. Outro estudo com cepas de *E. coli* de esgotos municipais, hospitalares e amostras ambientais na Polônia, visando verificar a resistência a antibióticos e a presença do gene *bla*, das 167 cepas isoladas de efluentes hospitalares, verificou que 37,1% foram ESBL-positivas (KORZENIEWSKA; KORZENIEWSKA; HARNISZ, 2013).

Nosso estudo registrou *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *E. cloacae* complex, *E. coli* e *C. freundii* características de β -lactamase de espectro estendido (ESBL). Alguns estudos, que registraram essas espécies ESBL em efluente hospitalar, também as encontraram no meio, mesmo com tratamento de esgoto. Conte (2017), por exemplo, caracterizou β -lactamase de espectro estendido (ESBL) e Enterobacteriaceae resistente a quinolonas de um efluente hospitalar, efluente sanitário, esgoto de entrada, tanque de aeração e esgoto de saída, em uma estação de tratamento de águas residuais, bem como as águas dos rios à montante e à jusante do ponto onde foi descarregado o efluente tratado da estação de tratamento. Isolados produtores de ESBL foram identificados em água bruta e tratada, incluindo *Escherichia coli*,

Klebsiella pneumoniae e *Klebsiella oxytoca*. Resistência aos carbapenêmicos foi encontrada em isolados de *K. pneumoniae* e de *K. oxytoca*, além da presença de bla_{CTX-} e bla_{SHV} ESBLs e bla_{GES} (CONTE *et al.*, 2017). Drieux *et al.* (2016) pesquisaram *E. coli* produtora de β-lactamase de espectro estendido em águas residuais de um hospital geriátrico francês e relação com a cepa do paciente. Sendo assim, o uso de antimicrobianos e a remoção ineficiente de bactérias MDR e resíduos de antibióticos, durante o tratamento de esgoto, podem contribuir para o surgimento e disseminação de resistência no meio ambiente.

A presença de genes de resistência a carbapenemase, em isolados de efluentes tratados e rios receptores, indica que as descargas de estações de tratamento de águas residuais podem ser uma fonte importante para a propagação de genes de resistência de alto risco para o meio ambiente. Ocorre ainda uma alta prevalência de bactérias produtoras de ESBL e carbapenemase em esgoto hospitalar e rios receptores (ZHANG *et al.*, 2020). Rodriguez *et al.* (2020) realizaram um estudo, no qual determinaram a presença e distribuição de bacilos Gram negativo resistentes a carbapenêmicos, nas diferentes etapas de uma ETAR, na Colômbia, e compararam com isolados previamente detectados no hospital registrando bacilos Gram negativo resistentes a carbapenêmicos, os quais abrigam bla_{KPC-2}, sendo as Enterobacteriaceae mais frequentes no efluente bruto e as Aeromonadaceae mais prevalentes no lodo ativado reciclado e no efluente final. Araujo *et al.* (2016) também apontaram a presença de diferentes genes de carbapenemase (*bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{GES} e *bla*_{OXA48-like} genes) em duas importantes matrizes aquáticas urbanas do Rio de Janeiro, sugerindo o lançamento contínuo de esgoto de casas e hospitais, com a detecção de cepas de *Enterobacteriaceae* produtoras de KPC-2.

Sendo assim, efluentes hospitalares caracterizam-se como possíveis veículos de disseminação de inúmeros microrganismos patogênicos, além de apresentarem grandes concentrações de antimicrobianos e medicamentos excretados pelas vias urinárias e fecal de pacientes. Quando não tratados, esses efluentes são importantes contaminantes de mananciais de água, tanto superficiais quanto subterrâneos, e linhagens multirresistentes a antimicrobianos podem representar riscos à saúde pública se atingirem o sistema de abastecimento (BRANDÃO *et al.*, 2018).

As águas residuais hospitalares podem conter substâncias perigosas, como resíduos farmacêuticos, substâncias químicas, patógenos e radioisótopos. Essas substâncias podem representar um risco químico, biológico e físico para a saúde pública e ambiental (CARRARO *et al.*, 2018). Os problemas que surgiram na última década dizem respeito a substâncias e microrganismos que não têm regulamentação, como resíduos de antibióticos, medicamentos e patógenos específicos (CARRARO *et al.*, 2018). Em um nível global, existem diretrizes para métodos de tratamento para esses efluentes, mas a legislação, em todos os principais países

industrializados, não contém limitações sobre esses parâmetros, sendo, então, necessário um sistema de monitoramento desses efluentes, bem como de substâncias e patógenos.

6 CONCLUSÃO

A resistência aos antimicrobianos representa um custo genuíno para a sociedade. Os níveis crescentes de resistência aos antimicrobianos são projetados para causar um número crescente de mortalidade e morbidade.

O aumento da resistência antimicrobiana e seus potenciais danos reais à sociedade e à economia mundial devem encorajar o desenvolvimento de novos antibióticos e aumentar os esforços para garantir que os impactos sociais e econômicos futuros sejam minimizados.

Os resultados de nosso estudo confirmaram a disseminação ambiental de linhagens hospitalares de bactérias multirresistentes, mostrando, assim, a possibilidade de as águas residuais hospitalares serem um ponto de acesso para a transferência horizontal de genes de resistência a antimicrobianos. Isso evidencia que bactérias clinicamente importantes de alto risco não se limitam a ambientes nosocomiais, o que deve ser causa de preocupações com a saúde pública.

Nossos resultados podem destacar a importância do monitoramento ambiental, de bactérias patogênicas, as quais podem potencialmente servir como fonte de genes de resistência contra agentes antimicrobianos clínicos importantes, enfatizando a necessidade urgente de adotar medidas drásticas de controle e vigilância da descarga de esgoto e águas residuais hospitalares. Finalmente, novas estratégias devem ser desenvolvidas para inibir a disseminação extra-hospitalar de clones bacterianos de alto risco, clinicamente importantes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAM, E. P.; CHAIN, E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. **Reviews of infection diseases**, Oxford, v. 10, n. 4, p. 677-678, jul-aug, 1988.
- ABREU, E. T.; PRETTO, J. A.; DE OLIVEIRA CALEARE, Â.; TAVARES, C. R. G.; NAKAMURA, C. V. Avaliação da resistência a antibióticos de bactérias isoladas de efluente hospitalar. **Acta Scientiarum. Technology**, Maringá, v. 32, n. 1, p. 1-5, 2010.
- ADAMCZUK, M.; ZALESKI, P.; DZIEWIT, L.; WOLINOWSKA, R.; NIECKARZ, M.; WAWRZYNIAK, P.; KIERYL, P.; PLUCIENNICZAK, A.; BARTOSIK, D. Diversity and Global Distribution of IncL/M Plasmids Enabling Horizontal Dissemination of β -Lactam Resistance Genes among the Enterobacteriaceae. **BioMed Research International**, [s.l.], v. 2015, 414681 p. 1-7, jul, 2015.
- ADLER, A. Dissemination of the *bla*_{KPC} gene by clonal spread and horizontal gene transfer: comparative study of incidence and molecular mechanisms. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Londres, v. 71, n. 7, p. 2143-2146, ago., 2016.
- AL-JASSER, A. Extended-Spectrum Beta-lactamases (ESBLs): A global problem. **Kuwait Med J**, Kuwait, v. 38, p. 171-185, 2006.
- ANES, J.; MCCUSKER, M. P.; FANNING, S.; MARTINS, M. The ins and outs of RND efflux pumps in *Escherichia coli*. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 6, 587, p. 587, jun., 2015.
- ANVISA, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Plano Nacional para a prevenção e o controle de Resistência Microbiana nos Serviços de Saúde Brasília: ANVISA**. 2017.
- ARAÚJO, K. S.; ANTONELLI, R.; GAYDECZKA, B.; GRANATO, A. C.; MALPASS, G. R. P. Processos oxidativos avançados: uma revisão de fundamentos e aplicações no tratamento de águas residuais urbanas e efluentes industriais. **Revista Ambiente & Água - An Interdisciplinary Journal of Applied Science**, Taubaté, v. 11, n. 2, p. 387-401, jun, 2016.
- ARAUJO, C. F. M.; SILVA, D. M.; CARNEIRO, M. T.; RIBEIRO, S.; FONTANA-MAURELL, M.; ALVAREZ, P.; CARVALHO-ASSEF, A. P. D. A. Detection of carbapenemase genes in aquatic environments in Rio de Janeiro, Brazil. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Washington, v. 60, n. 7, p. 4380-4383, jun, 2016.
- AREND, L. *et al.* Phenotypic and molecular characterization of 942 carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE) in southern Brazil. **Journal of Infection and Chemotherapy**, [s.l.], v.21, n.4, p. 316- 318, Apr, 2015.
- AZIMI, L.; TALEBI, M.; MOHAMMAD, R. P.; OWLIA, P.; LARI, A. R. Characterization of Carbapenemase in Extensively Drug Resistance *Acinetobacter baumannii* in a Burn Care Center in Iran. **International Journal of Molecular and Cellular Medicine**, Iran, v. 4, n. 1, p. 46-53, jan, 2015.
- AZEVEDO, S. M. M. **Farmacologia dos Antimicrobianos Beta-lactâmicos**. Orientador: João Carlos Sousa. 2014. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2014.

BABIC, M.; HUJER, A. M.; BONOMO, R. A. Bonomo, What's new in antibiotic resistance? Focus on beta-lactamases. **Drug Resistance Updates**, Philadelphia, v. 9, n. 3, p. 142-156, jun, 2006.

BAJAJ, J. S. Microbiome and Complications of Liver Disease. **Clinical Liver Disease**, Hoboken, v. 5, n. 4, p. 96-100, Apr, 2015.

BARANCHESHME, F.; MUNIR, M. Strategies to combat antibiotic resistance in the wastewater treatment plants. **Frontiers in microbiology**, Lausanne, v. 8, n.17, p. 2603, Jan, 2018.

BATISTA, A. C. **Klebsiella Pneumoniae: Análise Fenotípica e Molecular dos Mecanismos de Resistência KPC e NDM em um Hospital de Foz do Iguaçu, PR.** Orientador: Jorge Luis Maria Ruiz. 2020. 63 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Programa de Pós-Graduação em Biociências, Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2020.

BEN SAID, L.; KLIBI, N.; DZIRI, R.; BORGIO, F.; BOUDABOUS, A.; BEN SLAMA, K.; TORRES, C. Prevalence, antimicrobial resistance and genetic lineages of *Enterococcus* spp. From vegetable food, soil and irrigation water in farm environments in Tunisia. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 96, n.5, p. 1627-1633, Mar, 2016.

BERGER, S.; ALAUZET, C.; AISSA, N.; HENARD, S.; RABAUD, C.; BONNET, R.; LOZNIIEWSKI, A. Characterization of a new blaOXA-48-carrying plasmid in *Enterobacteriaceae*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Washington, v. 57, n. 8, p. 4064-7, Aug, 2013.

BERGLUND, B. Environmental dissemination of antibiotic resistance genes and correlation to anthropogenic contamination with antibiotics. **Infection, Ecology and Epidemiology**, Philadelphia, v. 8, n.5, p. 564-574, Sep, 2015.

BIENDO, M.; CANARELLI, B.; THOMAS, D.; ROUSSEAU, F.; HAMDAD, F.; ADJIDE, C.; LAURANS, G. E. B. F. Successive emergence of extended-spectrum beta-lactamase-producing and carbapenemase-producing *Enterobacter arogenes* isolate in a university hospital. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 46, n. 3, p. 1037-1044, Mar, 2008.

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**, London, v. 13, n. 1, p. 42-51, Jan, 2014.

BLAIR, J. M. A.; WEBBER, M. A.; BAYLAY, A. J.; OGBOLU, D. O.; PIDDOCK, L. J. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature Reviews**, London, v. 13, n.1, p. 43-51, jan., 2015.

BONNET, R. Growing group of extended-spectrum β -lactamases: the CTX-M enzymes. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Washington, v. 48, n. 1, p. 1-14, Jan, 2004.

BRADFORD, P. A. Extend-spectrum Beta-lactamases in the 21 st Century: Charactreization, epidemiology, and detection of this importante resistance threat. **Microbiology Reviews**, Washington, v. 14, n. 1, p. 933-951, Oct, 2001.

BRANDÃO, M. B. S.; CAPUCHO, D.; AGUIAR, E. C. C.; ASSIS, R. N.; GRANJA, F. Isolation of extended-spectrum beta-lactamases producing strains on effluent of state hospital from

Boa Vista-RR. **Revista do Centro de Ciências Naturais e Exatas - UFSM**, Santa Maria, v. 21, n. 3, p. 248-258, Sept, 2017.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº. 306/2004**. Dispõe sobre o regulamento técnico para o gerenciamento de resíduos de serviço de saúde. Diário Oficial da União 10/12/2004.

BRYANT, K. A.; VAN SCHOONEVELD, T. C.; THAPA, I.; BASTOLA, D.; WILLIAMS, L. O.; SAFRANEK, T. J.; HINRICHS, S. H.; RUPP, M. E.; FEY, P. D. KPC-4 Is Encoded within a Truncated Tn 4401 in an IncL / M Plasmid, pNE1280, Isolated from *Enterobacter cloacae* and *Serratia marcescens*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 57, n. 1, p. 37-41, Jan, 2013.

BUSH, K. Bench-to-bedside review: The role of β -lactamases in antibiotic-resistant Gram-negative infections. **Critical Care**, London, v. 14, n.3, p. 1-8, Jun, 2014.

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

CABRAL, A. B.; MACIEL, M. A. V.; BARROS, J. F.; ANTUNES, M. M.; LOPES, A. C. S. Detection of *bla* KPC-2 in *Proteus mirabilis* in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 48, n. 1, p. 94-95, Jan-Feb, 2015.

CABRAL, A. B.; MACIEL, M. A. V.; BARROS, J. F.; ANTUNES, M. M.; BARBOSA DE CASTRO, C. M.; LOPES, A. C. Clonal spread and accumulation of Beta-lactams resistance determinants in *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae* complex isolates from infection and colonization in patients at a public hospital in Recife, Pernambuco, Brazil. **Journal of Medical Microbiology**, London, v. 4, n. 1, p. 1-8, Jan, 2016.

CABRAL, A. B.; LOPES, A. C. S. ***Klebsiella pneumoniae***: mecanismos de resistência aos B-lactâmicos. São Paulo: Novas Edições Acadêmicas, 2014.

CARRARO, E.; BONETTA, S.; BERTINO, C.; LORENZI, E.; BONETTA, S.; GILLI, G. Hospital effluents management: chemical, physical, microbiological risks and legislation in different countries. **Journal of environmental management**, London, v. 168, n.1, p. 185-199, Mar, 2016.

CDC. **Antibiotic resistance threats in the United States**. Centers for Disease Control and Prevention. 2011.

CDC. **Multiplex Real-Time PCR Detection of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC) and New Delhi metallo- β -lactamase (NDM-1)**. Disponível em: <https://www.cdc.gov/hai/pdfs/labsettings/KPC-NDM-protocol-2011.pdf> Acesso em: 01 set. 2021.

CAMPOS, J. C.; DA SILVA, M. J.; DOS SANTOS, P. R.; BARROS, E. M.; PEREIRA, M. D. E.; SECO, B. M.; MAGAGNIN, C. M.; LEIROZ, L. K.; DE OLIVEIRA, T. G.; DE FARIA-JÚNIOR, C.; CERDEIRA, L. T.; BARTH, A. L.; SAMPAIO, S. C.; ZAVASCKI, A. P.; POIREL, L.; SAMPAIO, J. L. Characterization of Tn3000, a transposon Responsible for blaNDM-1 Dissemination among *Enterobacteriaceae* in Brazil, Nepal, Morocco, and India. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 59, n. 12, p. 7387-7395, Dec, 2015.

CARATTOLI, A. Resistance plasmid families in *Enterobacteriaceae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 53, n. 6, p. 2227-2238, Jun, 2009.

- CARRARO, N.; SAUVÉ, M.; MATTEAU, D.; LAUZON, G.; RODRIGUE, S.; BURRUS, V. Development of pVCR94X from *Vibrio cholerae*, a prototype for studying multidrug resistant IncA/C conjugative plasmids. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 5, n. 44, p. 1-13, Feb, 2014.
- CARRER, A.; POIREL, L.; ERAKSOY, H.; CAGATAY, A. A.; BADUR, S.; NORDMANN, P. Spread of OXA-48-positive carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in Istanbul, Turkey. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Washington, v. 52, n. 8, p. 2950-2954, Aug, 2008.
- CARVALHO-ASSEF, A. P.; PEREIRA, P. S.; ALBANO, R. M.; BERIÃO, G. C.; TAVARES, C. P.; CHAGAS, T. P.; MARQUES, E. A.; TIMM, L. N.; DA SILVA, R. C.; FALCI, D. R.; ASENSI, M. D. Detection of NDM-1-, CTX-M-15-, and qnrB4-producing *Enterobacter hormaechei* isolates in Brazil. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Washington, v. 58, n. 4, p. 2475-2476, Jan, 2014.
- CARVALHO-ASSEF, A. P. PEREIRA, P. S.; ALBANO, R. M.; BERIÃO, G. C.; TAVARES, C. P.; CHAGAS, T. P.; TIMM, L. N.; DA SILVA, R. C.; FALCI, D. R.; ASENSI, M. D. Isolation of NDM-producing *Providencia rettgeri* in Brazil. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, London, v. 68, n. 12, p. 2956-2957, Dec, 2013.
- CASTANHEIRA, M.; COSTELLO, S. E.; WOOSLEY, L. N.; DESHPANDE, L. M.; DAVIES, T. A.; JONES, R. N. Evaluation of Clonality and Carbapenem Resistance Mechanisms among *Acinetobacter baumannii* - *Acinetobacter calcoaceticus* Complex and *Enterobacteriaceae* Isolates Collected in European and Mediterranean Countries and Detection of Two Novel - Lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 58, n. 12, p. 7358-7366, Dec, 2014.
- CASTANHEIRA, M.; DESHPANDE, L. M.; MATHAI, D.; BELL, J. M.; JONES, R. N.; MENDES, R. E. Early dissemination of NDM-1- and OXA-181-producing *Enterobacteriaceae* in Indian hospitals: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2006-2007. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Washington, v. 55, n. 3, p. 1274-1278, Mar, 2011.
- CHAGAS, T. P. G., SEKI, L. M., DA SILVA, D. M., ASENSI, M. D. Occurrence of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in hospital wastewater. **Journal of Hospital Infection**, London, v. 77, n. 3, p. 281, Mar, 2011.
- CHERUVANKY, A.; STOESEER, N.; SHEPPARD, A. E.; CROOK, D. W.; HOFFMAN, P. S.; WEDDLE, E.; CARROLL, J.; SIFRI, C. D.; CHAI, W.; BARRY, K.; RAMAKRISHNAN, G.; MATHERS, A. J. Enhanced *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase expression from a novel Tn4401 deletion. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 61, n. 6, p. 25-17, May, 2017.
- CHEN, L.; CHAVDA, K. D.; MEDIAVILLA, J. R.; JACOBS, M. R.; LEVI, M. H.; BONOMO, R. A.; KREISWIRTH, B. N. Partial excision of *bla*_{KPC} from Tn4401 in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 56, n. 3, p. 1635-1638, Mar, 2012.
- CONTE, D., PALMEIRO, J. K., DA SILVA NOGUEIRA, K., DE LIMA, T. M. R., CARDOSO, M. A., PONTAROLO, R., DALLA-COSTA, L. M. Characterization of CTX-M enzymes, quinolone resistance determinants, and antimicrobial residues from hospital sewage, wastewater treatment plant, and river water. **Ecotoxicology and environmental safety**, Amsterdam, v. 136, n. 4, p. 62-69, Nov, 2017.

COSTANZO, S. D.; MURBY, J.; BATES, J. Ecosystem response to antibiotics entering the aquatic environmental. **Marine Pollution Bulletin**, London, v. 51, n. 1-4, p. 218-223, Nov, 2005.

CRAM. **Antibacs I, Anaerobes, Oppor.infections**. 2019. Disponível em: <https://www.cram.com/flashcards/antibacs-i-anaerobes-opporinfections-3059782>. Acesso em: 02 jul. 2019.

DAOUD, Z.; FARAH, J.; SOKHN, E. S.; EL KFOURY, K.; DAHDOUH, E.; MASRI, K.; MATAR, G. M. Multidrug-resistant enterobacteriaceae in Lebanese hospital wastewater: implication in the one health concept. **Microbial Drug Resistance**, Larchmont, v. 24, n. 2, p. 166-174, Mar, 2018.

DEL PELOSO, P. F.; BARROS, M. F. L.; SANTOS, F. A. Sepse por *Serratia marcescens* KPC. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 46, n. 5, p. 365-367, Out, 2010.

DIENSTMANN, R.; PICOLLI, S. U.; MEYER, G.; SCHENKEL, T.; STEYER, J. Avaliação fenotípica da enzima *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) em *Enterobacteriaceae* de ambiente hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicinal Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 46, n. 1, p. 23-27, Fev, 2010.

DRIEUX, L. *et al.* Quantitative evaluation of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* strains in the wastewater of a French teaching hospital and relation to patient strain. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, London, v. 5, n. 1, p. 1-5, Mar, 2016.

DORTET, L.; POIREL, L.; NORDMANN, P. Worldwide dissemination of the NDM-type carbapenemase in Gram-negative bacteria. **BioMed Research International**, New York, v. 2014, e249856, p. 1-12, Mar, 2014.

DRAWZ, S. M.; BONOMO, R. A. Three decades of beta-lactamase inhibitors. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 23, n. 1, p. 160-201, Jan, 2010.

DWORKIN, M. F. S.; FALKOW, S.; ROSENBERG, E.; SCHLEIFER, K. H.; STACKEBRANDT, E. **The prokaryotes: Ecophysiology and biochemistry**. 3. ed. New York: Springer, 2006.

DZIDIC, S. S. J.; KOS, B. Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria: Biochemical and Genetic Aspects. **Food Technology and Biotechnology**, Lausanne, v. 46, n. 1, p. 11-21, Nov, 2008.

EBOMAH, K. E.; OKOH, A. I. An African perspective on the prevalence, fate and effects of carbapenem resistance genes in hospital effluents and wastewater treatment plant (WWTP) final effluents: A critical review. **Heliyon**, London, v. 6, n. 5, p. e03899, May, 2020.

EL-BADAWY, M. F.; TAWAKOL, W. M.; EL-FAR, S. W.; MAGHRABI, I. A.; AL-GHAMDI, A. S.; MANSY, M. S.; ASHOUR, M. S.; SHOHAYEB, M. M. Molecular identification of aminoglycoside-modifying enzymes and plasmid-mediated quinolone resistance genes among *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates recovered from egyptian patients. **International Journal of Microbiology**, Nasr City, v. 2017, e8050432, p. 1-12, May, 2017.

EVANS, B. A.; AMYES, S. G. OXA β -lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 27, n. 2, p. 241-263, Apr, 2014.

FINLEY, R. L.; COLLIGNON, P.; LARSSON, D. G.; MCEWEN, S. A.; LI, X. Z.; GAZE, W. H.; REID-SMITH, R.; TIMINOUNI, M.; GRAHAM, D. W.; TOPP, E. The Scourge of Antibiotic Resistance: The Important Role of the Environment. **Environment and Resistant Infections**, Chicago, v. 57, n.5, p. 704-710, Sep, 2013.

FLETCHER, S. Understanding the contribution of environmental factors in the spread of antimicrobial resistance. **Environmental Health and Preventive Medicine**, London, v. 20, n. 4, p. 243-252, Jul, 2015.

FLORES, C. *et al.* Detection of antimicrobial resistance genes in beta-lactamases and carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* by patient surveillance cultures at an intensive care unit in Rio de Janeiro, Brazil. **Jornal brasileiro de patologia e medicina laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 52, n. 5, p. 284-292, Oct., 2016.

FRANK, J. A.; REICH, C. I.; SHARMA, S.; WEISBAUM, J. S.; WILSON, B. A.; OLSEN, G. J. Critical evaluation of two primers commonly used for amplification of bacterial 16S rRNA genes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 74, n.8, p. 2461-2470, Apr, 2008.

GALLERT, C.; FUND, K. L.; WINTER, J. Antibiotic resistance of bacteria in raw and biologically treated sewage and in groundwater below leaking sewers. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Washington, v. 69, n. 1, p. 106-112, Nov, 2005.

GARNEAU-TSODIKOVAA, S.; LABBY, K. J. Mechanisms of resistance to aminoglycoside antibiotics: Overview and perspectives. **MedChemComm**, Cambridge, v. 7, n. 1, p. 11-27, Jan, 2016.

GROVER, S. S.; SHARMA, M.; CHATTOPADHYA, D.; KAPOOR, H.; PASHA, S. T.; SINGH, G. Phenotypic and genotypic detection of ESBL mediated cephalosporin resistance in *Klebsiella pneumoniae*: emergence of high resistance against cefepime, the fourth-generation cephalosporin. **Journal of Infection**, London, v. 53, n.4, p. 279-288, Oct, 2006.

GUILLAUME, G.; VERBRUGGE, D.; CHASSEUR-LIBOTTE, M.; MOENS, W.; COLLARD, J. PCR typing of tetracycline resistance determinants (Tet A–E) in *Salmonella enterica* serotype Hadar and in the microbial community of activated sludges from hospital and urban wastewater treatment facilities in Belgium. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 32, n.1, p. 77-85, Apr, 2000.

HAEGGMAN, S. *et al.* Diversity and evolution of the class A chromosomal β -lactamase gene in *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 48, n. 7, p. 2400-2408, Jul, 2004.

HANES, M. S.; JUDE, K. M.; BERGER, J. M.; BONOMO, R. A.; HANDEL, T. M. Structural and biochemical characterization of the interaction between KPC-2 beta-lactamase and beta-lactamase inhibitor protein. **Biochemistry**, Washington, v. 48, n. 39, p.9185-9193, Oct, 2009.

HERITAGE, J.; LÖFDAHL, S.; PAAUW, A.; VERHOEF, J.; BRISSE, S. Transposition of the gene encoding a TEM-12n extended-spectrum β -lactamase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 36, n. 9, p. 1981-1986, Sep, 1992.

HARMER, C. J.; HALL, R. M. The A to Z of A/C plasmids. **Plasmid**, New York, v. 80, p. 63-82, Jul, 2015.

- HERSHBERG, R. Antibiotic-Independent adaptive effects of antibiotic resistance mutations. **Trends in Genetics**, Amsterdam, v. 33, n. 8, p. 521-528, Aug, 2017.
- HEUER, H. *et al.* Gentamicin resistance genes in environmental bacteria: prevalence and transfer. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 42, n.2, p. 289-302, Nov, 2002.
- JACOBY, G. A. AmpC β -lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 22, n. 1, p. 161-182, Jan, 2009.
- JACOBY, G. A.; MILLS, D. M.; CHOW, N. Role of beta-lactamases and porins in resistance to ertapenem and other beta-lactams in *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 48, n. 8, p. 3203-3206, Aug, 2004.
- JACOBY, G. A.; WALSH, K. E.; MILLS, D. D.; WALKER, V. J.; OH, H.; ROBICSEK, A.; HOOPER, D. C. qnrB, Another Plasmid-Mediated Gene for Quinolone Resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 50, n. 4, p. 1178-1182, Apr, 2006.
- JÁCOME, P. R. L. A.; ALVES, L. R.; CABRAL, A. B.; LOPES, A. C. S. First report of KPC-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 56, n. 9, p. 4990, Sep, 2012.
- JOHNSON, A. P.; WOODFORD, N. Global spread of antibiotic resistance: the example of New Delhi metallo- β -lactamase (NDM)-mediated carbapenem resistance. **Journal of Medical Microbiology**, London, v. 62, n. 4, p. 499-513, Apr, 2013.
- KHAN, F. A.; HELLMARK, B.; EHRLICH, R.; SÖDERQUIST, B.; & JASS, J. Related carbapenemase-producing *Klebsiella* isolates detected in both a hospital and associated aquatic environment in Sweden. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, Wiesbaden, v. 37, n. 12, p. 2241-2251, Dec, 2018.
- KITCHEL, B.; RASHEED, J. K.; ENDIMIANI, A.; HUJER, A. M.; ANDERSON, K. F.; BONOMO, R. A.; PATEL, J. B. Genetic factors associated with elevated carbapenem resistance in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 54, n. 10, 4201-4207, Oct, 2010.
- KITCHEL, B.; RASHEED, J. K.; PATEL, J. B.; SRINIVASAN, A.; NAVON, S.; CARMELI, Y.; BROLUND, A.; GISKE, C. G. Molecular epidemiology of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in the United States: clonal expansion of multilocus sequence type 258. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 53, n. 8, p. 3365-3370, Aug, 2009.
- KOBAYASHI, N.; NISHINO, K.; YAMAGUCHI, A. Novel macrolide-specific ABC-type efflux transporter in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 183, n. 19, p. 5639-5644, Oct, 2001.
- KONEMAN, E. W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W. M. **Diagnóstico Microbiológico**. São Paulo: MEDSI, 2008.
- KORZENIEWSKA, E.; KORZENIEWSKA, A.; HARNISZ, M. Antibiotic resistant *Escherichia coli* in hospital and municipal sewage and their emission to the environment. **Ecotoxicology and environmental safety**, Amsterdam, v. 91, p. 96-102, May, 2013.

- KOTAPATI, S.; KUTI, J. L.; NIGHTINGALE, C. H. Clinical implications of extended spectrum b-lactamase (ESBL) producing *Klebsiella* species and *Escherichia coli* on cefepime effectiveness. **Journal of Infection**, London, v. 51, n.3, p. 211-217, Oct, 2005.
- KUMMERER, K. L. Drugs in the environment: emission of drugs. Diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources – a review. **Chemosphere**, Oxford, v. 45, n. 6-7, p. 957-969, Nov, 2001.
- LANDERS, T. F.; COHEN, B.; WITTUM, T. E.; LARSON, E. L. A review of antibiotic use in food animals: perspective, policy, and potential. **Public Health Reports**, Washington, v. 127, n. 1, p. 4-22, Jan-Feb, 2012.
- LANDMAN, D.; SALVANI, J. K.; BRATU, S.; QUALE, J. Evaluation of techniques for detection of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in stool surveillance cultures. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 43, n. 11, p. 5639-5641, Nov., 2005.
- LEVY, S. B. Active efflux, a common mechanism for biocide and antibiotic resistance **Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement**, Oxford, v. 92, n. 1, p. 65S-71S, May, 2002.
- LIMA, A. M. S.; MELO, M. E. S.; ALVES, L. C.; BRAYNER, F. A.; LOPES, A. C. S. Investigation of class 1 integrons in *Klebsiella pneumoniae* clinical and microbiota isolates belonging to different phylogenetic groups in Recife, State of Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio De Janeiro, v. 47, n. 2, p. 165-169, Mar-Apr, 2014.
- LINDSEY, R. L.; FRYE, J. G.; FEDORKA-CRAY, P. J.; MEINERSMANN, R. J. Microarray-based analysis of *incA/C* plasmid-associated genes from multidrug-resistant *Salmonella enterica*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 77, n. 19, p. 6991-6999, Oct, 2011.
- LIVERMORE D. M. beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 8, n. 4, p. 557-84, out., 1995.
- LOPES, A. C. S.; RODRIGUES, J. F.; MORAIS JÚNIOR, M. A. Molecular typing of *Klebsiella pneumoniae* isolates from public hospitals in Recife, Brazil. **Microbiological Research**, Jena, v. 160, n.1, p. 37-46, Feb, 2005.
- MACGOWAN, A.; MACNAUGHTON, E. Antibiotic resistance. **Medicine**, London, v. 45, n.10, p. 622-628, Sep, 2017.
- MARGATE, E.; MAGALHÃES, V.; FEHLBERG, L. C. C.; GALES, A. C.; LOPES, A. C. S. KPC-producing *Serratia marcescens* in a home-care patient from Recife, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 57, n. 4, p. 359-360, Jul-Aug, 2015.
- MARSHALL, B. M.; LEVY, S. B. Food Animals and Antimicrobials: Impacts on Human Health. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 24, n. 4, p. 718-733, Oct, 2011.
- MARTINEZ, T.; MARTINEZ, I.; VAZQUEZ, G. J.; AQUINO, E. E.; ROBLEDO, I. E. Genetic environment of the KPC gene in *Acinetobacter baumannii* ST2 clone from Puerto Rico and genomic insights into its drug resistance. **Journal of Medical Microbiology**, London, v. 65, n. 8, p. 784-792, Aug, 2016.

MASTERS, R. K.; REITHER, E. N.; POWERS, D. A.; YANG, Y. C.; BURGER, A. E.; LINK, B. G. The impact of obesity on US mortality levels: the importance of age and cohort factors in population estimates. **American Journal of Epidemiology**, Washington, v. 103, n. 10, p. 1895-1901, Oct, 2013.

MATHERS, A. J.; PEIRANO, G.; PITOUT, J. D. The role of epidemic resistance plasmids and international high-risk clones in the spread of multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 28, n. 3, p. 565-591, Jul, 2015.

MCCLELLAND, M.; FLOREA, L.; SANDERSON, K.; CLIFTON, S. W.; PARKHILL, J.; CHURCHER, C.; DOUGAN, G.; WILSON, R. K.; MILLER, W. Comparison of the *Escherichia coli* K-12 genome with sampled genomes of a *Klebsiella pneumoniae* and three *Salmonella enterica* serovars, *Typhimurium*, *Typhi* and *Paratyphi*. **Nucleic Acids Research**, London, v. 28, n. 24, p. 4974-4986, Dec, 2000.

MEIRELLES-PEREIRA, F.; PEREIRA, A. M. S.; SILVA, M. C. G.; GONÇALVES, V. D.; BRUM, P. R.; CASTRO, E. A. R.; PEREIRA, A. A.; ESTEVES, F. A.; PEREIRA, J. A. A. Ecological aspects of the antimicrobial resistance in bacteria of importance to human infections. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 33, n. 4, p. 287-293, Dec, 2002.

MESA, R. J.; BLANC, V.; BLANCH, A. R.; CORTÉS, P.; GONZÁLEZ, J. J.; LAVILLA, S.; MIRÓ, E.; MUNIESA, M.; SACO, M.; TÓRTOLA, M. T.; MIRELIS, B.; COLL, P.; LLAGOSTERA, M.; PRATS, G.; NAVARRO, F. Extended spectrum- β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in different environments (humans, food, animal farms and sewage). **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 58, n. 1, p. 211-215, Jul, 2006.

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**, Washington, v. 53, n. 1, p. 333-334, Jan, 2009.

MONTEZZI, L. F.; CAMPANA, E. H.; CORREA, L. L.; JUSTO, L. H.; PASCHOAL, R. P.; DA SILVA, I. L.; SOUZA, C. M.; DROLSHAGEN, M.; PICÃO, R. C. Occurrence of carbapenemase-producing bacteria in coastal recreational Waters. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 45, p. 174-177, 2015.

MUNITA, J. M.; ARIAS, A. C. Mechanisms of antibiotic resistance. **Microbiology Spectrum**, Washington, v. 4, n. 2, p. 1-9, Apr, 2016.

NAAS, T.; CUZON, G.; VILLEGAS, M. V.; LARTIGUE, M. F.; QUINN, J. P.; NORDMANN, P. Genetic structures at the origin of acquisition of the β -lactamase *bla* KPC gene. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 52, n. 4, p. 1257-1263, Apr, 2008.

NAZIC, H.; POIREL, L.; NORDMANN, P. Further identification of plasmid-mediated quinolone resistance determinant in *Enterobacteriaceae* in Turkey. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 49, n. 5, p. 2146-2147, May, 2005.

NICOLETTI, A. G.; MARCONDES, M. F.; MARTINS, W. M.; ALMEIDA, L. G.; NICOLAS, M. F.; VASCONCELOS, A. T.; OLIVEIRA, V.; GALES, A. C. Characterization of BKC-1 class A carbapenemase from *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 59, n. 9, p. 5159-5164, Sep, 2015.

NIKAIDO, H. Multidrug Resistance in Bacteria. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 78, p. 119-146, Mar, 2010.

NORDMANN, P.; POIREL, L.; WALSH, T. R.; LIVERMORE, D. M. The emerging NDM carbapenemase. **Trends in microbiology**, Vv. 19, n. 12, p. 588-595, 2011.

NORDMANN, P.; POIREL, L. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among *Enterobacteriaceae* worldwide. **Clinical Microbiology and Infection**, London, v. 20, n. 9, p. 821-830, Sep, 2014.

NUI, H.; YU, H.; HU, T.; TIAN, G.; ZHANG, L.; GUO, X.; HU, H.; WANG, Z. The prevalence of aminoglycoside-modifying enzyme and virulence genes among enterococci with high-level aminoglycoside resistance in Inner Mongolia, China. **Brazilian Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 47, n. 3, p. 691-696, Jul-Sep, 2016.

OZGUMUS, O. B.; TOSUN, I.; AYDIN, F.; KILIC, A. O. Horizontal dissemination of tem- and shv-type beta-lactamase genes- carrying resistance plasmids amongst clinical isolates of *Enterobacteriaceae*. **Brazilian Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 39, n. 4, p. 636-643, Oct, 2008.

PAPP-WALLACE, K. M. Carbapenems: Past, Present, and Future. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 55, n. 11, p. 4943-4960, nov., 2011.

PADILLA, E.; LLOBET, E.; DOMÉNECH-SÁNCHEZ, A.; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L.; BENGOCHEA, J. A.; ALBERTÍ, S. *Klebsiella pneumoniae* AcrAB efflux pump contributes to antimicrobial resistance and virulence. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 54, n. 1, p. 177-183, Jan, 2010.

PATERSON, D. L. Resistance in gram-negative bacteria: *Enterobacteriaceae*. **American Journal of Infection Control**, Washington, v. 34, n. 5, p. 20-28, Jan, 2006.

PATERSON, D. L.; BONOMO, R. A. Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 18, n. 4, p. 657-686, Oct, 2005.

PEIRANO, G., BRADFORD, P. A., KAZMIERCZAK, K. M., CHEN, L., KREISWIRTH, B. N., PITOUT, J. D. Importance of clonal complex 258 and IncFK2-like plasmids among a global collection of *Klebsiella pneumoniae* with bla KPC. **Antimicrobial agents and Chemotherapy**, Washington, v. 61, n. 4, p. e02610-16, Mar, 2017.

PEREIRA, P. S.; BORGHI, M.; ALBANO, R. M.; LOPES, J. C.; SILVEIRA, M. C.; MARQUES, E. A.; OLIVEIRA, J. C.; ASENSI, M. D.; CARVALHO-ASSEF, A. P. Coproduction of NDM-1 and KPC-2 in *Enterobacter hormaechei* from Brazil. **Microbial Drug Resistance**, Larchmont, v. 21, n. 2, p. 234-236, Apr, 2015.

PICÃO, R. C., CARDOSO, J. P., CAMPANA, E. H., NICOLETTI, A. G., PETROLINI, F. V., ASSIS, D. M., GALES, A. C. The route of antimicrobial resistance from the hospital effluent to the environment: focus on the occurrence of KPC-producing *Aeromonas* spp. and *Enterobacteriaceae* in sewage. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, New York, v. 76, n. 1, p. 80-85, May, 2013.

PICOLOTTO, M. K. S. Isolamento da primeira cepa de *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase codificada pelo gene blaNDM: um estudo de caso. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**, Santa Cruz do Sul, v. 8, n. 1, p. 104-106, Jan, 2018.

PINTO, F. M.; SIMA, S. D. M.; BALDIN, C. P. Prevalência de carbapenemase em enterobactérias resistentes a carbapenems em quatro hospitais terciários de Porto Alegre. **Clinical and Biomedical Research**, Porto Alegre, v. 34, n. 1, p. 47-52, 2014.

POIREL, L.; CASTANHEIRA, M.; CARRER, A.; RODRIGUEZ, C. P.; JONES, R. N.; SMAYEVSKY, J.; NORDMANN, P. OXA-163, an OXA-48-related class D β -lactamase with extended activity toward expanded-spectrum cephalosporins. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 55, n. 6, p. 2546-2551, Jun, 2011.

POIREL, L.; NAAS, T.; NORDMANN, P. Diversity, epidemiology, and genetics of class D β -lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 54, n. 1, p. 24-38, Jan, 2010.

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

POTRON A.; POIREL, L.; RONDINAUD, E.; NORDMANN, P. Intercontinental spread of OXA-48 β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* over a 11-year period, 2001 to 2011. **Euro Surveillance**, Saint-Maurice, v. 18, n.31, p. 1-14, Aug, 2013.

POTRON, A.; RONDINAUD, E.; POIREL, L.; BELMONTE, O.; BOYER, S.; CAMIADE, S.; NORDMANN, P. Genetic and biochemical characterisation of OXA-232, a carbapenem-hydrolysing class D β -lactamase from *Enterobacteriaceae*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 41, n. 4, p. 325-329, Apr, 2013.

PRADO, T., PEREIRA, W. D. C., SILVA, D. M., SEKI, L. M., CARVALHO, A. D. A., & ASENSI, M. D. Detection of extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in effluents and sludge of a hospital sewage treatment plant. **Letters in applied microbiology**, Oxford, v. 46, n. 1, p. 136-141, Jan, 2008.

PRESTON, K.; HITCHCOCK, S. A.; AZIZ, A. Y.; TINE, J. A. The complete nucleotide sequence of the multi-drug resistance encoding IncL/M plasmid pACM1. **Plasmid**, New York, v. 76, p. 54-65, Nov, 2014.

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

QUINN, R. Rethinking antibiotic research and development: World War II and the penicillin collaborative. **American Journal of Public Health**, New York, v. 103, n., p. 426-434, Mar, 2013.

QUILES, M. G.; ROCCHETTI, T. T.; FEHLBERG, L. C.; KUSANO, E. J. U.; CHEBABO, A.; PEREIRA, R. M. G.; GALES, A. C.; PIGNATARI, A. C. C. Unusual association of NDM-1 with KPC-2 and armA among Brazilian *Enterobacteriaceae* isolates. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v. 48, n. 2, p. 174-177, Feb, 2015.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; FLOWER, R.J.; HENDERSON, G. **Farmacologia**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

REINTHALER, F. F.; POSCH, J.; FEIERL, G.; WÜST, G.; HAAS, D.; RUCKENBAUER, G.; MASCHER, F.; MARTH, E. Antibiotic resistance of *E.coli* in sewage and sludge. **Water Research**, Oxford, v. 37, n. 8, p. 1685-1690, Apr, 2003.

REINTHALER, F.F. *et al.* ESBL-producing *E. coli* in Austrian sewage sludge. **Water Research**, Oxford, v. 44, n.6, p.1981-1985, mar., 2010.

RIBEIRO, V. B.; ANDRADE, L. N.; LINHARES, A. R.; BARIN, J.; DARINI, A. L.; ZAVASCKI, A. P.; BARTH, A. L. Molecular characterization of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase producing isolates in southern Brazil. **Journal of Medical Microbiology**, London, v. 62, n. 11, p. 1721-1727, Nov, 2013.

ROCA, I.; AKOVA, M.; BAQUERO, F.; CARLET, J.; CAVALERI, M.; COENEN, S.; COHEN, J.; FINDLAY, D.; GYSSENS, I.; HEUER, O. E.; KAHLMETER, G.; KRUSE, H.; LAXMINARAYAN, R.; LIÉBANA, E.; LÓPEZ-CERERO, L.; MACGOWAN, A.; MARTINS, M.; RODRÍGUEZ-BAÑO, J.; ROLAIN, J. M.; SEGOVIA, C.; SIGAUQUE, B.; TACCONELLI, E.; WELLINGTON, E.; VILA, J. The global threat of antimicrobial resistance: science for intervention. **New Microbe and New Infections**, London, v. 16, n.6, p. 22-29, Apr, 2015.

RODRÍGUEZ, E. A. ARISTIZÁBAL-HOYOS, A. M., MORALES-ZAPATA, S., ARIAS, L., & JIMÉNEZ, J. N. High frequency of gram-negative bacilli harboring blaKPC-2 in the different stages of wastewater treatment plant: A successful mechanism of resistance to carbapenems outside the hospital settings. **Journal of Environmental Management**, London, v. 271, n. 1, p. 111046, Oct, 2020.

RODRIGUES, C.; BAVLOVIC, J.; MACHADO, E.; AMORIM, J.; PEIXE, L.; NOVAIS, A. KPC-3-producing *Klebsiella pneumoniae* in Portugal linked to previously circulating non-CG258 lineages and uncommon genetic platforms (Tn4401dIncFIA and Tn4401d-IncN). **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 7, n. p. 1-14, Jun, 2016.

RODRÍGUEZ, E.; BAUTISTA, A.; BARRERO, L. First report of a *Salmonella enterica* serovar typhimurium isolate with carbapenemase (KPC-2) in Colombia. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 58, n. 2, p. 2163-2164, Dec, 2014.

ROGERS, E. E.; STENGER, D. C. A Conjugative 38 kB Plasmid Is Present in Multiple Subspecies of *Xylella fastidiosa*. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 7, n. 12, p. 1-8, Dec, 2012.

ROSÁRIO, N. A.; GRUMACH, A. S. Allergy to beta-lactams in pediatrics: a practical approach. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v. 82, n. 5, p. 181-189, Nov, 2006.

ROSSI, F.; ANDREAZZI, D. B. **Interpretando o antibiograma**. São Paulo: Atheneu, 2005.

SAID, L. B.; JOUINI, A.; ALONSO, C. A.; KLIBI, N.; DZIRI, R.; BOUDABOUS, A.; TORRES, C. Characteristics of extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-and pAmpC beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae of water samples in Tunisia. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 550, n. 15, p. 1103-1109, Apr, 2016.

SAMPAIO, J. L.; RIBEIRO, V. B.; CAMPOS, J. C.; ROZALES, F. P.; MAGAGNIN, C. M.; FALCI, D. R.; DA SILVA, R. C.; DALAROSA, M. G.; LUZ, D. I.; VIEIRA, F. J.; ANTOCHEVIS, L. C.; BARTH, A. L.; ZAVASCKI, A. P. Detection of OXA-370, an OXA-48-related class D β -lactamase, in *Enterobacter hormaechei* from Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 58, n. 6, p. 3566-3567, Jun, 2014.

SAVAGE, M. Antibiotic Resistance: An Important Issue for Public Health Safety. **Annals of Microbiology and Research**, London, v. 1, n. 1, p. 26-30, Nov, 2017.

SCHWARTZ, T.; KOHNEN, W.; JANSEN, B.; OBST, U. Detection of Antibiotic-Resistant Bacteria and their Resistance Genes in Wastewater, Surface Water, and Drinking Water Biofilms. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 43, n.1, p. 325-335, Apr, 2003.

SCHWARZ, S.; JOHNSON, A. P. Transferable resistance to colistin: A new but old threat. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 71, n. 8, p. 2066-2070, Aug, 2016.

SCHWERMER, C. U.; UHL, W. Calculating expected effects of treatment effectivity and river flow rates on the contribution of WWTP effluent to the ARG load of a receiving river. **Journal of Environmental Management**, London, v. 288, n.15, p. 112445, Jun, 2021.

SEKI, L. M.; PEREIRA, P. S.; CONCEIÇÃO, M. S.; SOUZA, M. J.; MARQUES, E. A.; CARBALLIDO, J. M.; CARVALHO, M. E. S.; ASSEF, A. P. A. C.; ASENSI, M. D. Molecular epidemiology of CTX-M producing *Enterobacteriaceae* isolated from bloodstream infections in Rio de Janeiro, Brazil: emergence of CTX-M-15. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Rio de Janeiro, v. 17, n. 6, p. 640-646, Dec, 2013.

SHAIKH, S.; FATIMA, J.; SHAKIL, S.; RIZVI, S. M.; KAMAL, M. A. Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment. **Saudi Journal of Biological Sciences**, Riyadh, v. 22, n. 1, p. 90-101, Jan, 2015.

SHEN, P.; WEI, Z.; JIANG, Y.; DU, X.; JI, S.; YU, Y.; LI, L. Novel genetic environment of the carbapenem-hydrolyzing β -lactamase KPC-2 among *Enterobacteriaceae* in China. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 53, n. 10, p. 4333-4338, Oct, 2009.

SHEPPARD, A. E.; STOESSER, N.; WILSON, D. J.; SEBRA, R.; KASARSKIS, A.; ANSON, L. W.; GIESS, A.; PANKHURST, L. J.; VAUGHAN, A.; GRIM, C. J.; COX, H. L.; YEH, A. J.; SIFRI, C. D.; WALKER, A. S.; PETO, T. E.; CROOK, D. W.; MATHERS, A. J. Nested Russian Doll-Like Genetic Mobility Drives Rapid Dissemination of the Carbapenem Resistance Gene *bla*_{KPC}. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 60, n. 6, p. 3767-78, May, 2016.

SILVA, D.G.K.C. *et al.* Caracterização físico-química e microbiológica de efluente hospitalar na Região Metropolitana de Natal-RN – Brasil. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 11, n. 1, p 205-210, 2011.

SUAREZ, C.; GUDIOL, F. Antimicrobianos betalactámicos. **Enfermedades infecciosas y Microbiología Clínica**, Barcelona, v. 27, n. 2, p. 116-129, Feb, 2008.

SUN, H. Y.; CHEN, S. Y.; CHANG, S. C.; PAN, S. C.; SU, C. P.; CHEN, Y. C. Community-onset *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: influence of health care exposure on antimicrobial susceptibility. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v. 55, n. 2, p. 135-141, Jun, 2006.

SUN, J.; DENG, Z.; YAN, A. Bacterial multidrug efflux pumps: mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 453, n. 2, p. 254-267, Oct, 2014.

TENNSTEDT, T.; SZCZEPANOWSKI, R.; BRAUN, S.; PÜHLER, A.; SCHLÜTER, A. Occurrence of integron-associated resistance gene cassettes located on antibiotic resistance plasmids isolated from a wastewater treatment plant. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 45, n.1, p. 239-252, Aug, 2003.

TENOVER, F. C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. **American Journal of Medicine**, St. Louis, v. 119, n. 1, p. 62-70, Jun, 2006.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 12. ed. Porto Alegre: ArtMed, 2017.

TUON, F. F.; SCHARF, C.; ROCHA, J. L.; CIESLINSK, J.; BECKER, G. N.; AREND, L. N. KPC-producing *Enterobacter aerogenes* infection. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Rio de Janeiro, v. 19, n. 3, p. 324-327, May-Jun, 2015.

VAN HOEK, A. H. A. M.; MEVIUS, D.; GUERRA, B.; MULLANY, P.; ROBERTS, A. P.; AARTS, H. J. Acquired antibiotic resistance genes: an overview. **Frontiers in microbiology**, Lausanne, v. 28, n.2, p. 203-228, Sep, 2011.

VANEGAS, J. M.; CIENFUEGOS, A. V.; OCAMPO, A. M.; LÓPEZ, L.; DEL CORRAL, H.; RONCANCIO, G.; SIERRA, P.; ECHEVERRI-TORO, L.; OSPINA, S.; MALDONADO, N.; ROBLEDO, C.; RESTREPO, A.; JIMÉNEZ, J. N. Similar frequencies of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing KPC and VIM carbapenemase in diverse genetic clones at tertiary-care hospitals in Medellín. **Colombia Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 52, n. 11, p. 3978-3986, Nov, 2014.

VECCHIA, A. D. *et al.* Diagnóstico sobre a situação do tratamento do esgoto hospitalar no Brasil. **Rev Saúde Ambiente**, Porto Alegre, v. 10, n.2, p. 65-69, Dez, 2009.

VRANAKIS, I.; GONIOTAKIS, I.; PSAROULAKI, A.; SANDALAKIS, V.; TSELENTIS, Y.; GEVAERT, K.; TSIOTIS, G. Proteome studies of bacterial antibiotic resistance mechanisms. **Journal of proteomics**, Amsterdam, v. 97, n., p. 88-99, Jan, 2014.

WEIB, D. *et al.* A multiplex real-time PCR for the direct, fast, economic and simultaneous detection of the carbapenemase genes blaKPC, blaNDM, blaVIM and blaOXA48. **Journal of microbiological methods**, Amsterdam, v. 142, p. 20-26, Nov, 2017.

WELCH, E. M.; BARTON, E. R.; ZHUO, J.; TOMIZAWA, Y.; FRIESEN, W. J.; TRIFILLIS, P.; PAUSHKIN, S.; PATEL, M.; TROTTA, C. R.; HWANG, S.; WILDE, R. G.; KARP, G.; TAKASUGI, J.; CHEN, G.; JONES, S.; REN, H.; MOON, Y. C.; CORSON, D.; TURPOFF, A. A.; CAMPBELL, J. A.; CONN, M. M.; KHAN, A.; ALMSTEAD, N. G.; HEDRICK, J.; MOLLIN, A.; RISHER, N.; WEETALL, M.; YEH, S.; BRANSTROM, A. A.; COLACINO, J. M.; BABIAK, J.; JU, W. D.; HIRAWAT, S.; NORTH CUTT, V. J.; MILLER, L. L.; SPATRICK, P.; HE, F.; KAWANA, M.; FENG, H.; JACOBSON, A.; PELTZ, S. W.; SWEENEY, H. L. PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations. **Nature**, London, v. 447, n. 7140, p. 87-91, May, 2007.

WILKE M. S.; LOVERING, A. L.; STRYNADKA, N. C. Beta-lactam antibiotic resistance: a current structural perspective. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 8, n. 5, p. 525-33, out., 2005.

WILLIAMSON, R.; COLLATZ, E.; GUTMANN, L. Mechanisms of action of beta-lactam antibiotics and mechanisms of non-enzymatic resistance. **Presse Medicale**, Paris, v. 15, n. 46, p. 2282-2289, Dec, 1986.

YAO, Y.; HAIN, T.; IMIRZALIOGLU, C.; KAASE, M. Complete Nucleotide Sequence of a *Citrobacter freundii* Plasmid Carrying KPC-2 in a Unique Genetic Environment. **Genome Announcements**, Washington, v. 2, n. 6, p. 1-3, Nov, 2014.

YIGIT, H.; QUEENAN, A. M.; ANDERSON, G. J.; SANCHEZ, A. D.; BIDDLE, J. W.; STEWARD, C. D.; ALBERTI, S.; BUSH, K.; TENOVER, F. C. Novel carbapenem-hydrolyzing β -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*.

Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Washington, v. 45, n. 4, p. 1151-1161, Apr, 2001.

YEZLI S, L. I. H. Antibiotic resistance amongst healthcare-associated pathogens in China. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 40, n.5, p. 389-397, Nov, 2012.

ZHANG, L.; MA, X.; LUO, L.; HU, N.; DUAN, J.; TANG, Z.; LI, Y. *et al.* The prevalence and characterization of extended-spectrum β -lactamase-and carbapenemase-producing bacteria from hospital sewage, treated effluents and receiving rivers. **International journal of environmental research and public health**, Basel, v. 17, n. 4, p. 1183, Feb, 2020.

ANEXO A: TERMO DE CIÊNCIA DO RESPONSÁVEL PELO CAMPO DE ESTUDO



ANEXO IV

TERMO DE CIÊNCIA DO RESPONSÁVEL PELO CAMPO DE ESTUDO

Título do projeto: : Prevalência e persistência de bactérias potencialmente patogênicas e resistentes a antibióticos em amostras de efluentes de um hospital

Pesquisadore(s): Rita Cassia Garcia Simão
Monica Sulfdofski

Local da pesquisa: Laboratório/HUOP
Responsável pelo local de realização da pesquisa:

O(s) pesquisador(es) acima identificado(s) está(estão) autorizado(s) a realizar a pesquisa e a coleta dados, os quais serão utilizados exclusivamente para fins científicos, assegurando sua confidencialidade e o anonimato dos sujeitos participantes da pesquisa segundo as normas da Resolução 466/2012 CNS/MS e suas complementares.

Cascavel, de de 20 .

Edison Luiz Leismann
Edison Luiz Leismann
Diretor Geral
Portaria nº 5468/2018-GRE
(Nome(s) e assinatura(s) do(s) responsável pelo campo da pesquisa)