



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**

**FACULDADE DE CEILÂNDIA**

**CURSO DE FARMÁCIA**

**INGRID MORGANA DE OLIVEIRA LENG RUBER**

**PERFIL DE GENES DE ESBL EM BACILOS GRAM NEGATIVOS RESISTENTES  
A CEFTRIAXONA ISOLADOS DE ÁGUA RESIDUAL DE AMBIENTE  
HOSPITALAR**

**BRASÍLIA- DF, 2019**

INGRID MORGANA DE OLIVEIRA LENG RUBER

**PERFIL DE GENES DE ESBL EM BACIOS GRAM NEGATIVOS RESISTENTES  
A CEFTRIAXONA ISOLADOS DE ÁGUA RESIDUAL DE AMBIENTE  
HOSPITALAR**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
como requisito parcial para obtenção do grau de  
Farmacêutico, na Universidade de Brasília,  
Faculdade de Ceilândia.

**Orientador: Prof. Dr. Alex Leite Pereira**

BRASÍLIA- DF, 2019

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

LL566p      Lengruber, Ingrid Morgana de Oliveira  
                Perfil de genes de ESBL em bacilos Gram negativos  
                resistentes a ceftriaxona isolados de água residual de  
                ambiente hospitalar / Ingrid Morgana de Oliveira  
                Lengruber; orientador Alex Leite Pereira. -- Brasília, 2019.  
                43 p.

                Monografia (Graduação - Farmácia) -- Universidade de  
                Brasília, 2019.

                1. ESBL. 2. água residual. 3. bacilos Gram negativos. I.  
                Pereira, Alex Leite , orient. II. Título.

INGRID MORGANA DE OLIVEIRA LENG RUBER

**PERFIL DE GENES DE ESBL EM BACILOS GRAM NEGATIVOS RESISTENTES  
A CEFTRIAXONA ISOLADOS DE ÁGUA RESIDUAL DE AMBIENTE  
HOSPITALAR**

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Alex Leite Pereira  
(FCE/Universidade de Brasília)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Thaís Alves da Costa Lamounier  
(FCE/Universidade de Brasília)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Daniela Castilho Orsi  
(FCE/Universidade de Brasília)

BRASÍLIA- DF, 2019

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Hiláuria e Ricardo.

Ao meu avô João Hilarião "In Memoriam".

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus que é soberano sobre todas as coisas, seus propósitos vão muito além do que podemos imaginar, com Ele realmente tenho uma Nova Vida. Pai infalível, quantas vezes me deu consolo e encheu meu coração da paz que excede todo o entendimento, as preocupações deste mundo não são nada diante da glória de Deus.

Agradeço ao meu querido orientador Alex, suas aulas eram sempre entusiasmantes, seus ensinamentos vão além da sala de aula, obrigada por toda a humildade, paciência e carinho, o senhor tem esmero no que faz.

Agradeço a minha mãe Hiláuria por ser tão doce, por cuidar de mim com tanto carinho desde sempre e me dar bom ânimo nas horas difíceis, você é a melhor mãe desse mundo! Agradeço ao meu querido pai Ricardo por sempre me apoiar e me auxiliar com sábios conselhos, é um grande amigo. Agradeço ao meu querido avô João (In Memoriam) por tão grande amor, dedicação e muita paciência, é a pessoa mais amável que já conheci, agradeço a Deus pelo privilégio de tantos momentos inesquecíveis, te amarei para sempre.

Agradeço a minha prima e irmã do coração Pâmela, você sempre foi minha irmã mais velha responsável, inteligente, dedicada, sábia! Dona de tão lindo coração, que o Senhor sempre esteja contigo iluminando seus caminhos, minha melhor amiga desde que eu me entendo por gente! Obrigada por me estimular a cursar farmácia, foi realmente uma ótima escolha.

Agradeço ao meu querido namorado Gustavo, se pudesse definir nosso relacionamento em uma palavra, diria companheirismo! Obrigada por ser sempre tão gentil, disposto a ajudar, cavalheiro, melhor amigo, se eu fosse colocar toda a minha gratidão em palavras, não haveria páginas! Meu querido irmão na fé, cada vez mais vejo o caráter de Cristo sendo moldado em você. Agradeço a seus queridos pais Rosimeire e Benefran, por me tratarem como filha e serem sempre tão carinhosos!

Agradeço as minhas colegas de laboratório Stefany, Mayana, Dani, Danny, Caio, Lorena, Érica, Fabi, Tiemi, Jéssica e Fernanda, pelos ensinamentos compartilhados e momentos alegres. Agradeço a minha amiga Flávia e às funcionárias Vilene e Helena por se tornarem grandes amigas.

Não poderia deixar de agradecer aos meus irmãos na fé do grupo cristão Vinde, Thamires, Ana Salomão, Assis, Douglas, Max, Thaynara, Geo, César, Vitor e tantos outros amigos, vocês são muito especiais para mim, tantas vezes fomos suporte uns para os outros, como diz em Oséias 6:3, que conheçamos e prossigamos firmemente adorando e conhecendo Yahweh, o SENHOR. Tão certo como nasce o sol, sua vinda ocorrerá sobre todos nós como as boas chuvas que vivificam a terra nos tempos apropriados!

## RESUMO

Bacilos Gram negativos (BGN) produtores de  $\beta$ -lactamase de espectro estendido (ESBL) são patógenos nosocomiais de grande importância. ESBLs são capazes de inibir a ação de penicilinas e cefalosporinas de todas as gerações. O conhecimento sobre dispersão de genes de ESBL em ambiente hospitalar é importante para apoiar medidas sanitárias de controle, minimizando possíveis impactos em saúde pública. O objetivo desse trabalho foi analisar o perfil de genes de ESBL em BGN resistentes a ceftriaxona isolados de amostras de água residual proveniente de atividades hospitalares realizadas no Hospital de Apoio de Brasília (HAB/DF). A frequência de genes ESBL por áreas hospitalares e o perfil de espécies portando genes ESBL (*bla*<sub>CTXM-1</sub>, *bla*<sub>CTXM-8</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> e *bla*<sub>CTX-M-2</sub>) foram também avaliados. Amostras foram coletadas dos seguintes ambientes: esgoto da Central de Material e Esterilização (CME), da lavanderia, da cozinha, do necrotério e administração geral (ADM); e água residual de banho e de descontaminação das alas A (oncologia), B (centro de reabilitação e cuidados prolongados), e C (geriatria). Genes de ESBL foram detectados em 42,10% (32/76) dos isolados de BGN, sendo que 23,68% (18/76) dos isolados apresentaram resultado positivo para mais de um gene. *Klebsiella pneumoniae* foi a espécie mais detectada (28% - 9/32) portando genes ESBL, seguida de *Citrobacter freundii* (21,9% - 7/32) e de *Pseudomonas aeruginosa* (9,37% - 3/32). *bla*<sub>CTX-M-1</sub> foi detectado em 30,3% dos isolados e predominante nas alas. BGN recuperados da cozinha e da lavanderia não apresentaram genes de ESBL. Concluindo, medidas sanitárias de controle sobre águas residuais de atividades hospitalares devem ser adotadas visto que veiculam BGN portando genes ESBL.

**Palavras-chave:** ESBL, água residual, bacilos Gram negativos.



## ABSTRACT

Gram-negative bacilli (GNB) producers of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) are nosocomial pathogens of great importance. ESBLs inhibit the action of penicillins and cephalosporins of all generations. Knowledge about ESBL gene dispersion in a hospital environment is important to support sanitary control measures, minimizing possible public health impacts. The objective of this work was to analyze the profile of ESBL genes in ceftriaxone resistant GNB isolated from residual water samples from hospital activities carried out at Hospital de Apoio de Brasília (HAB / DF). The frequency of ESBL genes by hospital areas and the profile of ESBL-bearing species (*bla*<sub>CTXM-1</sub>, *bla*<sub>CTXM-8</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> and *bla*<sub>CTX-M-2</sub>) were also evaluated. Samples were collected from the following environments: sewage from the Material and Sterilization Center (MSC), the laundry, the kitchen, the morgue and general administration (ADM); and residual bath water and decontamination of wings A (oncology), B (rehab center and long care), and C (geriatrics). ESBL genes were detected in 42.10% (32/76) of the GNB isolates, and 23.68% (18/76) of the isolates showed positive results for more than one gene. *Klebsiella pneumoniae* was the most detected species (28% - 9/32) carrying ESBL genes, followed by *Citrobacter freundii* (21.9% - 7/32) and *Pseudomonas aeruginosa* (9.37% - 3/32). *bla*<sub>CTX-M-1</sub> was detected in 30.3% of the isolates and predominant in the wings. GNB recovered from the kitchen and laundry did not present ESBL genes. In conclusion, sanitary control measures on waste water from hospital activities should be adopted since they carry GNB carrying ESBL genes.

**Keywords:** ESBL, wastewater, gram negative bacilli.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** Distribuição dos microrganismos notificados como agentes etiológicos de IPCSL associada a CVC em pacientes hospitalizados em UTI adulto ..... 13
- Figura 2-** Estrutura química dos principais antibióticos  $\beta$ -lactâmicos e inibidor da  $\beta$ -lactamase..... 14
- Figura 3-** Reações catalisadas por transpeptidase durante a biossíntese da parede celular bacteriana. .... 15
- Figura 4-** Estrutura molecular do antibiótico  $\beta$ -lactâmico Penicilina e do aminoácido D-Ala-D-Ala..... 15
- Figura 5-** Mecanismo de hidrólise de antibiótico  $\beta$ -lactâmico por ESBL..... 16
- Figura 6-** Diagrama de árvore mostrando os principais membros de diferentes grupos CTX-M e os supostos precursores de *Kluyvera spp.* .... 19

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1-</b> Espécies resistentes a ceftriaxona. ....	29
<b>Gráfico 2-</b> Contagem de cepas positivas e negativas quanto a presença de genes ESBL e percentual de cepas portando genes ESBL por espécie.....	30
<b>Gráfico 3-</b> Contagem de isolados positivos e negativos para genes ESBL por local e percentual em relação ao total de isolados. ....	31
<b>Gráfico 4-</b> Distribuição percentual de <i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-8</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV</sub> e <i>bla</i> <sub>CTX-M-2</sub> segundo o setor hospitalar e percentual de cada gene no total de isolados.....	32
<b>Gráfico 5-</b> Número de genes de ESBL por cepa. ....	33

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

<b>Quadro 1-</b> Período e frequência das coletas de água residual produzidas por atividades no Hospital de Apoio de Brasília - HAB/DF.....	24
<b>Tabela 1-</b> Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a detecção de genes ESBL .....	27
<b>Quadro 2-</b> Resultado quanto a suscetibilidade das amostras de água residual do Hospital de Apoio de Brasília - HAB/DF ao caldo seletivo composto por ceftriaxona e vancomicina. ....	28

## LISTA DE ABREVIações E SÍMBOLOS

ADM	Administração
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BGN	Bacilo Gram negativo
<i>bla</i>	$\beta$ -lactamase
CHCA	$\alpha$ -ciano-4-hidrocínâmico
CIM	Concentração inibitória mínima
CME	Central de Material e Esterilização
CVC	Cateter Venoso Central
D-Ala	D-alanina
D-Ala-D-Ala	D-alanil-D-alanina
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNTP	Desoxirribonucleotídeos trifosfato
ESBL	$\beta$ -lactamase de espectro estendido
HAB/DF	Hospital de Apoio de Brasília
IBL	Inibidores da betalactamase
IMP	Imipenemase
IPCSL	Infecção primária de corrente sanguínea
ITU	Infecções do trato urinário
KESC	<i>Klebsiella, Enterobacter, Serratia, Citrobacter</i>
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae carbapenemase</i>
LACEN	Laboratório Central de Saúde Pública
LB	Luria-Bertani
MALDI TOF	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight</i>
Mg	Miligrama

MH	<i>Mueller Hinton</i>
ML	Mililitros
Pb	Pares de base
PBP	Penicillin-binding-proteins
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PTZ	Piperacilina-tazobactam
UTI	Unidade de Tratamento Intensivo
UV	Ultravioleta
µg	Micrograma
µL	Microlitro

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>2. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>23</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>23</b>
3.1. Objetivo Geral .....	23
3.2. Objetivos Específicos .....	23
<b>4. METODOLOGIA .....</b>	<b>24</b>
4.1. Coleta das amostras .....	24
4.2. Isolamento de bacilos Gram negativos e identificação presuntiva das espécies dos microrganismos.....	24
4.3. Identificação bacteriana .....	25
4.4. Extração de DNA .....	26
4.5. Detecção de determinantes genéticos <i>bla</i> por meio da técnica de a reação em cadeia da polimerase ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> - PCR).....	26
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>27</b>
<b>6. CONCLUSÃO .....</b>	<b>35</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>37</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Bacilos Gram negativos (BGN) são os principais causadores de infecções hospitalares. Em um estudo realizado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) com 29 UTIs do Distrito Federal, bacilos Gram negativos corresponderam a mais de 50% do total de microrganismos notificados em infecções primárias de corrente sanguínea (IPCSL) (ANVISA, 2016). Este dado se reflete em todo o território nacional, um estudo feito com UTIs adulto de todo o Brasil constatou que *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter spp.* e *Pseudomonas aeruginosa* foram os BGN mais prevalentes em IPCSL associada a cateter venoso central (CVC) em pacientes hospitalizados em UTI adulto (ANVISA, 2016). (Figura 01, mudar tudo)

**Figura 1-** Distribuição dos microrganismos notificados como agentes etiológicos de IPCSL associada a CVC em pacientes hospitalizados em UTI adulto. Brasil, 2016.

Ordem de frequência	Microrganismos	Número	%
1ª	<i>Staphylococcus Coagulase Negativa</i>	3.211	18,9
2ª	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3.085	18,2
3ª	<i>Staphylococcus aureus</i>	2.390	14,1
4ª	<i>Acinetobacter spp.</i>	2.129	12,6
5ª	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1.447	8,5
6ª	<i>Candida spp.</i> <sup>1</sup>	1.281	7,6
7ª	<i>Enterococcus spp.</i> <sup>2</sup>	1.021	6,0
8ª	<i>Escherichia coli</i>	705	4,2
9ª	<i>Enterobacter spp.</i> <sup>3</sup>	672	4,0
10ª	Outras Enterobactérias	535	3,2
11ª	<i>Serratia spp.</i>	473	2,8
	TOTAL	16.949	100,0


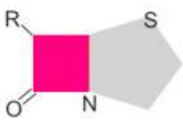
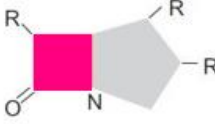

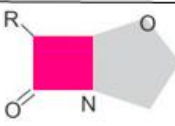
Fonte: Adaptado de (ANVISA,2016).

Os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos constituem a maior classe de agentes antimicrobianos e são amplamente utilizados na prática clínica, para o tratamento de infecções causadas por bactérias Gram negativas. Os componentes dessa classe são caracterizados por possuírem em sua estrutura central um anel  $\beta$ -lactâmico que pode estar fundido a outros tipos de anéis, como um anel tiazolidina, no caso das penicilinas, anel dihidrotiazina, no caso das cefalosporinas, ou anel pirrólico nos carbapenens. Os monobactams não possuem ramificações ligadas ao anel  $\beta$ -



lactâmico (Figura 2). Nessa vertente, os radicais ligados ao anel  $\beta$ -lactâmico tem a capacidade de modular a atividade da molécula e promover diferentes espectros de ação (AZEVEDO, 2014).

**Figura 2-** Estrutura química dos principais antibióticos  $\beta$ -lactâmicos e inibidor da  $\beta$ -lactamase.

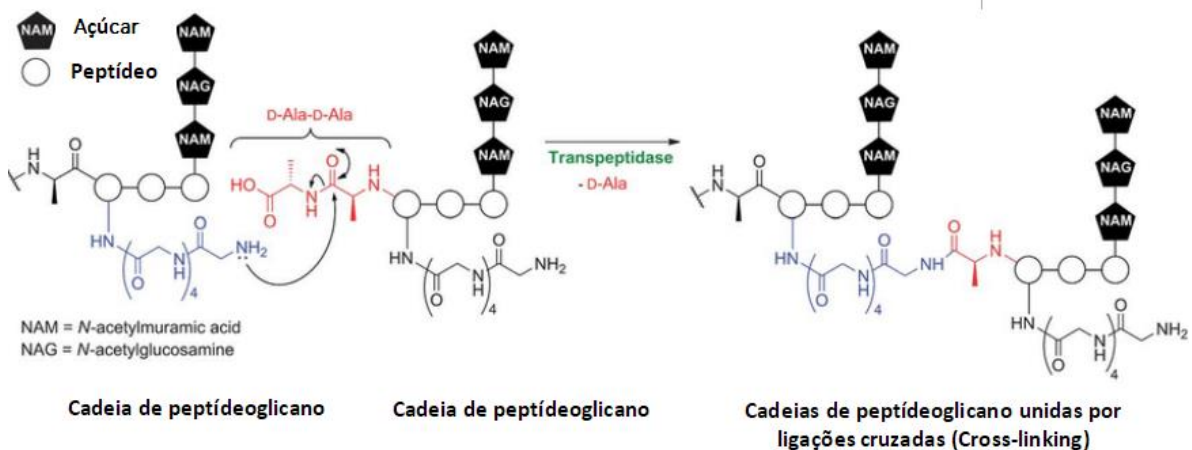
	Anel $\beta$ -lactâmico	Anel Secundário	Núcleo $\beta$ -lactâmico	Classe de antibióticos
	Anel Tiazolidínico		Ácido 6-Aminopenicilânico	PENICILINAS
	Anel di-hidrotiazida		Ácido 7-Cefalosporânico	CEFALOSPORINAS
	Anel pirrolínico		Carbapenêmico	CARBAPENEMAS
	Nenhum		Monobactâmico	MONOBACTÂMICOS
	Anel oxazolidínico		Clavulânico	ÁCIDO CLAVULÂNICO

Fonte: Adaptado de (ANSALDI JÚNIOR, 2014).

Os  $\beta$ -lactâmicos interferem no processo de biossíntese da parede celular bacteriana por meio da inativação de D-D-carboxitranspeptidases, que são classificadas como proteínas de ligação à penicilina (PBPs "*penicillin-binding-proteins*"). Essas enzimas atuam na síntese dos peptideoglicanos e a inibição da sua atividade pelos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos impede o estabelecimento das ligações cruzadas ("*cross-linking*") entre cadeias peptídicas vizinhas do peptideoglicano em formação (HUGONNET *et al.*, 2016). O peptideoglicano é responsável por conferir rigidez estrutural à parede celular bacteriana, característica importante para evitar a ruptura osmótica da membrana citoplasmática e manter a integridade da célula. Nesse contexto, a destruição do peptideoglicano induz a lise da célula bacteriana (CHO; UEHARA; BERNHARDT, 2014).

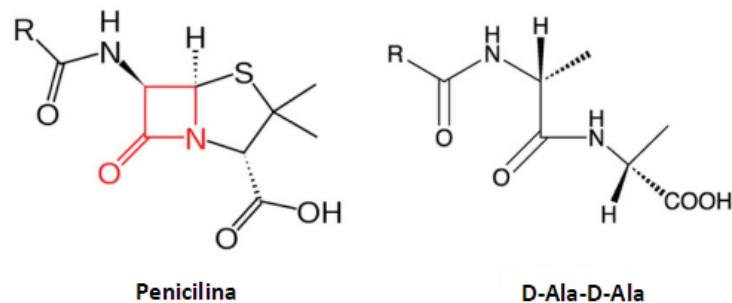
Na síntese do peptidoglicano, o grupo amina do terceiro aminoácido de uma cadeia peptídica ataca o grupo carbonil da D-alanina (D-Ala), o penúltimo aminoácido da cadeia peptídica vizinha, libertando a D-ala terminal. Esta reação é catalisada pelas transpeptidases (Figura 3) (BAPTISTA *et al*, 2013). Devido à similaridade estrutural existente entre o anel  $\beta$ -lactâmico e o dipeptídeo D-alanil-D-alanina (D-Ala-D-Ala), a transpeptidase ataca o carbonil do anel  $\beta$ -lactâmico, acarretando na clivagem do anel e na formação de um complexo acil-enzima covalente. A hidrólise desse complexo é lenta, impossibilitando a catálise de novas reações pela transpeptidase (Figura 4) (ZAPUN, CONTRERAS-MARTEL, VERNET, 2008).

**Figura 3-** Reações catalisadas por transpeptidase durante a biossíntese da parede celular bacteriana.



Fonte: Adaptado de (HAMED *et al.*, 2013).

**Figura 4-** Estrutura molecular do antibiótico  $\beta$ -lactâmico Penicilina e do aminoácido D-Ala-D-Ala.



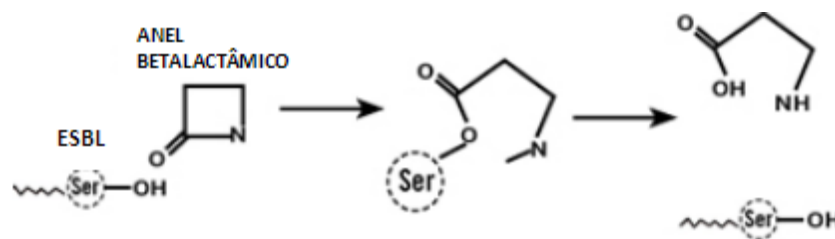
Fonte: Adaptado de (ZENG, 2013).

A resistência antimicrobiana é uma das consequências do uso indiscriminado de antimicrobianos e reflete a capacidade das bactérias de utilizarem mecanismos de proteção aos antimicrobianos. Na década de 80, cefalosporinas de 3ª geração, como ceftriaxona e cefotaxima, foram introduzidas na prática clínica como estratégia para

combater a resistência bacteriana mediada pelas  $\beta$ -lactamases comuns. No entanto, o uso intensivo de cefalosporinas de largo espectro induziu uma pressão seletiva que culminou na rápida emergência de novas  $\beta$ -lactamases, capazes de hidrolisar cefalosporinas de terceira geração (SILVA SÁNCHEZ, 2017). Em 1989, Philippon *et al.* denominou essas enzimas como  $\beta$ -lactamases de espectro estendido (ESBL). ESBLs são enzimas capazes de hidrolisar o anel  $\beta$ -lactâmico de penicilinas, aztreonam, cefalosporinas de primeira a quarta geração e outros antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, tornando-os inativos.

A enzima associa-se ao anel  $\beta$ -lactâmico, que é atacado pela hidroxila livre contida no sítio ativo da enzima, acarretando na formação de um grupo acil-éster. Por meio de uma reação de hidrólise ocorre a liberação da enzima ativa e o antibiótico hidrolisado inativo na forma de ácido penicilóico (Figura 5) (SILVA; LINCOPAN, 2012).

**Figura 5-** Mecanismo de hidrólise de antibiótico  $\beta$ -lactâmico por ESBL.



Fonte: Adaptado de (LIVERMORE, 1995).

Em 1995, Bush-Jacoby-Medeiros incluiu ESBL em seu esquema de classificação funcional de  $\beta$ -lactamases. Segundo o autor, ESBLs pertencem ao grupo do 2be, pois demonstram um espectro estendido de atividade e são inibidas pelo ácido clavulânico. Enzimas do grupo 2be são derivadas das enzimas TEM-1, TEM-2 e SHV-1 do grupo 2b que são capazes de hidrolisar penicilinas e cefalosporinas de espectro estreito, mas não têm atividade sobre aztreonam ou cefalosporinas de 3ª geração (BUSH; JACOBY; MEDEIROS, 1995).

No esquema de classificação molecular de Ambler,  $\beta$ -lactamases são agrupadas segundo a semelhança de seus aminoácidos. Neste esquema, ESBLs pertencem a classe A, caracterizada como serina  $\beta$ -lactamases, ou seja, possuem um aminoácido serina no sítio ativo da enzima (AMBLER, 1980). A classificação de Ambler

e de Bush-Jacoby-Medeiros são os dois principais esquemas de classificação de ESBL descritos na literatura.

O primeiro caso de ESBL relatado na literatura ocorreu em 1983 na Europa, em isolados de *Klebsiella pneumoniae* e *Serratia marcescens* que portavam genes de resistência às cefalosporinas de amplo espectro (KNOTHE *et al*, 1983). Os primeiros grandes surtos descritos na literatura ocorreram na Alemanha, Inglaterra e França (PATERSON; BONOMO, 2005).

A emergência de ESBL é considerada um problema de saúde pública que afeta todo o mundo. Um dos problemas causados pela disseminação de ESBL é a diminuição das opções terapêuticas amplamente utilizadas no tratamento de infecções nosocomiais e comunitárias causadas principalmente por membros das família *Enterobacteriaceae*. *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* são espécies de enterobactérias produtoras de ESBL mais prevalentes em amostras humanas, isoladas principalmente de infecções do trato urinário e de corrente sanguínea (MURO *et al.*, 2012).

A dispersão de ESBL ocorre por meio de plasmídeos, segmentos circulares do DNA que se replicam independentemente do DNA cromossomal. Plasmídeos conjugativos possibilitam a transferência de genes de resistência de uma bactéria para outra, facilitando assim, a disseminação e o acúmulo de mecanismos de resistência entre diferentes espécies de *Enterobacteriaceae* (MATHERS; PEIRANO; PITOUT, 2015).

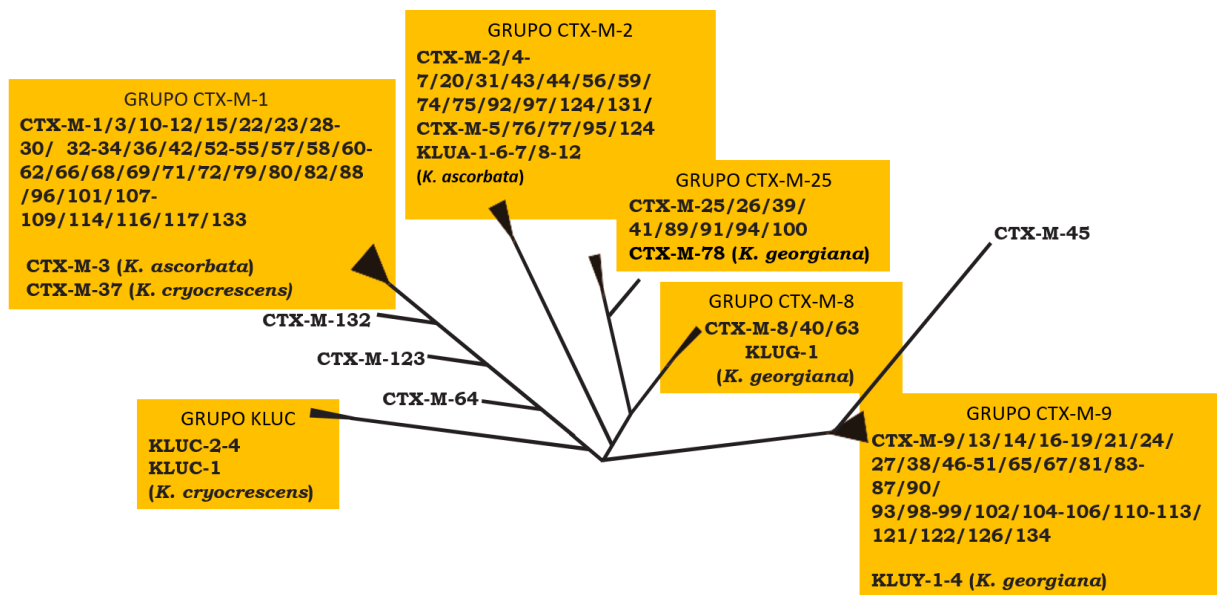
A transferência plasmidial de genes contribui para o fenômeno de co-resistência, na qual uma cepa bacteriana adquire plasmídeos contendo genes de resistência à várias classes de antibacterianos além dos  $\beta$ -lactâmicos, como aminoglicosídeos, sulfonamidas, tetraciclinas e fluoroquinolonas (TACÃO *et al.*, 2014). Kantele *et al.* (2017) analisou a co-resistência a antibacterianos não- $\beta$ -lactâmicos entre microrganismos produtores de ESBL adquiridos por 90 viajantes em excursão a regiões subtropicais. Neste estudo, dos isolados produtores de ESBL, 53%, 52%, 73% e 2% mostraram-se co-resistentes à ciprofloxacina, tobramicina, cotrimoxazol e nitrofurantoína, respectivamente.

Outro estudo realizado na Argélia, no norte da África, constatou que das 65 cepas produtoras de ESBL isoladas, havia co-resistência à gentamicina (81%) e à amicacina (47,7%) (NEDJAI *et al.*, 2012). A co-resistência conferida pelo porte de genes ESBL concomitantemente a outros genes de resistência, confere mecanismos de resistência sofisticados contra múltiplos fármacos, fato que limita consideravelmente o arsenal terapêutico disponível para tratamento de infecções.

Os genes de resistência de ESBL mais frequentemente detectados no mundo são *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>TEM</sub> e *bla*<sub>SHV</sub>. As  $\beta$ -lactamases de espectro estendido derivam das  $\beta$ -lactamases comuns como TEM-1, TEM-2 e SHV-1 que sofreram alterações na configuração de seus aminoácidos por meio de mutações em seus sítios ativos, de modo que o espectro de ação das novas  $\beta$ -lactamases foi ampliado (PATERSON; BONOMO, 2005).

O primeiro relato de ESBL do tipo *bla*<sub>CTX-M</sub> ocorreu em Munique, na Alemanha, o gene foi detectado em uma cepa de *E. coli* isolada de um caso de otite (BAUERNFEIND; SCHWEIGHART; GRIMM, 1990). Atualmente, é o gene de  $\beta$ -lactamase mais disseminado pelo mundo, com mais de 150 variantes alélicas identificadas (LAHLAOU; KHALIFA; MOUSSA, 2014). Enzimas da família CTXM podem ser classificadas em 5 sublinhagens que diferem entre si em no máximo 10% dos resíduos de aminoácidos. Essa sublinhagens são compostas por variantes do gene como demonstrado na Figura 6 (D'ANDREA, *et al.*, 2013).

**Figura 6-** Diagrama de árvore mostrando os principais membros de diferentes grupos CTX-M e os supostos precursores de *Kluyvera spp.*



Fonte: Adaptado de (D'ANDREA *et al.*, 2013).

Os prováveis precursores dos genes  $bla_{CTX-M}$  pertencem a espécies do gênero *Kluyvera spp.*, pertencente à família *Enterobacteriaceae*. O gene cromossômico  $bla_{KLUC}$  detectado em *Kluyvera cryocrescens*, é o provável ancestral do grupo  $bla_{CTX-M-1}$ . O grupo  $bla_{CTX-M-2}$  é derivado do gene cromossômico  $bla_{KLUA}$ , presente em *Kluyvera ascorbata*. *Kluyvera georgiana* foram identificados genes  $bla_{CTX-M}$  dos grupos 8, 9 e 25, originados do gene cromossômico  $bla_{KLUG}$  (LAHLAOU; KHALIFA; MOUSSA, 2014).

Das variantes de  $bla_{CTX-M}$  mais comuns na clínica,  $bla_{CTX-M-15}$  é o gene mais frequente na maioria dos países, com exceção da China, do Sudeste Asiático, da Coreia do Sul, do Japão e da Espanha, onde  $bla_{CTX-M-14}$  é mais dominante. Há relatos de  $bla_{CTX-M-15}$  até mesmo na Antártida em amostras de água coletadas próximo às bases de pesquisa (HERNÁNDEZ *et al.*, 2012). O grupo  $bla_{CTX-M-2}$  é frequentemente detectado na América do Sul, inclusive no Brasil (CASELLA *et al.*, 2018). Variantes do grupo  $bla_{CTX-M-9}$  ( $bla_{TOHO 2}$ ,  $bla_{CTX-M-27}$  e  $bla_{CTX-M-14}$ ) são mais prevalentes no Japão (BONNET, 2004; MATSUMURA *et al.*, 2015).

Os genes  $bla_{TOHO1}$  ( $bla_{CTX-M-44}$ ) e  $bla_{TOHO2}$  ( $bla_{CTX-M-45}$ ) recebem essa denominação pois foram encontrados pela primeira vez na Escola de Medicina da Universidade de Toho, em Tóquio.  $bla_{TOHO1}$  foi identificado pela primeira vez em 1993,

isolado em uma cepa de *E.coli* resistente a cefotaxima de uma criança com cistite (ISHII *et al.*, 1995). O primeiro relato de *bla*<sub>TOHO2</sub> ocorreu em 1995, no Japão, também foi isolado de uma cepa de *E. coli* resistente a cefotaxima recuperada de uma amostra de urina de paciente tratado com antibióticos β-lactâmicos (MA *et al.*, 1998). Desde então, os genes *bla*<sub>TOHO 1</sub> e *bla*<sub>TOHO2</sub> são os mais prevalentes no Japão (HAWKEY, 2017).

A disseminação de genes *bla*<sub>CTX-M</sub> em cepas de importância clínica, associadas frequentemente a infecções hospitalares impacta o cenário mundial não somente na área clínica, mas também no âmbito econômico e ambiental. Além disso, relatos de *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBL identificadas em animais têm sido cada vez mais frequentes em todo o mundo. No Brasil, um estudo realizado em São Paulo, indicou a presença de *Escherichia coli* multirresistente, *Klebsiella pneumoniae* e *Proteus mirabilis* produzindo variantes do gene *bla*<sub>CTX-M</sub> em carnes de frango (CASELLA *et al.*, 2015). O Brasil ocupa a liderança mundial na exportação de carne de frango e é o terceiro maior produtor de carne aviária do mundo, mas a disseminação de produtores de ESBL em alimentos de origem animal é preocupante não só devido ao impacto econômico, mas se torna um problema de saúde pública por causa do potencial de transmissão por alimentos contaminados (DECKER; GOMES, 2016).

Além de *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> também é um gene frequentemente detectado. O primeiro gene *bla*<sub>SHV-1</sub> foi encontrado e relatado na literatura nos anos 70 em *E. coli* (PITTON, 1972). Enzimas SHV são originadas de uma penicilinase cromossômica específica detectada em cepas *K. pneumoniae* de origem fecal isoladas de neonatos (HAEGGMAN *et al.*, 1997). Em 1983, na Alemanha, foi identificado em isolados clínicos de *K. pneumoniae* e *Serratia marcescens* um gene capaz de hidrolizar de forma eficaz cefotaxima e em menor grau cefotazidima, posteriormente este gene foi identificado como SHV-2, que difere do SHV-1 em apenas um aminoácido (KNOTHE, *et al.*, 1983). Portanto, *bla*<sub>SHV-2</sub> foi a primeira β-lactamase a ser descoberta, atualmente *bla*<sub>SHV</sub> é um dos genes de β-lactamase mais amplamente disseminados pelo mundo (HAJI, *et al.*, 2018).

A disseminação de bactérias portando ESBL se deu de tal forma que há relatos em todos os continentes. China, Vietnã, Índia, Tailândia e Filipinas foram as regiões da Ásia que apresentaram as maiores taxas de bactérias Gram negativas produtoras

de ESBL e resistentes a cefalosporina (JEAN *et al.*, 2016). Nos Estados Unidos (EUA), no período de 2011 a 2013, a taxa de infecções por *Klebsiella* produtora de ESBL aumentou 15% em isolados de 79 hospitais americanos (MCDANEL *et al.* 2017).

Na Nova Zelândia, Oceania, o aumento do índice de infecção por cepas produtoras de ESBL ao decorrer dos anos é alarmante. No período de 2006 a 2008 cerca de 2.6% de cepas *E. coli* isoladas de culturas sanguíneas foram positivas para ESBL, no período de 2009 a 2011 o índice aumentou de 3.8% para incríveis 46%. O alto consumo de antibióticos na Nova Zelândia contribuiu para esse quadro, no intervalo entre 2005 a 2012 o consumo per capita de antimicrobianos aumentou 43% (THOMAS; SMITH; TILYARD, 2014).

Carbapenêmicos são o tratamento de escolha para infecções causadas por bactérias produtoras de ESBL. No entanto, o uso excessivo de carbapenêmicos pode ser prejudicial para a terapia do paciente, devido a pressão seletiva e emergência de múltiplos mecanismos de resistência, como a perda de porinas e a hiperprodução de sistemas de efluxo e/ou ESBL. Esses fatores podem influenciar no aumento do índice de infecções por bactérias Gram negativas resistentes aos carbapenêmicos (DANTAS *et al.*, 2015).

A presença de ESBL em bacilos Gram negativos patogênicos acarreta em sérias implicações na farmacoterapia do paciente, tais como atraso na escolha da terapia adequada, aumento do tempo de internação e conseqüentemente o aumento do custo do tratamento. Em um estudo conduzido no Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC/UFPR), a detecção de ESBL resultou na troca de antimicrobiano em 75% dos casos analisados e o tempo médio de permanência hospitalar foi de 7 dias a mais em pacientes com enterobactérias produtoras de ESBL do que em pacientes com cepas não produtoras de ESBL (DA SILVA NOGUEIRA *et al.*, 2014).

Apesar de microrganismos produtores de ESBL serem mais prevalentes em infecções nosocomiais, infecções comunitárias por bactérias portando ESBL tem sido cada vez mais frequentes. *E. coli* e *K. pneumoniae* são as cepas com maior prevalência em infecções comunitárias, principalmente infecções do trato urinário (ITU) e intra-abdominais (PONCE-DE-LEON *et al.*, 2018). Em uma pesquisa realizada na Carolina do Norte, Estados Unidos, a proporção de infecção adquirida na



comunidade foi significativamente maior entre os pacientes com infecção por *E. coli* produtora de ESBL do que entre os pacientes com infecção por *Klebsiella pneumoniae* produtora de ESBL (FREEMAN; SEXTON; ANDERSON, 2009).

Aproximadamente metade dos casos de bacteremia por ESBL (48%, 21/44) dos pacientes internados no Hospital Middlemore em Auckland, Nova Zelândia, tiveram início na comunidade. Neste mesmo estudo, os casos de início na comunidade tenderam a ter fonte de infecção urinária, enquanto os casos de início hospitalar foram mais propensos a ter bacteremia por *E. cloacae* e a terem sido previamente admitidos na unidade de terapia intensiva (QUAN *et al.*, 2016). Nessa vertente, os fatores de risco mais comumente descritos na literatura para infecções adquiridas na comunidade incluem o uso prévio de fluoroquinolonas, de imunossupressores e de cefalosporinas de terceira geração em até 3 meses, ITU, doença obstrutiva do trato urinário e história cirúrgica (PARK *et al.*, 2017).

Apesar de cepas produtoras de ESBL serem frequentemente isoladas de amostras clínicas, há relatos da ocorrência dessas cepas em fontes ambientais, como a água. A água é um meio extremamente propício à proliferação de bactérias, o efluente hospitalar é um veículo de disseminação de cepas multiresistentes e não recebe o tratamento adequado na maioria dos países, inclusive no Brasil (CHAGAS, 2011). Mesmo depois de passar pelas estações de tratamento de esgoto, ainda é possível detectar genes de resistência em isolados de efluentes hospitalares. Poucos países recomendam o tratamento primário de efluentes hospitalares antes da sua descarga em estações de tratamento municipais (HOCQUET; MULLER; BERTRAND, 2016).

Um estudo realizado na Nigéria, detectou um elevado índice de microrganismos produtores de ESBL em águas residuais de hospitais, rios e fontes de aquacultura da região. Nessa pesquisa, a produção de ESBL foi confirmada em 114 (79,7%) isolados e os genes ESBL (*bla<sub>SHV</sub>*, *bla<sub>CTX-M-15</sub>* e *bla<sub>TEM</sub>*) foram detectados em 85 (74,6%) isolados produtores de ESBL (ADELOWO, 2018)

Um estudo conduzido em um hospital geriátrico francês analisou amostras representativas de águas residuais do hospital e avaliou quantitativamente a presença de cepas de *Escherichia coli* produtoras de ESBL que foram rastreadas para genes

ESBL e comparadas com cepas ESBL isoladas de pacientes presentes no local no momento da coleta de esgoto. Nesse estudo foram detectadas seis cepas de *E. coli* produtoras de ESBL, duas delas relacionados a cepas de pacientes (DRIEUX, 2016). Nesse sentido, a água residual hospitalar reflete o perfil de bactérias resistentes que circulam nesse ambiente.

## **2 JUSTIFICATIVA**

A emergência de infecções nosocomiais e comunitárias por BGN produtores de ESBL acarretou em um aumento significativo da morbidade e mortalidade em todo o mundo. Enzimas ESBL hidrolisam cefalosporinas de terceira geração que originalmente eram utilizadas como esquema terapêutico capaz de vencer a resistência bacteriana provocada pelas  $\beta$ -lactamases comuns. Diante das limitações impostas por microrganismos produtores de ESBL à farmacoterapia disponível e do prejuízo acarretado à saúde do paciente, a detecção de BGNs portando genes ESBL é importante para monitorar a propagação de genes de resistência no ambiente hospitalar e apoiar a adoção de medidas sanitárias de controle.

## **3 OBJETIVOS**

### **3.1. Objetivo Geral**

Realizar a caracterização de BGNs produtores de ESBL recuperados de amostras de água residual de atividades hospitalares no Hospital de Apoio de Brasília (HAB/DF).

### **3.2. Objetivos Específicos**

3.2.1 Isolar e identificar BGNs resistentes a ceftriaxona em amostras de água residual.

3.2.2 Realizar detecção dos determinantes genéticos de ESBL ( $bla_{CTXM-1}$ ,  $bla_{CTXM-8}$ ,  $bla_{SHV}$  e  $bla_{CTX-M-2}$ ) nos isolados resistentes a ceftriaxona.

3.2.3 Realizar a detecção dos determinantes genéticos de ESBL ( $bla_{CTXM-1}$ ,  $bla_{CTXM-8}$ ,  $bla_{SHV}$  e  $bla_{CTX-M-2}$ ) em uma coleção de isolados resistentes a ertapenem.

3.2.4 Verificar a frequência de genes ESBL por áreas hospitalares.

3.2.5 Verificar perfil de espécies portando genes de ESBL.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1. Coleta das amostras

As amostras de água residual produzidas por atividades hospitalares foram coletadas no Hospital de Apoio de Brasília - HAB/DF nos seguintes ambientes: esgoto da Central de Material e Esterilização (CME), da lavanderia, da cozinha, do necrotério e administração geral (ADM); e água residual de banho e de limpeza concorrente de piso das alas A (oncologia), B (centro de reabilitação e cuidados prolongados), e C (geriatria). As coletas foram realizadas em frequências e períodos distintos. O Quadro 1 apresenta a relação entre os locais, os períodos e a frequência em que as amostras foram coletadas.

As amostras coletadas foram acondicionadas em tubo plástico estéril tipo falcon de 50 mL e identificadas com o nome do local e data da coleta.

**Quadro 1-** Período e frequência das coletas de água residual produzidas por atividades no Hospital de Apoio de Brasília - HAB/DF.

Local	Coleta 1 - 17/08/2017			Coleta 2 - 14/09/2017		Coleta 3 - 28/05/2018	
	Limpeza concorrente do chão	Banho	Reservatório de esgoto	Banho	Reservatório de esgoto	Banho	Reservatório de esgoto
Lavanderia	-	-	x	-	x	-	x
Cozinha	-	-	x	-	x	-	x
Necrotério	-	-	-	-	-	-	x
Ala A	x	x	-	x	-	x	-
Ala B	x	x	-	x	-	x	-
Ala C	x	x	-	x	-	x	-
ADM	-	-	-	-	-	-	x
CME	-	-	x	-	x	-	x

Legenda: x indica que foi coletada amostra desse local; - indica que não foi coletada amostra desse local.

### 4.2 Isolamento de bacilos Gram negativos e identificação presuntiva das espécies dos microrganismos

Para realizar o isolamento bacteriano, foram adicionados 500 microlitros ( $\mu\text{L}$ ) da amostra previamente homogeneizada em um caldo seletivo composto por 4 mL de meio de cultivo Luria-Bertani (LB) estéril, suplementado com vancomicina (7,5  $\mu\text{g/mL}$ ), para a seleção de bactérias Gram negativas, e com ceftriaxona (7,5  $\mu\text{g/mL}$ ) para

seleção de bactérias resistentes, presuntivamente produtoras de ESBL. Incubou-se as culturas em estufa a  $36\pm 1$  °C por 24 horas. Após esse período, analisou-se a turbidez do meio para determinar a positividade das amostras quanto ao crescimento bacteriano, um tubo contendo caldo sem agente antimicrobiano foi utilizado como controle de crescimento para cada amostra analisada.

As amostras com resultado positivo foram semeadas com a técnica de semeadura por esgotamento em placas com meio cromogênico (chromID™ ESBL bioMérieux) para isolamento seletivo e identificação presuntiva de *Enterobacteriaceae* produtora de ESBL. Em seguida, as placas foram incubadas em estufa a  $36\pm 1$  °C por 24 horas. O meio cromogênico permite a identificação presuntiva da colônia segundo a coloração que esta apresenta por meio de um substrato cromogênico que revela a atividade enzimática. Nessa vertente, colônias do grupo KESC (*Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter*) apresentam coloração verde/azul a marrom esverdeado, colônias do grupo Proteeae (*Proteus*, *Providencia*, *Moraganella*) apresentam coloração marrom escuro a claro e colônias de *Escherichia coli* apresentam cor rosa a borgonha. Desta forma, de cada placa foi coletada uma colônia de cada grupo presuntivo detectado, as colônias foram inoculadas em tubos com ágar nutriente semi-sólido. Os tubos foram devidamente identificados e colocados na estufa a  $36\pm 1$  °C por 24 horas.

### 4.3 Identificação bacteriana

As cepas preservadas em ágar nutriente foram repicadas em meio Luria-Bertani (LB) e incubados em estufa a  $36\pm 1$  °C por 24 horas. Após esse tempo, as cepas foram semeadas em ágar Mueller Hinton (MH), meio não seletivo, e incubadas por 24 horas em estufa a  $36\pm 1$  °C. Posteriormente, uma porção de cada colônia a ser identificada foi depositada em uma placa-alvo, denominada spot, e, depois de seca, foi coberta com 1 µL de solução da matriz ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidrocinâmico (CHCA). Em três spots, foi inoculada a cepa *E. coli* ATCC™ (American Type Culture Collection) 8739, utilizada como controle de qualidade. Em seguida, o slide, lâmina composta por vários spots inoculados com as colônias foi analisada no equipamento VITEK MS, para a confirmação da identidade da espécie. O VITEK MS utiliza o método automatizado *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight* (MALDI TOF VITEK® MS) para gerar espectros de massa que são comparados com um banco de dados do equipamento. As correspondências dos picos dos espectros fornecem a

identificação do microorganismo. Esses procedimentos foram realizados no Laboratório Central de Saúde Pública (LACEN). Apenas bacilos Gram negativos com espécie confirmada no equipamento VITEK MS foram incluídos neste trabalho.

#### **4.4 Extração de DNA**

As cepas estocadas em meio de crescimento semissólido foram repicadas em meio Luria-Bertani (LB) e incubadas em estufa a  $36\pm 1$  °C por 24 horas. Posteriormente, 1000 µL de cada cultura foram adicionados a tubos tipo Eppendorf de 1,5 mL devidamente identificados. Os tubos foram centrifugados a 3000 g por 3 minutos. Em seguida, descartou-se o sobrenadante, deixando apenas o precipitado celular formado. Adicionou-se a cada tubo 1000 µL de água desionizada, homogeneizou-se em um agitador tipo Vortex e centrifugou-se a 3000 g por 3 minutos. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se 1000 µL de TRIS 1M pH 8, homogeneizou-se em um agitador tipo Vortex. A solução foi incubada em banho-maria a 100 °C por 15 minutos e posteriormente centrifugada a 11.000 rpm por 2 minutos. O sobrenadante (600 µL) foi colocado em um novo tubo tipo Eppendorf identificado e utilizado como fonte de DNA total para as reações de amplificação.

#### **4.5 Detecção de determinantes genéticos *bla* por meio da técnica de a reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction - PCR*)**

Cada solução a ser amplificada era composta por 7 µL de DNA, 13,56 µL de água deionizada, 3 µL de tampão de PCR (100 mM Tris-HCl, pH 8,3 a 25 °C; KCl 500 mM; 0,01% de gelatina), 0,24 µL de desoxinucleotídeos trifosfatos (dNTP) (0,2 mM), 3 µL do primer *reverse* (1 µM), 3 µL do primer *forward* (1 µM) e 0,20 µL da enzima Taq DNA polimerase (1 U), totalizando um volume final de 30 µL. Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose 1%, constituído por Tris-acetato-EDTA) 1X pH 8,2. O gel de agarose foi corado em solução de brometo de etídio (0,01%) por 15 minutos e os fragmentos amplificados visualizados em um transiluminador de luz ultravioleta (UV). Os primers utilizados para a detecção de genes *bla* ESBL estão descritos na Tabela 1, bem como o tamanho esperado para o fragmento de amplificação e temperaturas de anelamento. Todos os oligonucleotídeos iniciadores descritos foram desenhados para detectar múltiplas variantes de cada gene. Para controle positivo das reações de amplificação foi utilizada a cepa *Klebsiella pneumoniae* IOC-Fiocruz CCBH 4955 e para controle negativo foi utilizada a cepa *Escherichia coli* J53. A altura das bandas do produto amplificado foi estimada

comparando a faixa do produto com o marcador de peso molecular (Ladder 100 pb-Kasvi).

**Tabela 1-** Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a detecção de genes ESBL.

Gene	Sequência (5` - 3`)	Fragmento esperado (pb)	Temperatura de anelamento (°C)
<i>bla<sub>SHV</sub></i>	F: CGCCTGTGTATTATCTCCCT R: CGAGTAGTCCACCAGATCCT	294	57
<i>bla<sub>CTX-M-1</sub></i>	F: GACGATGTCACTGGCTGAGC R: AGCCGCCGACGCTAATACA	499	59
<i>bla<sub>CTX-M-8</sub></i>	F: CGCTTTGCCATGTGCAGCACC R: GTCCAGTACGATCGAGCC	307	62
<i>bla<sub>CTX-M-2</sub></i>	F: GCGACCTGGTTAACTACAATCC R: CGGTAGTATTGCCCTTAAGCC	351	51

Paralelamente, foram testadas quanto a positividade para genes ESBL uma coleção de 35 cepas isoladas das amostras de água residual do Hospital de Apoio de Brasília - HAB/DF, resistentes a ertapenem. Desta coleção, 19 isolados eram negativos para genes de carbapenemase (*bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>NDM</sub>*, *bla<sub>OXA 48</sub>*, *bla<sub>IMP</sub>* e *bla<sub>VIM</sub>*) e 16 isolados eram positivos para genes de carbapenemase.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na primeira coleta realizada, todas as amostras produziram culturas resistentes a ceftriaxona, com exceção da amostra de água residual de banho da ala A e da amostra de água residual de lavagem concorrente do piso da ala C. Na segunda coleta todas as amostras apresentaram resistência, exceto a amostra de água residual de banho da ala B, reservatório de esgoto da lavanderia e limpeza concorrente do chão das alas A, B e C. Na terceira coleta, somente a amostra de água residual da lavanderia não gerou cultura resistente. Desta forma, 69,23% (18/26) do total de amostras recebidas, produziram culturas resistentes a ceftriaxona e presuntivamente produtoras de ESBL.

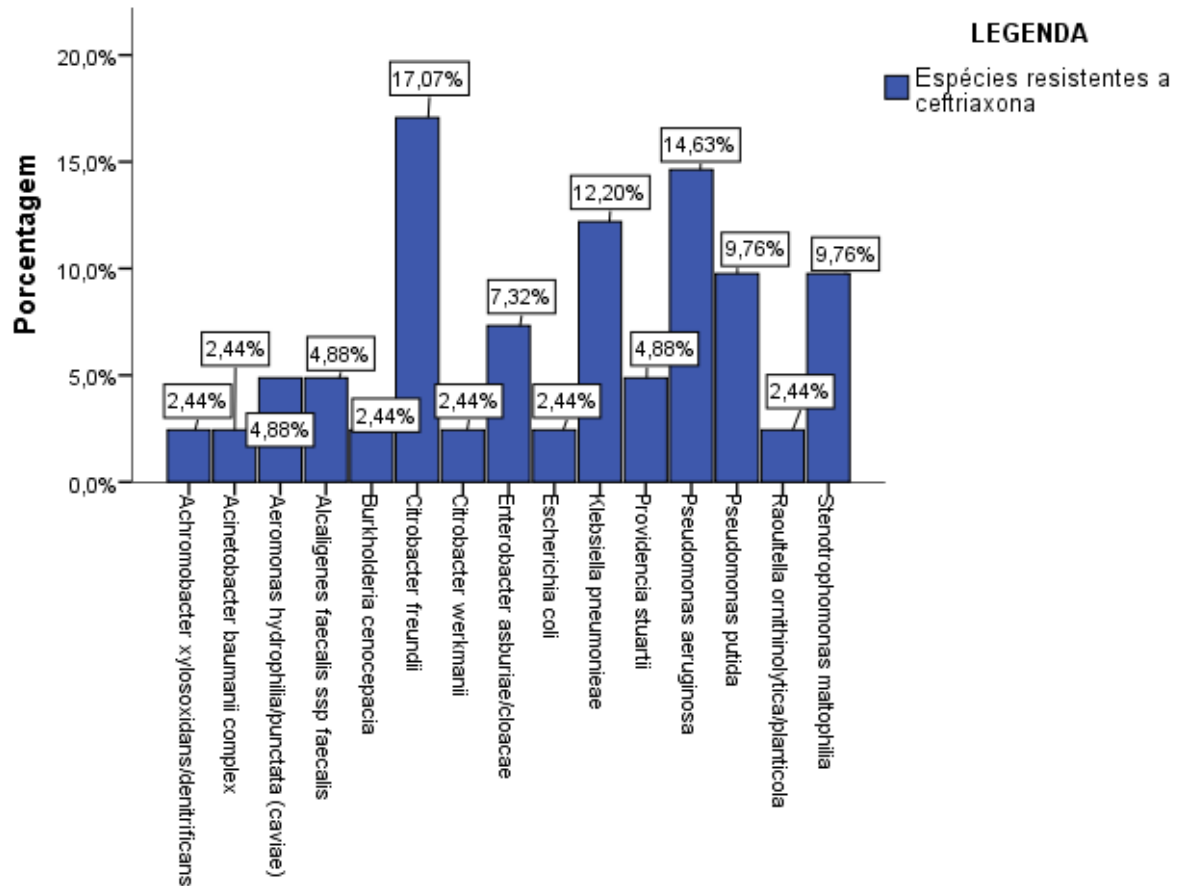
**Quadro 2-** Resultado quanto a suscetibilidade das amostras de água residual do Hospital de Apoio de Brasília - HAB/DF ao caldo seletivo composto por ceftriaxona e vancomicina.

Local	Coleta 1 - 17/08/2017			Coleta 2 - 14/09/2017		Coleta 3 - 28/05/2018	
	Limpeza concorrente do chão	Banho	Reservatório de esgoto	Banho	Reservatório de esgoto	Banho	Reservatório de esgoto
Lavanderia	-	-	R	-	S	-	S
Cozinha	-	-	R	-	R	-	R
Necrotério	-	-	-	-	-	-	R
Ala A	R	S	-	R	-	R	-
Ala B	R	R	-	S	-	R	-
Ala C	S	R	-	R	-	R	-
ADM	-	-	-	-	-	-	R
CME	-	-	R	-	R	-	R

Legenda: R: resistente e S: sensível; - indica que não foi coletada amostra desse local.

Do total de culturas resistentes a ceftriaxona, 41 bacilos Gram negativos foram isolados. As espécies mais detectadas foram *Citrobacter freundii* (17,07% - 7/41), *Pseudomonas aeruginosa* (14,63% - 6/41) e *Klebsiella pneumoniae* (12,20% - 5/41) (Gráfico 1)

**Gráfico 1-** Espécies resistentes a ceftriaxona.

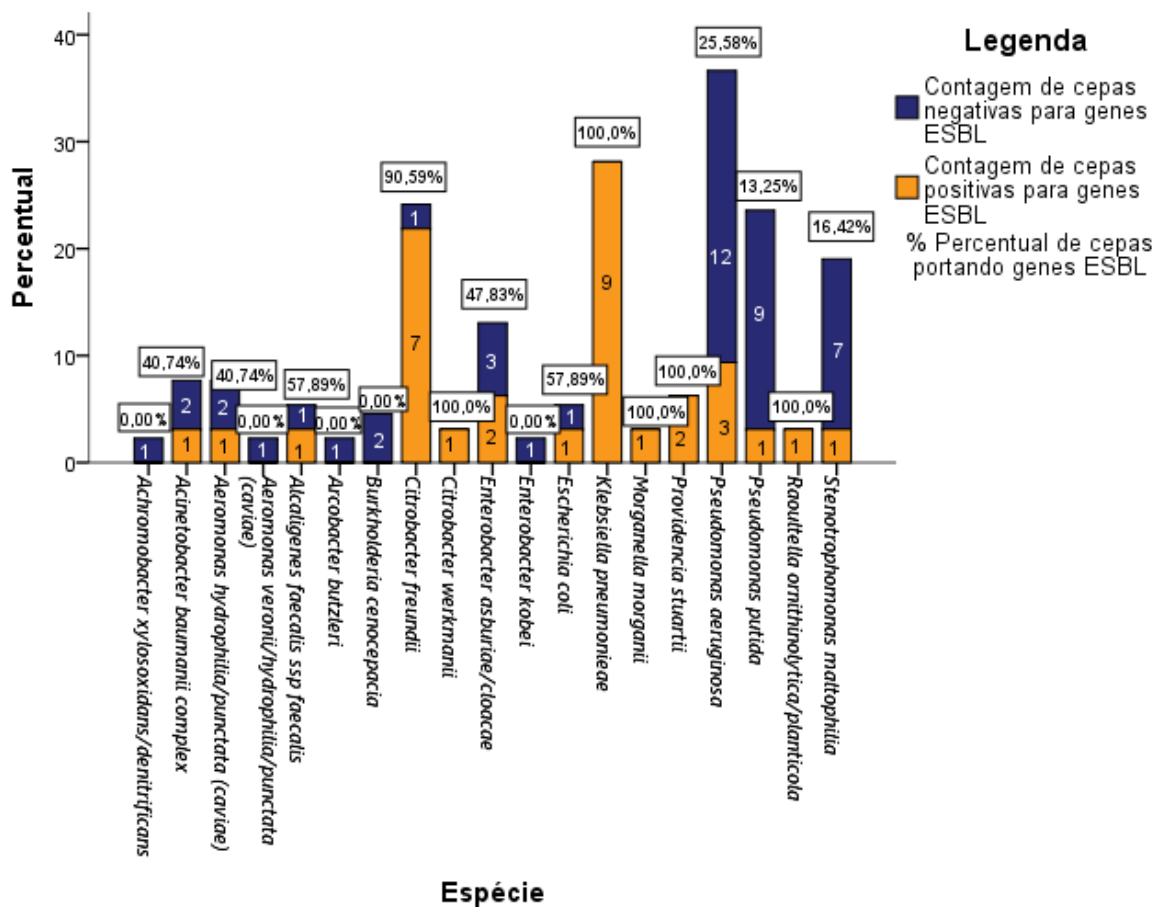


A coleção de 35 cepas isoladas do caldo seletivo com ertapenem foi adicionada às análises do perfil de espécies portando genes ESBL, totalizando 76 isolados. Genes de ESBL foram detectados em 42,10% (32/76) dos isolados de BGN, sendo que 23,68% (18/76) dos isolados apresentaram resultado positivo para mais de um gene.

Como pode ser visualizado no Gráfico 2, *Klebsiella pneumoniae* foi a espécie mais detectada portando genes ESBL (28% - 9/32), seguida de *Citrobacter freundii* (21,9% - 7/32) e de *Pseudomonas aeruginosa* (9,37% - 3/32).



**Gráfico 2-** Contagem de cepas positivas e negativas quanto a presença de genes ESBL e percentual de cepas portando genes ESBL por espécie.

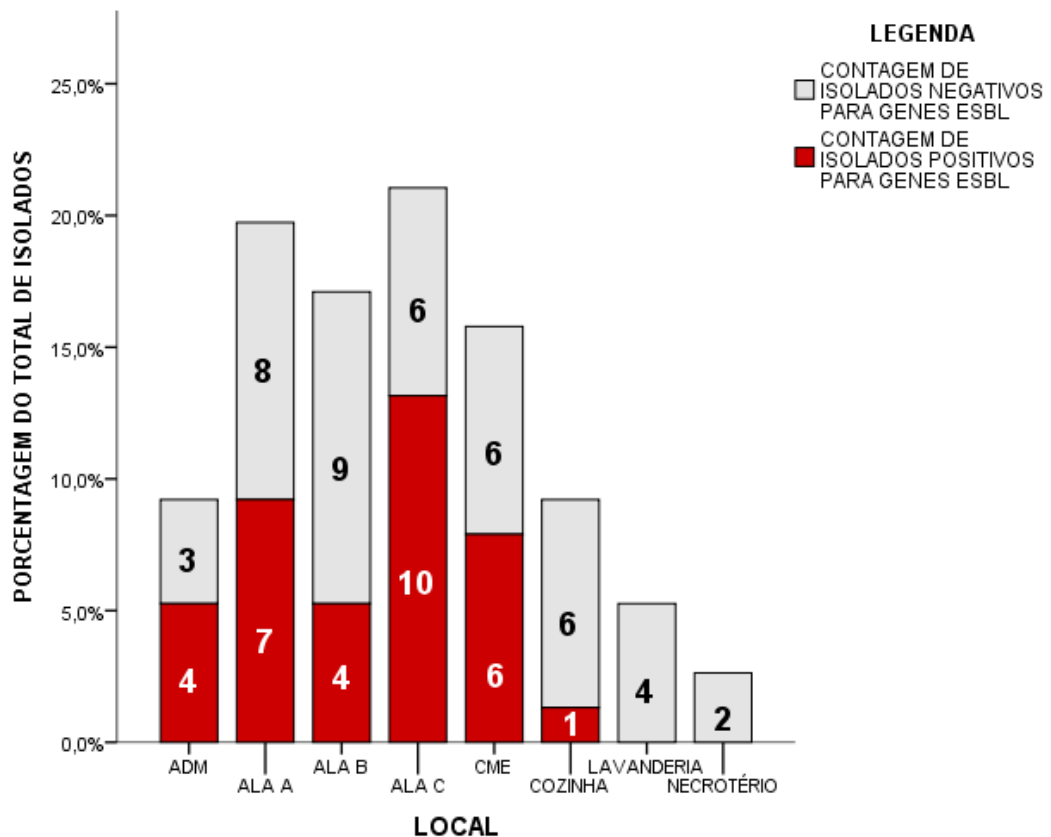


Os efluentes hospitalares podem atuar como reservatórios de microrganismos resistentes a antibióticos, devido a pressão seletiva exercida pelo uso de antimicrobianos. Um estudo realizado na Etiópia, comparou a resistência bacteriana a múltiplas drogas a partir de águas residuais em ambientes hospitalares e não hospitalares e constatou que a resistência múltipla a medicamentos em ambiente hospitalar foi encontrada em 53/65 (81,5%) dos isolados, enquanto em ambiente não hospitalar foi encontrada em 26/48 (54,2%) dos isolados. O perfil de bactérias mais prevalentes foi semelhante ao deste estudo, a bactéria mais isolada foi *Klebsiella spp.* 30/113 (26,5%) seguida por *Pseudomonas spp.* 19/113 (16,8%), *E. coli* 13/113 (11,5%) e *Citrobacter spp* 13/113 (11,5%) (MOGES *et al.*, 2014).

A ala C foi o local que apresentou o maior número de isolados 16/76 (21,05%), seguido da ala A 15/76 (19,73%), ala B 13/76 (17,10%), CME 12/76 (15,78%), cozinha 7/76 (9,21%), ADM 7/76 (9,21%), lavanderia 4/76 (5,26 %) e necrotério 2/76 (2,63%) (Gráfico 3). A ala C foi o local que teve a maior contagem de isolados positivos para

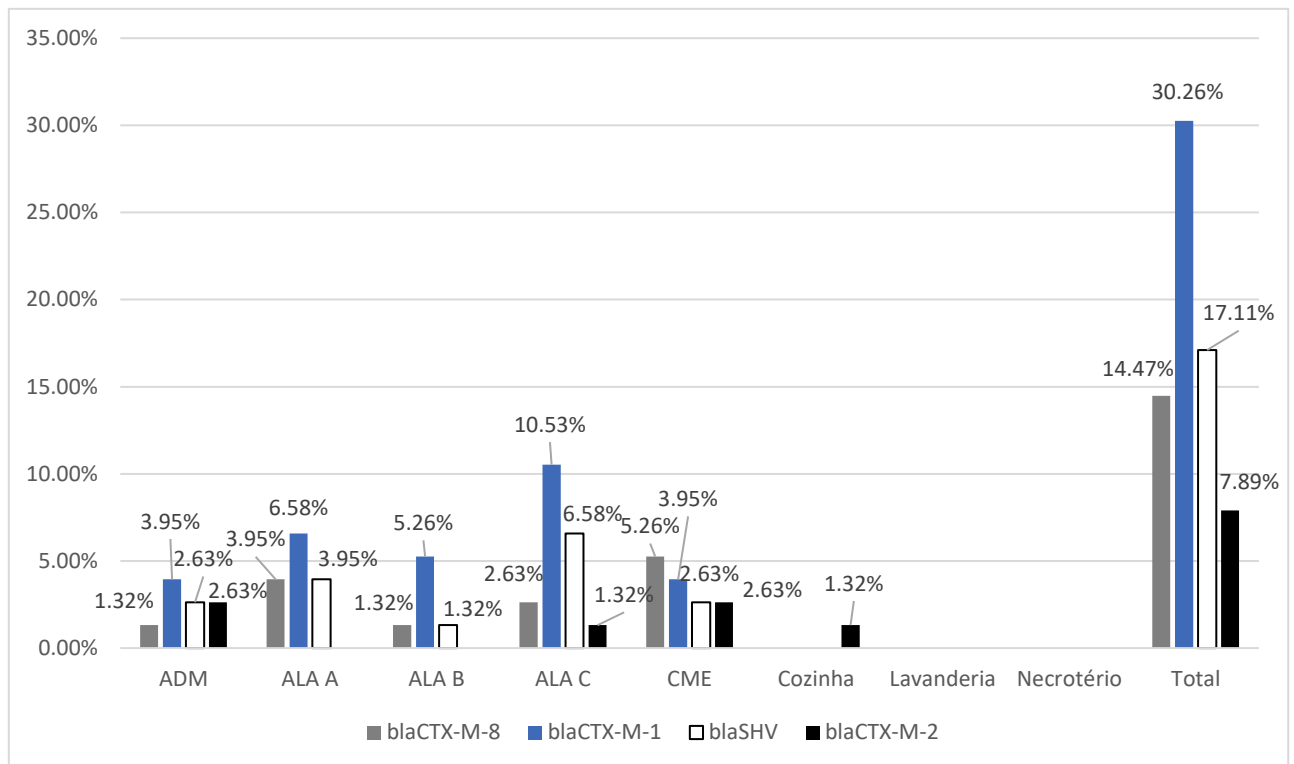
genes de ESBL (10), seguido por ala A (7), CME (6), ADM (4) e ala B (4). BGN recuperados do necrotério e da lavanderia não apresentaram genes de ESBL. Lavanderia e necrotério foram as áreas que apresentaram o menor número de isolados, possivelmente devido ao uso de desinfetantes e formol, que têm ação bactericida.

**Gráfico 3-** Contagem de isolados positivos e negativos para genes ESBL por local e percentual em relação ao total de isolados.



*bla*<sub>CTX-M-1</sub> foi detectado em 30,3% dos isolados (23/76), seguido de *bla*<sub>SHV</sub> (17,10% - 13/76), *bla*<sub>CTX-M-8</sub> (14,47% - 11/76) e *bla*<sub>CTX-M-2</sub> (7,89% - 6/76). Em relação a detecção de genes ESBL por local, como pode ser visualizado no Gráfico 4, *bla*<sub>CTX-M-1</sub> foi o gene mais detectado nas alas e na ADM. O gene predominantemente encontrado no CME foi *bla*<sub>CTX-M-8</sub>. O único gene detectado nos isolados das amostras de água da cozinha foi *bla*<sub>CTX-M-2</sub>.

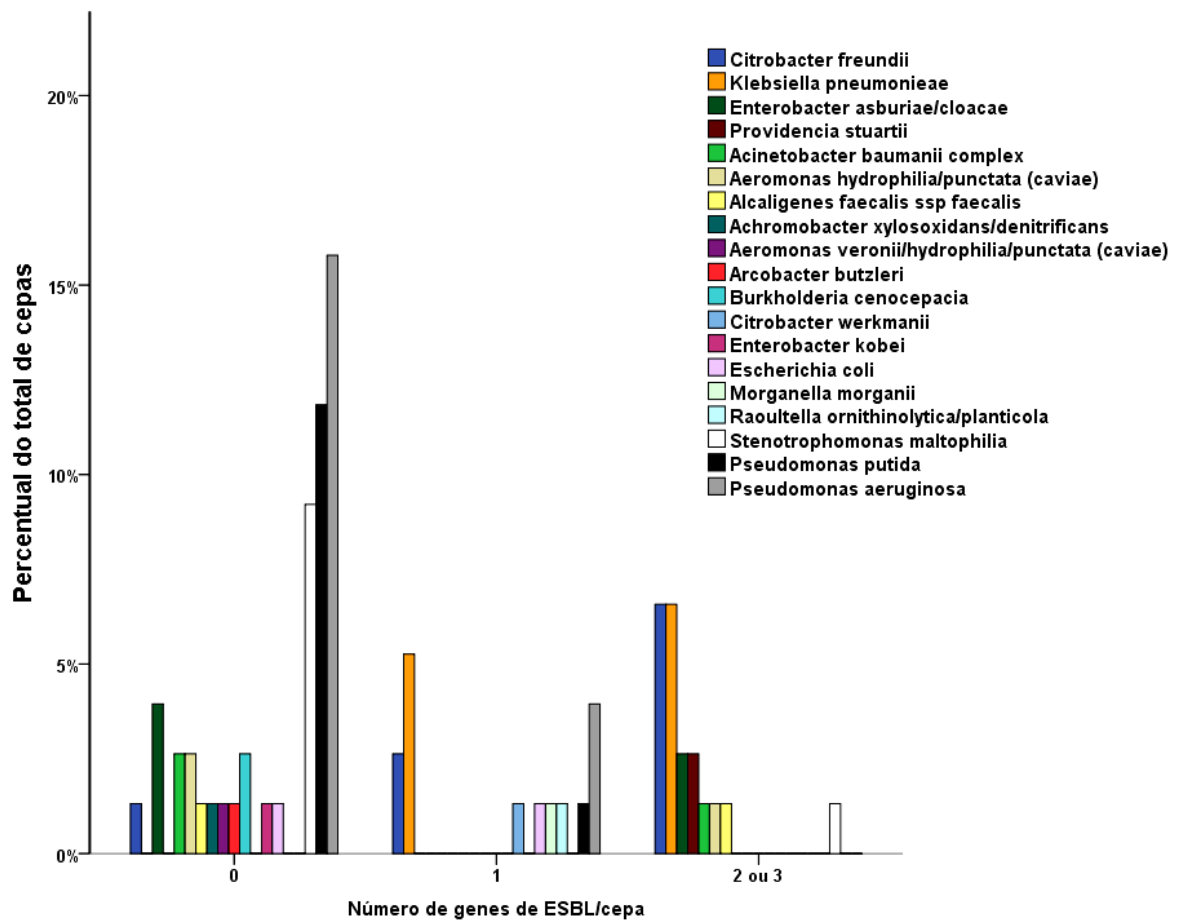
**Gráfico 4-** Distribuição percentual de *bla*<sub>CTX-M-1</sub>, *bla*<sub>CTX-M-8</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> e *bla*<sub>CTX-M-2</sub> segundo o setor hospitalar e percentual de cada gene no total de isolados.



Esses dados estão em concordância com a maioria dos estudos realizados com microrganismos produtores de ESBL isolados de efluentes hospitalares, geralmente o gene mais frequentemente detectado é *bla*<sub>CTX-M</sub>, pois é também um dos genes *bla* mais disseminado no mundo (HOCQUET; MULLER; BERTRAND, 2016; CAROLE, *et al.* 2018; DRIEUX, *et al.* 2016; CHAUDHRY, *et al.*, 2019). Um estudo semelhante, realizado no Rio de Janeiro, analisou a produção de genes ESBL em bactérias Gram negativas isoladas de uma estação de tratamento de esgoto hospitalar. Dos 221 isolados identificados, 40% foram caracterizados como produtores de ESBL. Os genes *bla*<sub>SHV</sub> e *bla*<sub>CTX-M</sub> foram detectados em 48% e 67% dos isolados bacterianos, respectivamente (CHAGAS *et al.*, 2011).

A detecção simultânea de mais de um gene de ESBL ocorreu em 23,68% (18/76) dos isolados analisados. Destes, pode-se destacar as espécies *Klebsiella pneumoniae* e *Citrobacter freundii* (Gráfico 5). Semelhantemente, uma pesquisa realizada com amostras de efluentes de três hospitais em Olsztyn, na Polônia, constatou que mais de 27,5% (25/91) dos isolados analisados portavam até três genes ESBL (KORZENIEWSKA; HARNISZ, 2013).

**Gráfico 5-** Número de genes de ESBL por cepa.



Isolados resistentes a ceftriaxona que não apresentaram genes ESBL podem ter mecanismos intrínsecos de resistência, como a superexpressão de enzimas AmpC cromossômicas. Enzimas AmpC são serino- $\beta$ -lactamases que conferem resistência a maioria dos antibacterianos  $\beta$ -lactâmicos e as associações com inibidores da  $\beta$ -lactamases por meio da expressão de genes cromossomais induzíveis ou plasmidiais. A hiperexpressão de AmpC, ocasionada por mutações no sistema de indução, confere resistência a cefalosporinas de amplo espectro. Espécies que naturalmente produzem AmpC são: *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Morganella morganii*, *Serratia marcescens*, *Shigella spp*, *Yersinia spp*, entre outras (SANTIAGO *et al.*, 2016; RUPPÉ; WOERTHER; BARBIER, 2015).

Como pode ser visualizado no Gráfico 5, muitos isolados da espécie *Stenotrophomonas maltophilia* mostraram resistência a ceftriaxona, porém não apresentaram genes ESBL. *S. maltophilia* produz duas  $\beta$ -lactamases cromossômicas induzíveis (L1 e L2). A metalobetalactamase L1 confere resistência intrínseca a todos

os  $\beta$ -lactâmicos, exceto aztreonam, não é suscetível a ação dos inibidores da  $\beta$ -lactamase e atua como carbapenemase. A serino- $\beta$ -lactamase L2, atua como carbapenemase e é suscetível a inibidores da  $\beta$ -lactamase (RODRIGUES; GIOIA; ROSSI, 2011; RUPPÉ; WOERTHER; BARBIER, 2015).

Além da possível expressão de outras  $\beta$ -lactamases, isolados resistentes a ceftriaxona que não apresentaram positividade para os genes ESBL testados, podem ter adotado outros mecanismos de resistência como a hiperexpressão de bombas de efluxo e redução da permeabilidade da membrana externa por perda de porina (SANTOS *et al.*, 2015).

Da coleção de isolados resistentes a carbapenem e negativos para genes de carbapenemase, 31,57% (6/19) dos isolados foram positivos para pelo menos um gene ESBL testado. Visto que microrganismos produtores de ESBL são sensíveis a ação dos antimicrobianos carbapenêmicos, a resistência pode ter sido ocasionada por mecanismos de resistência adicionais como a hiperexpressão de sistemas de efluxo, a alteração da permeabilidade da membrana devido a redução da expressão de proteínas ligadoras de penicilinas (PBPs) ou perda de porinas, (DANTAS *et al.*, 2015). Um estudo realizado com 63 isolados clínicos do Hospital Universitário Miguel Servet, na Espanha, constatou que a diminuição da suscetibilidade a carbapenêmicos em *Enterobacteriaceae* não foi devida a produção de carbapenemases, mas sim à atividade de  $\beta$ -lactamase (82,5% dos isolados eram produtores de ESBL ou AmpC), provavelmente em associação com a redução da permeabilidade da membrana externa (GÓMARA-LOMERO *et al.*, 2018).

O Hospital de Apoio de Brasília (HAB) é uma unidade de saúde de atenção em nível quaternário e presta assistência a pacientes em cuidados paliativos, em processo de reabilitação, além de ser referência em doenças neuromusculares. A resistência a  $\beta$ -lactâmicos causada por ESBL pode provocar danos a saúde de pacientes, além de acarretar prejuízos financeiros para as instituições de saúde, visto que o paciente que se trataria a domicílio com  $\beta$ -lactâmicos por administração via oral, agora deve ficar hospitalizado para receber o tratamento de escolha para infecções causadas por ESBL, pois os carbapenêmicos são administrados por via intravenosa.

A água residual hospitalar pode ser veículo de dispersão de genes de resistência devido ao mecanismo bacteriano de disseminação plasmidial de genes. Nessa vertente, determinantes genéticos podem ser transmitidos para outras

bactérias presentes no esgoto ou no meio ambiente, uma vez que os efluentes hospitalares nem sempre recebem o tratamento adequado e ainda é possível encontrar bactérias resistentes em água residual hospitalar mesmo depois de passar pelas estações de tratamento de esgoto (KORZENIEWSKA; HARNISZ, 2013; LIEN *et al.*, 2017).

## **6 CONCLUSÃO**

Águas residuais de atividades hospitalares veiculam BGN portando genes ESBL. Nessa vertente, a adoção de medidas sanitárias de controle é importante para minimizar impactos em saúde pública, visto que a pressão seletiva exercida em hospitais favorece a aquisição e a dispersão de determinantes de resistência.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADELOWO, Olawale Olufemi *et al.* Extended Spectrum Beta-Lactamase (ESBL)-producing bacteria isolated from hospital wastewaters, rivers and aquaculture sources in Nigeria. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 25, n. 3, p. 2744-2755, 2018.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Boletim Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde nº 16: Avaliação dos indicadores nacionais das Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) e Resistência microbiana do ano de 2016.** Disponível em: <[https://www20.anvisa.gov.br/segurancadopaciente/index.php/publicacoes?task=call\\_element&format=raw&item\\_id=687&element=f85c494b-2b32-4109-b8c1-083cca2b7db6&method=download&args\[0\]=aa3dabd05af4fdda35798e8a9eaae031](https://www20.anvisa.gov.br/segurancadopaciente/index.php/publicacoes?task=call_element&format=raw&item_id=687&element=f85c494b-2b32-4109-b8c1-083cca2b7db6&method=download&args[0]=aa3dabd05af4fdda35798e8a9eaae031)>. Acesso em: 28 jun. 2019.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Relatório GRSS Análise da resistência microbiana em infecções primárias de corrente sanguínea confirmadas laboratorialmente associadas a cateter venoso central, em unidades de terapia intensiva do Distrito Federal.** 2016. Disponível em: <[https://www20.anvisa.gov.br/segurancadopaciente/index.php/publicacoes?task=call\\_element&format=raw&item\\_id=564&element=f85c494b-2b32-4109-b8c1-083cca2b7db6&method=download&args\[0\]=aac7d5d22b3ec034b52404ebdee89944](https://www20.anvisa.gov.br/segurancadopaciente/index.php/publicacoes?task=call_element&format=raw&item_id=564&element=f85c494b-2b32-4109-b8c1-083cca2b7db6&method=download&args[0]=aac7d5d22b3ec034b52404ebdee89944)>. Acesso em: 28 jun. 2019.

AMBLER, Richard P. The structure of  $\beta$ -lactamases. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, v. 289, n. 1036, p. 321-331, 1980.

ANSALDI JÚNIOR, Miguel Angel. Frequência de  $\beta$ -lactamases dos grupos tem, shv, ctx-m e kpc produzidas por enterobactérias isoladas no estado do Rio Grande do Norte. 2014. Dissertação de Mestrado. Brasil.

AZEVEDO, Sílvia Marisa Moreira. Farmacologia dos Antibióticos Beta-lactâmicos. 2014. Tese de Doutorado. [sn].

BAPTISTA, Maria Galvão de Figueiredo Mendes *et al.* Mecanismos de resistência aos antibióticos. 2013. Dissertação de Mestrado.



BAUERNFEIND, Adolf.; SCHWEIGHART, Samuel.; GRIMM, Holly. A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Infection*, v. 18, n. 5, p. 294-298, 1990.

BONNET, Richard.; Growing group of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 48, n. 1, p. 1-14, 2004.

BUSH, Karen; JACOBY, George A.; MEDEIROS, Antone A. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 39, n. 6, p. 1211, 1995.

CAROLE, Gbonon M.'bengue Valérie *et al.* Antimicrobial Resistance Profile and Molecular Characterization of Extended-spectrum Beta-lactamase Genes in Enterobacteria Isolated from Human, Animal and Environment. **Journal of Advances in Microbiology**, p. 1-9, 2018.

CASELLA, Tiago *et al.* Detection of blaCTX-M-type genes in complex class 1 integrons carried by Enterobacteriaceae isolated from retail chicken meat in Brazil. *International journal of food microbiology*, v. 197, p. 88-91, 2015.

CASELLA, Tiago *et al.* Extended-spectrum cephalosporin-resistant *Escherichia coli* isolated from chickens and chicken meat in Brazil is associated with rare and complex resistance plasmids and pandemic ST lineages. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 2018.

CHAGAS, Thiago Pavoni Gomes *et al.* Multiresistance, beta-lactamase-encoding genes and bacterial diversity in hospital wastewater in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of applied microbiology**, v. 111, n. 3, p. 572-581, 2011

CHAUDHRY, Tamoor Hamid *et al.* Ocorrência de *Klebsiella pneumoniae* produtora de ESBL em ambientes hospitalares e resíduos. **Paquistão Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 32, 2019.

CHO, Hongbaek; UEHARA, Tsuyoshi; BERNHARDT, Thomas G. Beta-lactam antibiotics induce a lethal malfunctioning of the bacterial cell wall synthesis machinery. *Cell*, v. 159, n. 6, p. 1300-1311, 2014

D'ANDREA, Marco Maria *et al.* CTX-M-type  $\beta$ -lactamases: a successful story of antibiotic resistance. *International Journal of Medical Microbiology*, v. 303, n. 6-7, p. 305-317, 2013.

DA SILVA NOGUEIRA, Keite *et al.* Emergence of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase producing *Enterobacter* spp. in patients with bacteremia in a tertiary hospital in southern Brazil. *Enfermedades infecciosas y microbiologia clinica*, v. 32, n. 2, p. 87-92, 2014.

DANTAS, Raquel Cristina Cavalcanti *et al.* Estudo epidemiológico molecular da resistência aos carbapenêmicos em *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de sangue: produção de  $\beta$ -lactamases, perda de porina OprD e hiperexpressão de bombas de efluxo. 2015.

DECKER, Sérgio Renato Ferreira; GOMES, Mario Conill. Análise do desempenho e participação da agricultura familiar na avicultura de corte na região sul do Rio Grande do Sul/Brasil. *Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável*, v. 6, n. 1, 2016.

DRIEUX, Laurence *et al.* Quantitative evaluation of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* strains in the wastewater of a French teaching hospital and relation to patient strain. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, v. 5, n. 1, p. 9, 2016.

FREEMAN, Joshua T.; SEXTON, Daniel J.; ANDERSON, Deverick J. Emergence of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* in community hospitals throughout North Carolina: a harbinger of a wider problem in the United States?. *Clinical Infectious Diseases*, v. 49, n. 2, p. e30-e32, 2009.

GÓMARA-LOMERO, Marta María *et al.* Detection of carbapenemases and other mechanisms of enzymatic resistance to  $\beta$ -lactams in *Enterobacteriaceae* with diminished susceptibility to carbapenems in a tertiary care hospital. **Enfermedades infecciosas y microbiologia clinica (English ed.)**, v. 36, n. 5, p. 296-301, 2018.

HAEGGMAN, Sara.; LÖFDAHL, Sven.; BURMAN, Lars G. An allelic variant of the chromosomal gene for class A beta-lactamase K2, specific for *Klebsiella pneumoniae*, is the ancestor of SHV-1. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 41, n. 12, p. 2705-2709, 1997.

HAJI, Sayran Hamad *et al.* Molecular detection of SHV-Type ESBL in *E. coli* and *K. pneumoniae* and their antimicrobial resistance profile. *Zanco Journal of Medical Sciences (Zanco J Med Sci)*, v. 22, n. 2, p. 262-272, 2018.

HAMED, Refaat B. *et al.* The enzymes of  $\beta$ -lactam biosynthesis. *Natural product reports*, v. 30, n. 1, p. 21-107, 2013.

HAWKEY, Peter Michael. The epidemiology and molecular evolution of the CTX-M beta-lactamases. 2017. Tese de Doutorado. University of Birmingham.

HERNÁNDEZ, Jorge *et al.* Human-associated Extended Spectrum  $\beta$ -Lactamase (ESBL) in the antarctic. *Applied and environmental microbiology*, p. AEM. 07320-11, 2012.

HOCQUET, Didier.; MULLER, Allison; BERTRAND, Xavier. What happens in hospitals does not stay in hospitals: antibiotic-resistant bacteria in hospital wastewater systems. *Journal of Hospital Infection*, v. 93, n. 4, p. 395-402, 2016.

HUGONNET, Jean-Emmanuel *et al.* Factors essential for L, D-transpeptidase-mediated peptidoglycan cross-linking and  $\beta$ -lactam resistance in *Escherichia coli*. *Elife*, v. 5, p. e19469, 2016.

ISHII, Yoshikazu *et al.* Clonagem e sequencia do gene que codifica uma beta-lactamase de classe A hidrolisadora de cefotaxima isolada de *Escherichia coli*. *Agentes antimicrobianos e quimioterapia*, v. 39, n. 10, p. 2269-2275, 1995.

JEAN, Shio-Shin *et al.* Perfil epidemiológico e de suscetibilidade antimicrobiana de patógenos causadores de infecções do trato urinário na região Ásia-Pacífico: Resultados do Estudo para Monitoramento de Tendências de Resistência Antimicrobiana (SMART), 2010–2013. **Revista internacional de agentes antimicrobianos**, v. 47, n. 4, p. 328-334, 2016.

KANTELE, Anu *et al.* Fluoroquinolone antibiotic users select fluoroquinolone-resistant ESBL-producing Enterobacteriaceae (ESBL-PE)—Data of a prospective traveller study. *Travel medicine and infectious disease*, v. 16, p. 23-30, 2017.

KNOTHE, H. *et al.* Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection*, v. 11, n. 6, p. 315-317, 1983.

KORZENIEWSKA, Ewa; KORZENIEWSKA, Anna; HARNISZ, Monika. Antibiotic resistant *Escherichia coli* in hospital and municipal sewage and their emission to the environment. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 91, p. 96-102, 2013.

LAHLAOUI, Hella.; KHALIFA, Anis Ben Haj; MOUSSA, Mohamed Ben. Epidemiology of Enterobacteriaceae producing CTX-M type extended spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL). *Medecine et maladies infectieuses*, v. 44, n. 9, p. 400-404, 2014.

LIEN, La *et al.* Antibiotic resistance and antibiotic resistance genes in *Escherichia coli* isolates from hospital wastewater in Vietnam. *International journal of environmental research and public health*, v. 14, n. 7, p. 699, 2017.

LIVERMORE, David M. beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clinical microbiology reviews*, v. 8, n. 4, p. 557-584, 1995.

MA, Ling *et al.* Cloning and sequencing of the gene encoding Toho-2, a class A  $\beta$ -lactamase preferentially inhibited by tazobactam. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 42, n. 5, p. 1181-1186, 1998.

MATHERS, Amy J.; PEIRANO, Gisele; PITOUT, Johann DD. The role of epidemic resistance plasmids and international high-risk clones in the spread of multidrug-resistant Enterobacteriaceae. *Clinical microbiology reviews*, v. 28, n. 3, p. 565-591, 2015.

MATSUMURA, Yasufumi *et al.* CTX-M-27-and CTX-M-14-producing, ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* of the H 30 subclonal group within ST131 drive a Japanese regional ESBL epidemic. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 70, n. 6, p. 1639-1649, 2015.

MCDANEL, Jennifer *et al.* Incidence of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* infections in the United States: a systematic literature review. *infection control & hospital epidemiology*, v. 38, n. 10, p. 1209-1215, 2017.

MOGES, Feleke *et al.* Isolation and characterization of multiple drug resistance bacterial pathogens from waste water in hospital and non-hospital environments, Northwest Ethiopia. *BMC research notes*, v. 7, n. 1, p. 215, 2014.

MURO, Sissy *et al.* Risk factors associated with extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae nosocomial bloodstream infections in a tertiary care hospital: a clinical and molecular analysis. *Chemotherapy*, v. 58, n. 3, p. 217-224, 2012.

NEDJAI, Sabrina *et al.* Prevalence and characterization of extended spectrum  $\beta$ -lactamases in Klebsiella-Enterobacter-Serratia group bacteria, in Algeria. *Médecine et maladies infectieuses*, v. 42, n. 1, p. 20-29, 2012.

PARK, So Yeon *et al.* Risk factors and molecular epidemiology of community-onset, multidrug resistance extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* infections. *The Korean journal of internal medicine*, v. 32, n. 1, p. 146, 2017.

PATERSON, David L.; BONOMO, Robert A. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: a clinical update. *Clinical microbiology reviews*, v. 18, n. 4, p. 657-686, 2005.

PHILIPPON, ALAIN; LABIA, ROGER; JACOBY, GEORGE. Extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 33, n. 8, p. 1131, 1989.

PITOUT, Johann DD; HOSSAIN, Ashfaque; HANSON, Nancy D. Phenotypic and molecular detection of CTX-M- $\beta$ -lactamases produced by *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. *Journal of clinical microbiology*, v. 42, n. 12, p. 5715-5721, 2004.

PITTON, Jean -S. Mechanisms of bacterial resistance to antibiotics. In: *Ergebnisse der Physiologie Reviews of Physiology*, Volume 65. Springer, Berlin, Heidelberg, 1972. p. 15-93.

PONCE-DE-LEON, Alfredo *et al.* Antimicrobial susceptibility of gram-negative bacilli isolated from intra-abdominal and urinary-tract infections in Mexico from 2009 to 2015: Results from the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART). *PloS one*, v. 13, n. 6, p. e0198621, 2018.

QUAN, Jingjing *et al.* High prevalence of ESBL-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in community-onset bloodstream infections in China. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 72, n. 1, p. 273-280, 2016.

RODRIGUES, Luiza Souza; DI GIOIA, Thais Sabato Romano; ROSSI, Flávia. *Stenotrophomonas maltophilia*: resistência emergente ao SMX-TMP em isolados brasileiros. Uma realidade?. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 47, n. 5, p. 511-517, 2011.

RUPPÉ, Étienne; WOERTHER, Paul-Louis; BARBIER, François. Mechanisms of antimicrobial resistance in Gram-negative bacilli. *Annals of intensive care*, v. 5, n. 1, p. 21, 2015.

SANTIAGO, Gabrieli S. *et al.* Revisão: Produção de  $\beta$ -lactamases do Tipo AmpC em Enterobacteriaceae. Brazilian Journal of Veterinary Medicine, v. 38, n. Supl. 3, p. 17-30, 2016.

SANTOS, Ingrid de Arruda Lucena *et al.* Mecanismos de resistência antimicrobiana em *Pseudomonas aeruginosa*. 2015.

SILVA SÁNCHEZ, Jesús.  $\beta$ -lactamasas como principal mecanismo de resistencia a antibióticos  $\beta$ -lactámicos en bacterias causantes de infecciones hospitalarias. 2017.

SILVA, Ketrin Cristina da; LINCOPAN, Nilton. Epidemiologia das betalactamases de espectro estendido no Brasil: impacto clínico e implicações para o agronegócio. J Bras Patol Med Lab, v. 48, n. 2, p. 91-99, 2012.

TACÃO, Marta *et al.* Co-resistência a diferentes classes de antibióticos entre produtores de ESBL de sistemas aquáticos. Pesquisa sobre a água , v. 48, p. 100-107, 2014.

THOMAS, Mark G.; SMITH, Alesha J.; TILYARD, Murray. Rising antimicrobial resistance: a strong reason to reduce excessive antimicrobial consumption in New Zealand. The New Zealand Medical Journal (Online), v. 127, n. 1394, 2014.

ZAPUN, André; CONTRERAS-MARTEL, Carlos; VERNET, Thierry. Penicillin-binding proteins and  $\beta$ -lactam resistance. FEMS microbiology reviews, v. 32, n. 2, p. 361-385, 2008.

ZENG, Ximin; LIN, Jun. Beta-lactamase induction and cell wall metabolism in Gram-negative bacteria. Frontiers in microbiology, v. 4, p. 128, 2013.