



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CEILÂNDIA
CURSO DE FARMÁCIA**

STEFANY INGRID LOPES SANTANA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE BACILOS GRAM NEGATIVOS
RESISTENTES A CARBAPENEM ISOLADOS DE AMOSTRAS DE ÁGUA
RESIDUAL DE AMBIENTE HOSPITALAR**

BRASÍLIA - DF, 2019

STEFANY INGRID LOPES SANTANA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE BACILOS GRAM NEGATIVOS
RESISTENTES A CARBAPENEM ISOLADOS DE AMOSTRAS DE ÁGUA
RESIDUAL DE AMBIENTE HOSPITALAR**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como requisito parcial para
obtenção do grau de Bacharel em
Farmácia, 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)

Ic Ingrid Lopes Santana, Stefany
Caracterização molecular de bacilos Gram negativos
resistentes a carbapenem isolados de amostra de água
residual de ambiente hospitalar / Stefany Ingrid Lopes
Santana; orientador Alex Leite Pereira. -- Brasília, 2019.
43 p.

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

1. bacilos Gram negativos. 2. kpc. 3. ndm. 4. água
residual. 5. hospital. I. Leite Pereira, Alex, orient. II.
Titulo.

STEFANY INGRID LOPES SANTANA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE BACILOS GRAM NEGATIVOS
RESISTENTES A CARBAPENEM ISOLADOS DE AMOSTRAS DE ÁGUA
RESIDUAL DE AMBIENTE HOSPITALAR**

BANCA EXAMINADORA

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

Prof^a. Dr^a Daniela Castilho Orsi
(FCE/Universidade de Brasília)

Prof^o. Dr^o. Edgar Guimarães Bione
(FCE/Universidade de Brasília)

BRASÍLIA - DF, 2019

Aos meus pais, Bernadete e Gilson.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de demonstrar minha gratidão a todos que, direta ou indiretamente participaram de toda a minha trajetória acadêmica.

À minha família por todo amor, carinho, apoio incondicional e pelos incentivos. Obrigada, mãe e pai, por estar sempre ao meu lado, nunca me deixarem desistir e, apesar de todas as dificuldades, me oferecerem tudo para que eu pudesse chegar até aqui. Vocês são tudo pra mim, essa conquista é de vocês. Obrigada ao meu irmão Vinícius por estar sempre presente, pela amizade, por todas as conversas e por tudo o que já passamos juntos.

Aos meus amigos que sempre me apoiaram e estiveram presentes, por me fazer rir nos momentos tristes e por celebrar nos momentos de alegria. Agradeço imensamente a companhia de vocês.

Ao meu orientador por me proporcionar conhecer e me encantar pela microbiologia, suas aulas e ensinamentos são uma inspiração. Obrigada por todo o incentivo em todos esses anos, pela paciência e por toda sabedoria compartilhada. Agradeço ainda pela confiança, pela oportunidade de trabalhar contigo e por todas as histórias. O senhor é um exemplo para que eu me torne uma profissional melhor a cada dia.

Aos meus amigos e colegas de laboratório, a jornada foi longa e teria sido mais árdua sem a presença de vocês, obrigada por todo o conhecimento compartilhado ao longo desses anos.

Agradeço também à Universidade de Brasília por me oferecer professores incríveis, pelo ambiente e todas as atividades acadêmicas. Meu muito obrigada para todos os profissionais que fazem esta universidade.

RESUMO

Bacilos Gram negativos (BGN) estão amplamente distribuídos no ambiente e em seres humanos. BGN são uma das principais causas de infecção nosocomial e a resistência desses bacilos aos carbapenêmicos é um importante problema em ambiente hospitalar. Neste contexto, água residual de atividades hospitalares pode ser reservatório de bactérias resistentes aos carbapenêmicos. O objetivo deste trabalho foi identificar BGN resistentes a carbapenêmicos isolados de amostras de águas residuais do Hospital de Apoio de Brasília (HAB/DF). Foram pesquisados 5 genes de resistência à carbapenêmicos (*bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{VIM} e *bla*_{IMP}). Foi isolado um total de 76 BGN recuperados principalmente de água residual de banho (38/76), da Central de Materiais Esterilizados (12/76), da cozinha (7/76) e da administração (7/76). A espécie mais frequentemente isolada foi *Pseudomonas aeruginosa* (19,7%) seguida de *Pseudomonas putida* (13,1%). Os genes *bla*_{OXA-48}, *bla*_{VIM} e *bla*_{IMP} não foram detectados. 30,3% dos isolados apresentaram resultados positivos para pelo menos um gene bla, enquanto 25% apresentaram resultados excludentes para *bla*_{KPC} (17,1%) e *bla*_{NDM} (7,9%). Em 4 cepas (5,3%) *bla*_{KPC} e *bla*_{NDM} foram detectados simultaneamente. Água residual produzida em atividades hospitalares contribuem para a dispersão de espécies de BGN portando genes de resistência a carbapenem.

Palavras-chave: bacilos Gram negativos; kpc; ndm; água residual; hospital.

ABSTRACT

Gram negative bacilli (GNB) are widely distributed in the environment and in humans. GNB are one of the main causes of nosocomial infection and the resistance of these bacilli to carbapenems is an important problem in a hospital environment. In this context, wastewater from hospital activities may be a reservoir of carbapenem-resistant bacteria. The aim of this study was to identify GNB resistant to carbapenems isolated from wastewater samples of Hospital de Apoio de Brasília (HAB/DF). Five carbapenem resistance genes (*bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{VIM} e *bla*_{IMP}) were investigated. A total of 76 GNB was recovered mainly from bathroom wastewater (38/76), from the Central of Sterilized Materials (12/76), from the kitchen (7/76) and Administration (7/76). The most frequently isolated species was *Pseudomonas aeruginosa* (19.7%) followed by *Pseudomonas putida* (13.1%). The *bla*_{OXA-48}, *bla*_{VIM} e *bla*_{IMP} genes were not detected. 30.3% of the isolates was positive for at least one *bla* gene, while 25% had exclusive results for *bla*_{KPC} (17.1%) and *bla*_{NDM} (7.9%). In 4 strains (5.3%) *bla*_{KPC} and *bla*_{NDM} were detected simultaneously. Wastewater produced in hospital activities contribute to the dispersion of GNB species carrying carbapenem resistance genes.

Keywords: Gram-negative bacilli; kpc; ndm; wastewater; hospital.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS.....	8
LISTA DE TABELAS	9
LISTA DE ABREVIÇÕES E SÍMBOLOS	10
1. INTRODUÇÃO	11
2. JUSTIFICATIVA.....	19
3. OBJETIVOS.....	20
3.1. OBJETIVO GERAL	20
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
4. METODOLOGIA	21
4.1. COLETA E CULTURA DAS AMOSTRAS DE ÁGUA.....	21
4.2. IDENTIFICAÇÃO DOS BACILOS GRAM NEGATIVOS.....	22
4.3. EXTRAÇÃO DE DNA.....	22
4.4. DETECÇÃO DOS GENES PARA CARBAPENEMASE	23
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
6. CONCLUSÃO	35
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

Quadro 1 – Descrição dos grupos presuntivos identificados meio cromogênico (chromID™ ESBL bioMérieux).

Gráfico 1 – Distribuição dos isolados bacterianos resistentes a ceftriaxona e carbapenem por local e por cultura de origem.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação de β -lactamases proposta por Bush e Jacoby.

Tabela 2 – Sequência de oligonucleotídeos e fragmentos esperados utilizados para a detecção de genes de carbapenemase.

Tabela 3 – Positividade das culturas resistentes a carbapenem por local.

Tabela 4 – Perfil de espécies bacterianas resistentes a ceftriaxona e carbapenem isoladas no Hospital de Apoio de Brasília – HAB/DF.

Tabela 5 – Positividade de bacilos Gram negativos portando genes bla por local no Hospital de Apoio de Brasília – HAB/DF.

Tabela 6 – Distribuição de genes bla em bacilos Gram negativos isolados no Hospital de Apoio de Brasília – HAB/DF.

LISTA DE ABREVIações E SÍMBOLOS

ADM - Administração

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATCC- American Type Culture Collection

BGN – Bacilos Gram negativos

bla – Beta-lactamase

CHCA- α -ciano-4-hidrocinâmico

CME – Central de Materiais Esterilizados

ESBL – *β -lactamase de espectro estendido*

HAB/DF – Hospital de Apoio de Brasília

IMP – *Imipenemase*

IRAS - Infecções Relacionadas à Assistência a Saúde

KPC - *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase

LACEN-DF – Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal

MALDI TOF - *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight*

mL - mililitro

NDM - *New Delhi metallo- β -lactamase*

OXA - *Oxacillin-hydrolyzing*

PBP – *Penicillin binding protein*

PCR - *Polymerase Chain Reaction*

RCF – Força Centrífuga Relativa

RPM – Rotações por minuto

UTI – Unidade de Tratamento Intensivo

VIM - *Verona integron–encoded metallo- β - lactamase*

μ L – microlitro

μ g - micrograma

1. INTRODUÇÃO

Bacilos Gram negativos (BGN) estão amplamente dispersos no ambiente e em seres humanos. Estes microrganismos são comumente associados a infecções podendo ser isolados em diversos sítios do corpo humano. Dentre os BGN de maior importância clínica podemos destacar os membros da família *Enterobacteriaceae* e os BGN não fermentadores (PROCOP et al., 2016).

Espécies de *Enterobacteriaceae* são capazes de fermentar glicose, não exibem atividade da citocromo-oxidase e reduzem nitrato a nitrito. São os isolados bacterianos mais frequentemente encontrados em amostras clínicas. Indivíduos imunocomprometidos ou debilitados são eminentemente susceptíveis a infecções hospitalares causadas por enterobactérias que decorrem principalmente de procedimentos invasivos (PROCOP et al., 2016).

Os BGN não fermentadores são bactérias aeróbicas que não degradam carboidratos como fonte de energia. Estes bacilos são comumente encontrados na natureza e estão presentes, sobretudo, em solo e em água. Em ambiente hospitalar, eventualmente são isolados de equipamentos médico-hospitalares bem como da pele de profissionais de saúde. O potencial de transmissão horizontal a partir de fômites e das mãos de profissionais de saúde endossa a importância clínica dos BGN não fermentadores (PROCOP et al., 2016; VISHWANATH, MUNIM, CHAWLA, 2013).

A relevância das infecções por BGN é enfatizada em estudos de epidemiologia que evidenciam uma maior prevalência desses microrganismos comparada a infecções por bactérias Gram positivas (VINCENT, 2009). No Brasil, uma publicação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) sobre Infecções Relacionadas à Assistência a Saúde (IRAS) demonstrou que 53,5% dos isolados em Infecções Primárias de Corrente Sanguínea (IPCSL) associada a Cateter Venoso Central (CVC) em pacientes hospitalizadas em Unidade de Tratamento Intensivo (UTI) adulto são bacilos Gram negativos. A espécie *Klebsiella pneumoniae* foi notificada como o segundo agente etiológico mais isolado nestas infecções, com uma frequência de 18,2% perdendo apenas para *Staphylococcus Coagulase negativa* com 18,9%. Deste mesmo

estudo, dados de UTI pediátrica e UTI neonatal apresentam frequência de 46,2% e 38,5%, respectivamente, para isolados de BGN em IPCSL associada a CVC (BRASIL, 2017).

Braun et al (2014) realizaram um estudo retrospectivo para avaliar a predominância de BGN em infecções sanguíneas relacionadas a cateter entre 1996 a 2012. Em 1996, infecções por bactérias Gram positivas ocorriam com maior frequência (68% vs. 32%), porém ao longo dos anos essa porcentagem inverteu-se e no ano de 2012 as infecções causadas por Gram positivos representavam 22% contra 78% de Gram negativos. Além disso, no período de 2010-2012 do mesmo estudo, *Pseudomonas aeruginosa* (22%) e *Klebsiella sp.* (19,5%) foram as espécies mais frequentemente isoladas.

Devido ao surgimento da antibioticoterapia, o controle e/ou prevenção de infecções tornou-se possível. Em meio a diversas classes de antibióticos, os β -lactâmicos são um dos mais utilizados na prática clínica devido ao seu amplo espectro de ação, propriedades farmacocinéticas favoráveis, baixo custo e sua segurança clínica (MELETIS; BAGKERI, 2014). Além disso, suportam a manipulação de sua estrutura química, de tal modo que nenhuma outra classe de antibióticos se compara em maleabilidade e versatilidade (LIVERMORE; WOODFORD, 2006).

Os β -lactâmicos têm como mecanismo de ação a inibição da síntese do peptidoglicano da parede celular bacteriana. Na fase final da síntese da parede celular ocorre a reação de transpeptidação (crosslinking) que efetua a ligação cruzada das cadeias de mureína. Este processo é realizado por transpeptidases, enzimas classificadas como proteínas ligadoras de penicilina (do inglês *penicillin binding protein* - *PBPs*). Os β -lactâmicos se ligam irreversivelmente às PBPs interrompendo a síntese da parede celular levando a lise da membrana externa dos BGN (NORDMANN; DORTET; POIREL, 2012).

Entre os antibióticos da classe dos β -lactâmicos, os carbapenêmicos possuem o maior espectro de ação e são reservados para infecções hospitalares graves e para uso em microrganismos multirresistentes. O consumo destes antibióticos foi intensificado ao longo dos anos 2.000 principalmente devido a dispersão nosocomial de cepas de *Escherichia coli*

produtoras de β -lactamases de espectro estendido – ESBLs (do inglês, *Extended-Spectrum β -Lactamases*) capazes de hidrolisar quase todos os β -lactâmicos exceto os carbapenêmicos (NORDMANN; DORTET; POIREL, 2012). Do mesmo modo, por apresentar menos efeitos adversos, carbapenêmicos são mais seguros para uso comparado a outros antibióticos de último recurso como as polimixinas. Por estes motivos, a demanda crescente por carbapenêmicos resultou em pressão seletiva para a emergência e rápida dispersão de cepas resistentes aos carbapenêmicos, principalmente entre bacilos Gram negativos (MELETIS, 2016).

Os mecanismos de resistência aos carbapenêmicos são variados e podem manifestar-se desde mudanças na permeabilidade da membrana externa da célula bacteriana, expulsão do antibiótico por bombas de efluxo, mutação ou modificação do alvo do antibiótico e até mesmo hidrólise do anel β -lactâmico por enzimas especializadas chamadas carbapenemases (POTTER; D'SOUZA; DANTAS, 2016).

A primeira enzima capaz de hidrolisar antibióticos β -lactâmicos foi identificada em 1940 por Abraam & Chain, desde então diversas enzimas β -lactamases foram identificadas. A resistência mediada por β -lactamases é o mecanismo mais estudado e clinicamente mais significativo uma vez que há a possibilidade de β -lactamases hidrolisar vários β -lactâmicos simultaneamente, como ocorre com carbapenemases. Além disso, genes que codificam β -lactamases podem ser transferidos entre espécies de BGN por conjugação. (MELETIS, 2016; MELETIS, BAGKERI, 2014; QUEENAN, BUSH, 2007).

A classificação das β -lactamases pode ser baseada nas sequências de aminoácidos ou nas características funcionais (BUSH; FISCHER, 2011). Ambler (1980) propôs a classificação mais simples das β -lactamases em função das semelhanças estruturais. De acordo com esse modelo molecular as carbapenemases foram divididas em classes A, C e D que incluem as serina- β -lactamases, ou seja, que possuem um resíduo de serina no seu sítio ativo; enquanto que a classe B inclui as metalo- β -lactamases, que utilizam íons de zinco como cofator enzimático.

Bush e Jacoby (2010) propuseram uma nova classificação das β -lactamases que unificou tanto a classificação estrutural quanto a funcional alocando-as em grupos e subgrupos. As carbapenemases compõem os grupos 2df, 2f, 3^a e 3b.

Tabela 1 – Classificação de β -lactamases proposta por Bush e Jacoby.

Classificação de Bush-Jacoby	Classificação molecular (subclasse)	Inibida por		Enzimas representantes
		AC ou TZB ¹	EDTA	
2df	D	Variável	Não	OXA-23, OXA-48
2f	A	Variável	Não	KPC-2, IMI-1, SME-1
3a	B (B1)	Não	Sim	IMP-1, VIM-1, CcrA, IND-1
3b	B (B2)	Não	Sim	CphA, Sfh-1

¹ Ácido clavulânico ou Tazobactam.

Fonte: Adaptado de BUSH e JACOBY, 2010.

Entre os membros da Classe A, a enzima KPC (*Klebsiella pneumoniae carbapenemase*) possui maior importância clínica devido a sua dispersão mundial. Sua descoberta ocorreu na Carolina do Norte, EUA, em 1996 em um isolado resistente a todos os β -lactâmicos testados. Após essa descoberta, relatos de suas variantes circulando pelos Estados Unidos (EUA) começaram a emergir, e em 2005 o primeiro caso externo aos EUA foi documentado na França. Genes *bla*_{KPC} demonstraram grande potencial para dispersão devido sua localização em plasmídeos e especialmente por ser frequentemente detectada em cepas de *K. pneumoniae* que possui conhecida capacidade inata de acumular e transferir determinantes de resistência à outras bactérias (QUEENAN; BUSH, 2007).

Dentre as variantes da classe D de β -lactamases, a OXA-48 (*Oxacillin-hydrolyzing*) é a mais frequentemente detectada. Seu primeiro caso identificado foi de um isolado de *K. pneumoniae* na Turquia em 2001. Este isolado portando o gene *bla*_{OXA-48} encontrava-se em um plasmídeo e determinava resistência a

todos os antibióticos β -lactâmicos. Atualmente essa β -lactamase é dispersa mundialmente e encontra-se presente em países como a Turquia, China, Índia, Brasil, entre outros (POIREL, POTRON, NORDMANN, 2012; YONG et al., 2009).

As metalo- β -lactamases são caracterizadas por sua habilidade de hidrolisar carbapenêmicos e por sua resistência aos inibidores de β -lactamases comerciais, contudo são inibidas por quelantes de metais como o EDTA (ácido etilendiamino tetra-acético). Diferentemente do que ocorre com as serina- β -lactamases, os primeiros relatos dessas enzimas foram de origem cromossomal e em microrganismos ambientais como o *Bacillus cereus*, *Aeromonas spp.* e *Stenotrophomas maltophilia*, entretanto essas enzimas cromossomais não são facilmente transferidas entre as bactérias. Dentre as metalo- β -lactamases mais relevantes são VIM (*Verona integron-encoded metalo- β -lactamase*) e IMP (*imipenemase*) uma vez que são enzimas plasmidiais capazes de transferência entre as diversas espécies bacterianas e estão dispersas por todos os continentes (QUEENAN, BUSH, 2007; MELETIS, BAGKERI, 2014). A carbapenemase IMP foi primeiramente detectada no Japão nos anos 90 em BGN não fermentadores e dispersou-se de forma lenta pela Ásia, até ser detectada na Europa, Canadá e Brasil. Já a carbapenemase VIM teve seu primeiro relato em Verona, Itália, em 1999 e já foi detectada em outros países da Europa, América do Sul, Ásia e nos Estados Unidos (DAVOODI et al., 2015; POIREL, POTRON, NORDMANN, 2012).

Mais recentemente em 2008, foi identificada na Suécia a metalo- β -lactamase NDM-1 (*New Delhi metalo- β -lactamase*) isolada de uma cepa de *K. pneumoniae* em uma urocultura de um paciente previamente hospitalizado em Nova Deli, Índia. Uma coprocultura realizada posteriormente recuperou uma cepa de *E. coli* carregando um perfil de resistência similar, sugerindo a possibilidade de transferência por conjugação. A *K. pneumoniae* portando NDM-1 era resistente a todos os β -lactâmicos e sensível apenas a colistina, enquanto o isolado de *E. coli* era sensível a aztreonam, cefepima e ciprofloxacino. O gene *bla*_{NDM} confere resistência a quase todos os β -lactâmicos, raramente está integrado em cromossomo e normalmente está presente em plasmídeos em conjunto com outros fatores de resistência (YONG

et al., 2009; RAGHUNATH, 2010). Em uma revisão de Khan, Maryam e Zarrilli (2017) reportaram a dispersão de NDM-1 e suas variantes em todos os continentes, apontando o Brasil como o maior reservatório de NDM da América do Sul.

As enzimas da classe C não são consideradas carbapenemases. A partir de estudos foi demonstrado que essas β -lactamases possuem um baixo poder de hidrólise aos carbapenêmicos, entretanto a sua superexpressão pode contribuir para a resistência aos carbapenêmicos quando combinados a outros mecanismos (MELETIS, 2016).

Apesar de cepas portando genes de resistência a carbapenêmicos estarem comumente restritas a hospitais, é estabelecido que indivíduos colonizados e infectados têm potencial de disseminar bactérias acompanhadas de antibióticos a partir de seus excrementos (PICÃO et al, 2013). Diante disso, estudos recentes demonstram que ambientes aquáticos operam como reservatórios de bactérias portando genes de resistência aos carbapenêmicos demonstrando uma importante fonte de dispersão destes genes. Em uma pesquisa realizada no Rio de Janeiro, Brasil, publicada em 2016 foi relatado que 13,6% dos isolados oriundos do Rio Carioca portavam o gene *bla*_{KPC-2} e destes, todos se caracterizavam como BGN (ARAUJO et al., 2016). Em outro estudo realizado na China em 2016, água de efluentes foram coletadas para verificar a presença de bactérias portando genes de resistência aos carbapenêmicos e como resultado obtiveram que 97 isolados portavam o gene *bla*_{KPC-2} e destes 61,9% eram BGN (YANG et al., 2016).

Frequentemente, hospitais não possuem tratamento específico para água residual produzida antes do escoamento para o sistema de tratamento de esgoto. Sistemas de tratamentos em áreas urbanas costumam realizar apenas o processo de lodo ativado, o qual tem por objetivo meramente remover poluentes biodegradáveis. Na segunda etapa deste processo, a água tratada é escoada para rios, lagos ou oceanos. Neste processo a carga bacteriana inicial é diminuída, contudo uma quantia significativa ainda permanece, especialmente as resistentes a antibióticos (PICÃO et al., 2013).

Neste contexto, águas residuais produzidas por atividades hospitalares podem ser consideradas reservatórios favoráveis para a troca de genes de resistência entre bactérias hospitalares e ambientais na presença de antibióticos (LE et al, 2016; PICÃO et al, 2013). Apesar da evidente importância das águas residuais de hospital para a emergência e dispersão de cepas bacterianas resistentes, esta permanece uma área pouco estudada. Ainda assim, pesquisas realizadas reportaram a água residual de hospitais como importantes reservatórios de bactérias produtoras de carbapenemase (CHAGAS et al., 2011a; DAOUD et al., 2018; NASRI et al., 2017; PICÃO et al., 2013; ZHANG, LÜ, ZONG, 2012; ZURFLUH et al., 2017).

Em 2011 houve o primeiro relato do gene *bla*_{KPC-2} em água residual de hospital no Brasil. Dois isolados de *K. pneumoniae* foram recuperados em 2008 e exibiam resistência a cefalosporinas de largo espectro e a carbapenêmicos, além disso foi detectada co-resistência a piperacilina/tazobactam, ciprofloxacino e sulfametoxazol/trimetoprima (CHAGAS et al, 2011a). No ano seguinte a este relato, Zhang, Lü & Zong (2012) relataram novamente a presença de *bla*_{KPC-2} em água residual de um hospital na China. Quinze cepas recuperadas albergavam o gene e um isolado carregava concomitantemente *bla*_{IMP-4}. No estudo de PICÃO et al (2013), foram isolados 312 BGN oriundos de água residual de hospital no Brasil com 62 isolados positivos para *bla*_{KPC-2}. Sendo que 41,9% dos produtores de KPC-2 eram *K. pneumoniae*.

Diante de estudos demonstrando que águas residuais de atividades hospitalares são fontes de bactérias portando genes de carbapenemases aliado ao fato de que sistemas convencionais de tratamento de esgoto não objetivam a eliminação completa de bactérias, compreendemos que a liberação desses resíduos hospitalares pode ser um importante problema de saúde pública (NASRI et al, 2017; KIM, PARK, 2018).

Foi proposto um estudo para identificação de BGN portando genes de resistência aos carbapenêmicos em águas residuais no âmbito do Hospital de Apoio de Brasília (HAB/DF). A definição de microrganismos carregando determinantes de resistência a antibióticos em água residual é importante para a criação de novas estratégias de manejo de efluentes hospitalares visando a

carga bacteriana e/ou de genes de resistência antes escoá-las para sistemas de tratamento.

2. JUSTIFICATIVA

Isolados de BGN são importantes causa de infecção tanto nosocomiais quanto adquiridas na comunidade. Os bacilos da família *Enterobacteriaceae* são os isolados mais frequentemente encontrados em amostras clínicas enquanto que os BGN não fermentadores são comumente isolados de diversos sítios do ambiente hospitalar. Além disso, BGN possuem extensa capacidade de transmissão horizontal de genes de resistência.

Em virtude de águas residuais geradas em ambiente hospitalar constituir um importante ambiente de seleção bacteriana, faz-se necessário o conhecimento sobre as espécies bacterianas resistentes a carbapenêmicos circulando neste ambiente e o seu perfil molecular para definir e apoiar medidas de contenção sanitária ante a dispersão da resistência bacteriana.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

- Verificar a ocorrência de bacilos Gram negativos (BGN) portadores de genes de resistência a carbapenêmicos em amostras de água residual do Hospital de Apoio de Brasília (HAB/DF).

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar e identificar de cepas resistentes a carbapenêmicos em água residual de hospital;
- Detectar genes de carbapenemase (*bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{VIM}*, *bla_{IMP}* e *bla_{OXA}*) nos bacilos isolados;
- Estabelecer o perfil de espécies de BGN resistentes a carbapenêmicos;
- Avaliar a frequência de BGN portadores de genes de carbapenemase por área hospitalar.

4. METODOLOGIA

4.1. COLETA E CULTURA DAS AMOSTRAS DE ÁGUA

Amostras de água residual de diversos pontos do hospital foram coletadas em tubo tipo falcon estéril (50 mL) em três datas distintas no período de maio a setembro de 2017. Foram coletadas amostras dos seguintes locais: água residual de banho das alas A, B, C, esgoto da Central de Materiais Esterilizados (CME), esgoto da cozinha, esgoto da lavanderia, esgoto da administração geral, esgoto do necrotério; água de descontaminação das alas A, B e ala C, caixa de gordura da cozinha e água do CME após esterilização.

Para o cultivo de cada amostra foram utilizados 4 mL de caldo de enriquecimento Luria-Bertani (LB) suplementados com antibióticos vancomicina (7µg/mL) e ertapenem (2,5µg/mL). Quinhentos µL da amostra homogeneizada foi inoculada em LB com antibióticos e incubados em estufa por 24 horas a 36±1°C. As culturas positivas (indicadas pela turbidez do meio) foram semeadas em meio cromogênico (chromID™ ESBL bioMérieux) e incubadas em estufa a 36±1°C por 18-24 horas. As colônias foram isoladas em função do grupo presuntivo definido na bula do meio cromogênico, sendo um isolado uma colônia de cada grupo presuntivo (Quadro 1). As colônias foram preservadas em meio de cultura semissólido (ágar nutriente).

Quadro 1 – Descrição dos grupos presuntivos identificados meio cromogênico (chromID™ ESBL bioMérieux).

Grupo presuntivo	Coloração exibida no meio cromogênico
KESC (<i>Kebsiella</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Serratia</i> e <i>Citrobacter</i>)	Verde ou azul
<i>Escherichia coli</i>	Rosada a bordô
<i>Proteus</i>	Marrom
Proteeae (<i>Proteus</i> , <i>Providencia</i> , <i>Moraganella</i>)	Marrom claro a branco

Uma coleção de 40 cepas de BGN resistentes a cefalosporina de terceira geração recuperadas do mesmo ambiente hospitalar foi utilizada para a composição deste estudo.

4.2. IDENTIFICAÇÃO DOS BACILOS GRAM NEGATIVOS

A identificação dos bacilos Gram negativos foi realizada no Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal (LACEN-DF) utilizando o sistema automatizado *MALDI TOF* (do inglês, *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight*) *VITEK® MS*, que realiza identificação microbiana por meio da espectrometria de massa.

As culturas previamente isoladas em ágar nutriente foram recuperadas em caldo LB e incubadas em estufa a $36\pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas, após este período foram semeadas em ágar Mueller Hinton (MH) e incubadas novamente a $36\pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas. A colônia crescida foi depositada em slide-alvo e após secagem foi coberta com a matriz de ácido α -ciano-4-hidrocinâmico (CHCA). Os espectros obtidos foram comparados ao banco de dados do aparelho e exibido através do software MYLA®. A cepa *E. coli* ATCC™ (do inglês, *American Type Culture Collection*) 8739 foi utilizada como controle de identificação. Foram incluídos neste trabalho apenas espécies de bacilos Gram negativos confirmados pelo *VITEK® MS*.

4.3. EXTRAÇÃO DE DNA

As culturas estocadas em ágar nutriente foram recuperadas em caldo LB e incubadas a $36\pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas. Para a extração de DNA, 1 mL desta cultura bacteriana foi centrifugada (3.000 RCF/3 min.). O sobrenadante foi descartado e foi adicionado 600 μL de água deionizada ao sedimento bacteriano e novamente centrifugado (3.000 RCF/3 min.). O precipitado foi ressuspenso em 1 mL de Tris-HCl 10 mmol pH 8,2. A suspensão foi colocada em banho-maria a 100°C por 15 minutos e centrifugada (11.000 RPM/3 min.). O sobrenadante (600 μL) foi utilizado como DNA total para as reações de amplificação.

4.4. DETECÇÃO DOS GENES PARA CARBAPENEMASE

A detecção dos genes de carbapenemase foi realizada a partir da reação em cadeia da polimerase (do inglês, *Polymerase Chain Reaction* - PCR). Para cada reação foram utilizados água deionizada, tampão para reação de PCR (100 mM Tris-HCl, pH 8,3 a 25 °C; KCl 500 mM; 0,01% de gelatina), 0,2 mM de desoxinucleotídeos trifosfatos (dNTP), 1 µM de cada oligonucleotídeo (reverse e forward) (tabela 2), 1 U de Taq DNA polimerase e DNA previamente extraído, totalizando um volume final de 30 µL. As reações foram realizadas a partir da seguinte programação: desnaturação inicial de 1 minuto a 94 °C, seguido por 30 ciclos de desnaturação a 92 °C por 1 minuto, de anelamento por 1 minuto com temperatura específica para cada oligonucleotídeo (Tabela 2) e de extensão a 72 °C por 1 minuto.

Os fragmentos amplificados foram separados por meio de eletroforese em gel de agarose (1%) preparado em tampão TAE (Tris-acetato-EDTA) 1X pH 8,2 e os fragmentos amplificados (amplicons) foram corados com brometo de etídio e visualizados por meio de luz UV em transiluminador. A visualização de um amplicon de tamanho esperado foi considerado resultado positivo para a presença do gene.

Os oligonucleotídeos utilizados para detecção de genes de carbapenemase estão listados na tabela 2. Para a detecção do gene *bla_{IMP}* foi utilizado reações do tipo multiplex com dois oligonucleotídeos *forward* com o objetivo de aumentar o espectro de alelos.

Os controles positivos das reações foram a cepa de *K. pneumoniae* IOC 4955 (*bla_{KPC}*), *K. pneumoniae* cepa 13.4 (Nossa coleção) (*bla_{NDM}*), *K. pneumoniae* CCBH9976 (*bla_{OXA-48}*), *K. pneumoniae* BR01 (*bla_{IMP}*), *P. aeruginosa* CCBH11808 (*bla_{VIM}*). Para controle negativo foi utilizada um tubo com apenas os reagentes de amplificação sem a presença de nenhuma fonte de DNA.

Tabela 2 – Sequência de oligonucleotídeos e fragmentos esperados utilizados para a detecção de genes de carbapenemase.

Gene	Sequência dos oligonucleotídeos (5' - 3')	Alelos detectados	Fragmento esperado (pb)	Temperatura de anelamento (°C)
KPC	TGTCACTGTATCGCCGTC CTCAGTGCTCTACAGAAAACC	KPC-1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13	1011	58
NDM	GGTTTGGCGATCTGGTTTTTC GGCCTTGCTGTCCTTGATC	NDM-1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8.	621	58
IMP	CATTTCCATAGCGACAGCAC AACACGGTTTGGTGGTTCTT GGACTTTGGCCAAGCTTCTA	IMP-1, 2, 5, 8, 13, 14, 14a, 19, 20, 24, 33, 37	339/440	55
VIM	GATGGTGTTTGGTCGCATATC CTCGATGAGAGTCCTTCTAGAG	VIM-1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 23, 24, 25, 27, 28, 31, 33, 34	332	55
OXA	GCGTGGTTAAGGATGAACAC ATCATCAAGTTCAACCCAACC	OXA-48, 54, 181, 162,163,199	440	56

Fonte: Faria-Junior (2014).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O Hospital de Apoio de Brasília – HAB/DF é um hospital de alta complexidade e nível quaternário. Realiza atendimentos em Unidade Ambulatorial que conta com cuidados paliativos oncológicos, reabilitação adulto e infantil, é centro de referência em doenças neuromusculares e genética que possui triagem neonatal (teste do pezinho), atendimento para doenças raras de origem genética, genética clínica e oncogenética. A Unidade de Internação conta com três alas: A, B e C. A ala A realiza atendimentos de cuidados paliativos oncológicos de pacientes diagnosticados com neoplasia maligna com idade igual e superior a 18 anos, a ala B efetua reabilitação física de pacientes acima de 16 anos com quadro clínico estável e de pacientes neurológicos (com sequelas, lesões, doenças neurológicas degenerativas e neuropatias), a ala C é a de cuidados paliativos geriátricos, atende pacientes acima dos 60 anos de idade com demência grave.

As amostras de água foram coletadas dos seguintes locais: esgotos da Central de Materiais Esterilizados (CME) (n=3), cozinha (n=3), lavanderia (n=3), água do banho das alas A (n=3), ala B (n=3), ala C (n=3), administração geral (n=1), necrotério (n=1); água da descontaminação do chão das ala A (n=2), ala B (n=2) e ala C (n=2), caixa de gordura da cozinha (n=1) e água do CME pós esterilização (n=1).

A tabela 3 apresenta a positividade das culturas resistentes em relação aos locais cuja amostra de água foi coletada. Vinte e oito amostras de água foram analisadas e destas, dezoito amostras produziram culturas resistentes (64,3%). Observou-se que todas as amostras da cozinha, CME e da água do banho da Ala C obtiveram culturas positivas, com exceção da amostra de água do CME após esterilização dos materiais. Notou-se também que a água da descontaminação da ala C não possuiu nenhuma cultura positiva dentre as duas coletas realizadas. Também não possuíram culturas positivas a amostra da caixa de gordura da cozinha e amostra do CME após a esterilização dos materiais. Entre os locais que positivaram pelo menos uma vez, a água do esgoto da lavanderia foi a que possuiu menor número de amostras positivas (1/3).

Tabela 3 – Positividade das culturas resistentes a carbapenem por local.

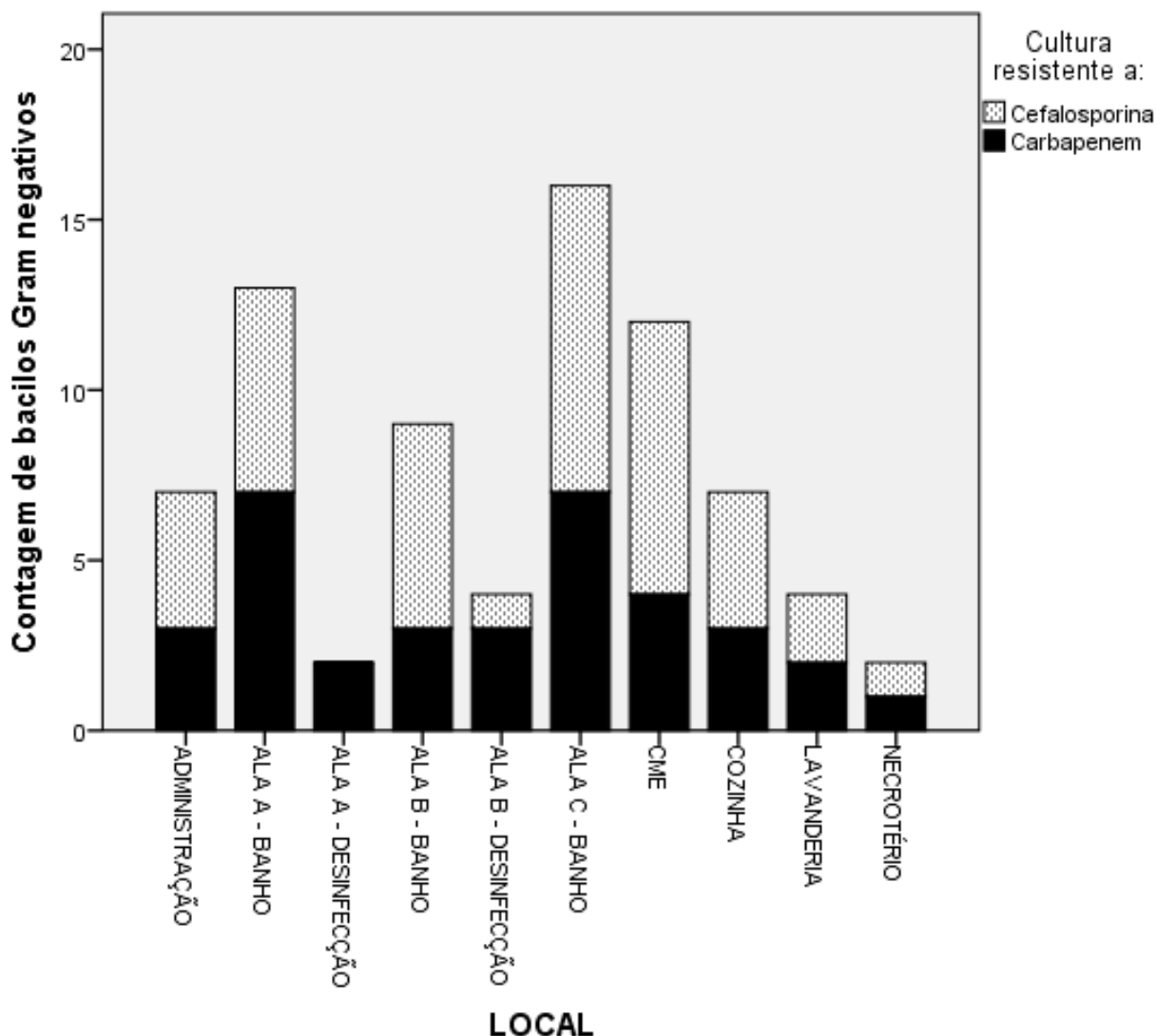
Local	Nº de amostras coletadas	Cultura resistente a carbapenem Nº (%)
Administração Geral	1	1 (100)
Necrotério	1	1 (100)
Caixa de gordura da cozinha	1	0 (0)
CME pós esterilização	1	0 (0)
CME	3	3 (100)
Cozinha	3	3 (100)
Lavanderia	3	1 (33,3)
Banho das Alas	-	-
Ala A	3	2 (66,7)
Ala B	3	2 (66,7)
Ala C	3	3 (100)
Descontaminação das Alas	-	-
Ala A	2	1 (50)
Ala B	2	1 (50)
Ala C	2	0 (0)

Setenta e seis BGN foram isolados dentre as culturas positivas (Gráfico 1). Desses, 16 isolados pertenciam a água de banho da ala C (21%), 13 foram isolados da água de banho da ala A (17,1%), 12 isolados pertenciam ao CME (15,8%), 9 isolados estavam na Ala B (11,8%), 7 isolados eram da cozinha (9,2%), 7 isolados da administração (9,2%), 4 foram isolados da água de descontaminação da Ala B (5,3%), 4 isolados da lavanderia (5,3%), 2 isolados foram isolados da água de descontaminação da ala A (2,6%) e 2 isolados do necrotério (2,6%).

Percebe-se uma grande quantidade de isolados resistentes pertencentes às alas C e A, que são alas de cuidados paliativos. Esta circunstância pode ser justificada em consequência as altas taxas de infecções e uso de antibióticos em pacientes que estão no cuidado ao fim de vida. Em uma revisão de literatura realizada por Nagy-Agren & Haley (2002) observou-se através dos estudos que infecções ocorriam frequentemente em pacientes em cuidado

paliativo, principalmente oncológico, e nos artigos analisados, cerca de 60-72% dos pacientes com suspeita de infecção eram tratados com antibióticos. Também foi percebido que os profissionais realizavam antibioticoterapia empírica constantemente.

Gráfico 1 – Distribuição dos isolados bacterianos resistentes a ceftriaxona e carbapenem por local e por cultura de origem.



Quanto às espécies bacterianas mais frequentemente detectadas estas são apresentadas na tabela 4, as cores indicam a frequência de isolamento sendo amarelo para 1 isolado, laranja para 2 isolados e vermelho para 3 ou mais isolados. 19,7% consistiam em cepas de *Pseudomonas aeruginosa* (n=15), seguida de *Pseudomonas putida* (n=10; 13,1%), *Klebsiella pneumoniae* (n=9; 11,8%), *Citrobacter freundii* (n=8; 10,5%) e *Stenotrophomonas maltophilia*

(n=8; 10,5%). Nota-se que não existe predominância entre cepas hospitalares e/ou ambientais na amostra, esta ocorrência é esperada visto que águas residuais em ambiente hospitalar corresponde a um ambiente híbrido, um intermediário entre o hospital e o ambiente. A ocorrência frequente de isolados das famílias das *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonadaceae* em águas residuais de hospital é similar a encontrada na literatura. No ano de 2009 em Goiânia, os isolados de esgoto hospitalar consistiam em 45,5% de *K. pneumoniae*, 13,6% de *P. aeruginosa* e 4,5% de *A. baumannii*. Em contrapartida, neste mesmo estudo a segunda espécie mais isolada foi a de *E. coli* (36,4%) enquanto nos nossos achados esta espécie estava em apenas 2,6% (RESENDE et al., 2009). Em outro trabalho em 2014 na Etiópia, dos 65 isolados de água residual de ambiente hospitalar, 29,2% eram de *Klebsiella spp.*, sendo a maioria por *K. pneumoniae*, seguida por 21,5% *P. aeruginosa* e 12,3% de *E. coli* (MORGES et al., 2014). Já em outro estudo no Rio de Janeiro, das 221 amostras de Gram negativo recuperadas de água de resíduo hospitalar, 90 isolados pertenciam a espécie *K. pneumoniae*, 35 eram *E. coli* e 32 *Enterobacter cloacae* representando 14,5% dos isolados (CHAGAS et al., 2011b).

O gênero predominante encontrado no hospital foi *Pseudomonas* com 25 isolados (33%). Cepas de *Pseudomonas aeruginosa* são oportunistas e são causa frequente de infecções e surtos hospitalares, muitas vezes carregam consigo diversos genes de resistência a antibióticos e, portanto, causam infecções difíceis de tratar. Por outro lado, infecções por *Pseudomonas putida* são mais raras e normalmente acometem indivíduos com imunidade comprometida e por este motivo amostras clínicas são habitualmente isoladas de pacientes internados (ALMUZARA et al., 2007; FERNÁNDEZ et al., 2015; MOLINA et al., 2014).

Tabela 4 – Perfil de espécies bacterianas resistentes a ceftriaxona e carbapenem isoladas no Hospital de Apoio de Brasília – HAB/DF.

Espécies bacterianas	LOCAL										Total (%)
	ADM	Ala A - Banho	Ala A – Desinf ¹	Ala B - Banho	Ala B – Desinf ¹	Ala C - Banho	CME	Cozinha	Lavanderia	Necrotério	
<i>Achromobacter xylosoxidans/denitrificans</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1 (1,3)
<i>Acinetobacter baumannii complex</i>	0	0	0	2	0	1	0	0	0	0	3 (3,9)
<i>Aeromonas hydrophilia/punctata (caviae)</i>	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	3 (3,9)
<i>Aeromonas veronii/hydrophilia/punctata (caviae)</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1 (1,3)
<i>Alcaligenes faecalis ssp faecalis</i>	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	2 (2,6)
<i>Arcobacter butzleri</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1 (1,3)
<i>Burkholderia cenocepacia</i>	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	2 (2,6)
<i>Citrobacter freundii</i>	1	3	0	2	0	1	1	0	0	0	8 (10,5)
<i>Citrobacter werkmanii</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1 (1,3)
<i>Enterobacter asburiae/cloacae</i>	0	0	0	0	3	0	2	0	0	0	5 (6,6)
<i>Enterobacter kobei</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1 (1,3)
<i>Escherichia coli</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	2 (2,6)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	2	0	0	0	4	2	0	0	0	9 (11,8)
<i>Morganella morganii</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1 (1,3)
<i>Providencia stuartii</i>	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	2 (2,6)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	2	0	3	1	5	2	0	0	0	15 (19,7)
<i>Pseudomonas putida</i>	0	0	1	0	0	1	4	2	0	2	10 (13,1)
<i>Raoultella ornithinolytica/planticola</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1 (1,3)
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0	0	1	0	0	2	1	2	2	0	8 (10,5)
Total	7	13	2	9	4	16	12	7	4	2	76 (100)

¹ – Desinfecção.

Foram encontrados na água da desinfecção do chão cepas de *Pseudomonas putida*, *P. aeruginosa*, *Enterobacter asburie/cloacae* e *Stenotrophomonas maltophilia*, além de uma cepa de *Achromobacter xylosoxidans/denitrificans* e uma de *Escherichia coli* na lavanderia. A presença de bactérias, principalmente na água da lavagem de chão, pode indicar relacionados aos produtos de limpeza utilizados. Encontramos na literatura registros de artigos que indicam que enzimas que quebram o desinfetante triclosan foram identificadas em *P. aeruginosa*, *P. putida*, *A. xylosoxidans* (MEADE; WADDELL; CALLAHAN, 2001; ZHU et al., 2009). Além de cepas de *P. aeruginosa*, *P. putida*, *Stenotrophomonas spp.* e *Achromobacter spp.* serem capazes de romper enzimaticamente o desinfetante amônio quaternário (TEZEL; PAVLOSTATHIS, 2015). Cepas *E. coli* também já foram descritas como resistentes ao desinfetante triclosan (MCMURRY; OETHINGER; LEVY, 1998). Supreendentemente, não foram encontrados artigos de *Enterobacter spp.* resistentes a desinfetantes.

Em um experimento recente, cepas ambientais de *A. xylosoxidans* foram capazes de sobreviver 6 meses em água destilada e após este período, algumas ainda sobreviveram 30 minutos em uma solução de 0,2% de clorexidina. Mesmo não observado curva de crescimento após 30 minutos, percebe-se adaptabilidade da espécie a meios extremos e isto reforça a importância do uso correto de antissépticos e desinfetantes por profissionais de saúde com o objetivo de minimizar riscos de infecções (MARION-SANCHEZ, et al., 2019).

Dos genes pesquisados, foram detectados *bla_{KPC}* e *bla_{NDM}*. Dentre os 76 isolados, 23 (30,3%) portavam pelo menos um gene *bla*, enquanto 25% apresentaram resultados excludentes para *bla_{KPC}* (17,1%) e *bla_{NDM}* (7,9%). 4 cepas (5,3%) carregavam ambos os genes simultaneamente. Não foram detectados isolados positivos para os genes *bla_{OXA-48}*, *bla_{VIM}* e *bla_{IMP}*.

Dados similares de *bla_{NDM}* foram encontrados em um estudo realizado em Israel em 2016. Das cepas isoladas de esgoto hospitalar, 11% portavam o gene *bla_{NDM}*. No entanto, neste mesmo estudo *bla_{KPC}* foi detectado em 78%

das amostras, dado este diferente do encontrado em nosso estudo (MEIR-GRUBER et al., 2016).

Quanto à distribuição por local dos isolados portando genes para cabapenemase, da água do banho da ala C foram isolados 9 cepas, 6 isolados pertenciam ao banho da ala A, 4 foram isolados da água de desinfecção da ala B, 3 isolados do CME e apenas 1 isolado do esgoto da administração. Dos 9 isolados do banho da ala C, 6 cepas portavam *bla_{KPC}*, 3 cepas portavam *bla_{NDM}* enquanto que 3 cepas portavam concomitantemente *bla_{KPC}* e *bla_{NDM}*. Dos 6 isolados do banho da ala A, 4 portavam *bla_{KPC}* e *bla_{NDM}*, já na água de desinfecção da ala B os 4 genes encontrados eram *bla_{NDM}* enquanto que no CME foram isolados 3 cepas positivas para *bla_{KPC}* e na administração do hospital a única cepa positiva para gene *bla* portava de forma simultânea *bla_{KPC}* e *bla_{NDM}* (Tabela 5).

Tabela 5 – Positividade de bacilos Gram negativos portando genes *bla* por local no Hospital de Apoio de Brasília – HAB/DF.

LOCAL					
Cepas portando genes <i>bla</i>	CME Nº (%)	Ala A – Banho Nº (%)	Ala C - Banho Nº (%)	Ala B - Desinfecção Nº (%)	Administração Nº (%)
<i>bla_{KPC}</i>	3 (3,9)	4 (5,3)	9 (11,8)	0 (0)	1 (1,3)
<i>bla_{NDM}</i>	0 (0)	2 (2,6)	3 (3,9)	4 (5,3)	1 (1,3)
Total	3 (3,9)	6 (7,9)	12 (15,7)	4 (5,3)	2 (2,6)

Em relação as espécies bacterianas detectadas o qual portavam genes *bla* (Tabela 6), *Pseudomonas aeruginosa* (n=8), *Klebsiella pneumoniae* (n=8) e *Enterobacter asburiae/cloacae* (n=3) foram as espécies com mais isolados. Em seguida, *Aeromonas hydrophilia/punctata (caviae)* (n=2), *Enterobacter kobei* (n=1) e *Pseudomonas putida* (n=1).

Tabela 6 – Distribuição de genes *bla* em bacilos Gram negativos isolados no Hospital de Apoio de Brasília – HAB/DF.

Espécies bacterianas	Carbapenemases			Positividade %
	<i>bla</i> _{KPC}	<i>bla</i> _{NDM}	<i>bla</i> _{KPC} + <i>bla</i> _{NDM}	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (n=15)	6	1	1	53,3 (8/15)
<i>Pseudomonas putida</i> (n=10)	1	0	0	10 (1/10)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (n=9)	3	2	3	88,8 (8/9)
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (n=8)	0	0	0	0
<i>Citrobacter freundii</i> (n=8)	0	0	0	0
<i>Enterobacter asburiae/cloacae</i> (n=5)	0	3	0	60% (3/5)
<i>Acinetobacter baumannii complex</i> (n=3)	0	0	0	0
<i>Aeromonas hydrophilia/punctata (caviae)</i> (n=4)	2	0	0	50% (2/4)
<i>Escherichia coli</i> (n=2)	0	0	0	0
<i>Providencia stuartii</i> (n=2)	0	0	0	0
<i>Alcaligenes faecalis ssp faecalis</i> (n=2)	0	0	0	0
<i>Burkholderia cenocepacia</i> (n=2)	0	0	0	0
<i>Morganella morganii</i> (n=1)	0	0	0	0
<i>Enterobacter kobei</i> (n=1)	1	0	0	100 (1/1)
<i>Citrobacter werkmanii</i> (n=1)	0	0	0	0
<i>Arcobacter butzleri</i> (n=1)	0	0	0	0
<i>Achromobacter xylosoxidans/denitrificans</i> (n=1)	0	0	0	0
<i>Raoultella ornithinolytica/planticola</i> (n=1)	0	0	0	0
Total (n=76)	13	6	4	30,2 (23/76)

K. pneumoniae é uma importante espécie de predomínio hospitalar sendo uma das maiores causas de surtos de infecções nosocomiais em todo o mundo, não é incomum encontrar em hospitais cepas multirresistentes (SIEVERT et al., 2013). Nos estudos encontrados que foram similares a este, sempre figurava entre as 3 espécies mais isoladas (CHAGAS et al., 2011b; (MORGES et al., 2014; RESENDE et al., 2009). Corroborando nosso resultado, isolados de *K. pneumoniae* portando *bla*_{KPC} já foram recuperados de água residual de hospital em outro estudo realizado no Brasil (CHAGAS et al., 2011a).

Dentre as espécies que mais carregavam o gene *bla*_{NDM}, 30% dos isolados pertenciam ao gênero *Enterobacter*. Dentre todas as espécies de seu gênero, o complexo *Enterobacter cloacae* é o mais relevante clinicamente devido ao aumento de seu isolamento em infecções hospitalares, este inclui as espécies *E. asburiae*, *E. cloacae* e *E. kobei* (PAAUW et al., 2008). Carbapenemases foram reportadas entre as espécies de *Enterobacter*, OXA-48, IMP, NDM-1 e VIM, além das carbapenemases cromossomais do tipo IMI e NMC-A já foram detectadas em *E. cloacae*. No entanto, entre *E. asburiae* e *E. kobei* são mais comuns cefalosporinases do tipo AmpC (MEZZATESTA; GONA; STEFANI, 2012). Outro dado interessante sobre o gênero surge de um estudo realizado por Woodford et al (2007) em que estes sugerem que a resistência ao ertapenem em *Enterobacter spp.* pode não ser mediada por carbapenemases e sim por uma combinação de cefalosporinase AmpC cromossomal juntamente com a redução de permeabilidade da membrana externa bacteriana. Neste estudo 5 cepas de *Enterobacter asburiae/cloacae* foram isoladas e destas 3 possuíam *bla*_{NDM}. Uma cepa de *Enterobacter kobei* foi isolada e esta carregava *bla*_{KPC}, até o momento, não foram encontrados artigos publicados que reportavam KPC em *E. kobei*.

Apesar de representar significativa parte dos isolados bacterianos (14,5%), nenhuma espécie de *Citrobacter* possuía os genes de resistência a carbapenem analisados. Conhecido por ser um patógeno oportunista em infecções hospitalares, não é incomum encontrar estudos da espécie *Citrobacter freundii* carregando diversos genes de resistência. Chen et al (2011) conduziram uma pesquisa para verificar a presença de carbapenemases em *C. freundii* resistentes a carbapenem, como resultado, as 23 cepas analisadas possuíam KPC-2, um isolado exibia 4 tipos de oxacilinases (OXA-69,-23,-51,-58), além disso, era comum cepas apresentarem genes de carbapenemases juntamente com genes de β -lactamases de espectro estendido. Por outro lado, não é comum relatos de *C. werkmanii* resistentes, normalmente quando relatados são resistência a aminoglicosídeos e quinolonas, sobre carbapenemases encontramos apenas um relato de uma cepa desta espécie portando NDM-1 de um isolado clínico na China (AN et al, 2016).

Espécies do gênero *Aeromonas* são muito comuns no ambiente, especialmente em ambientes aquáticos onde está extremamente presente em esgotos. Também são encontrados em diversos peixes, répteis e em humanos. São considerados patógenos emergentes e oportunistas, as espécies mais comuns de causarem infecções em humanos são *A. hydrophila*, *A. caviae* e *A. veronii*. Estudos identificaram a capacidade intrínseca das cepas de *Aeromonas* produzirem metallo- β -lactamases através de genes cromossomais como as enzimas *cphA* e *imiS* capazes de hidrolisar carbapenêmicos. Estas enzimas não são comumente expressas mas podem ser induzidas através de pressão seletiva por antimicrobianos (MURATA et al., 2016; TALAVERA et al., 2006). Em nosso estudo, 4 cepas de *Aeromonas* foram isoladas, e destas, 2 carregavam *bla*_{KPC}. Similar ao nosso estudo, Sekizuka et al (2019) recuperaram 2 cepas de *Aeromonas* (*A. hydrophila* e *A. caviae*) em um efluente de uma estação de tratamento de esgoto na Baía Tóquio, no Japão sugerindo que cepas de *Aeromonas* KPC-resistentes podem desempenhar papel importante como reservatórios de resistência microbiana ambiental. Apesar de poucos serem os relatos de espécies de *Aeromonas* produtoras de KPC em água residual, este não é o primeiro relato no Brasil, em um estudo realizado por Montezzi et al (2015), foi isolado na praia de Botafogo (Rio de Janeiro) uma cepa de *Aeromonas* sp. albergando múltipla resistência a antimicrobianos incluindo *bla*_{KPC-2}. Estes resultados reforçam o potencial de disseminação de resistência microbiana em ambiente aquático.

6. CONCLUSÃO

- Foram detectados os genes *bla*_{KPC} e *bla*_{NDM}. Não foram detectados *bla*_{OXA}, *bla*_{VIM} e *bla*_{IMP}.
- Água residual de atividades hospitalares é reservatório para BGN portadores de *bla*_{KPC} e *bla*_{NDM}.
- Água residual de banho de pacientes revelou-se uma importante fonte para dispersão de BGN portadores de *bla*_{KPC} e *bla*_{NDM}.
- A espécie mais frequentemente isolada foi *Pseudomonas aeruginosa*.
- *Klebsiella pneumoniae* foi a espécie isolada que mais portava genes de resistência aos carbapenêmicos.
- Medidas que visem o controle da dispersão de resistência bacteriana em ambiente nosocomial devem incluir ações para manejo adequado da água residual.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED-BENTLEY, J. et al. Gram-Negative Bacteria That Produce Carbapenemases Causing Death Attributed to Recent Foreign Hospitalization. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, [s.l.], v. 57, n. 7, p.3085-3091, 22 abr. 2013.

ALMUZARA, M., et al. VIM-2–producing *Pseudomonas putida*, Buenos Aires. **Emerging Infectious Diseases**, [s.l.], v. 13, n. 4, p.668-669, abr. 2007. Centers for Disease Control and Prevention (CDC).

AMBLER, R. P. The Structure of β -Lactamases. **Philosophical Transactions Of The Royal Society B: Biological Sciences**, [s.l.], v. 289, n. 1036, p.321-331, 16 maio 1980.

AN, J. et al. NDM-producing Enterobacteriaceae in a Chinese hospital, 2014–2015: identification of NDM-producing *Citrobacter werkmanii* and acquisition of blaNDM-1-carrying plasmid in vivo in a clinical *Escherichia coli* isolate. **Journal Of Medical Microbiology**, [s.l.], v. 65, n. 11, p.1253-1259, 16 nov. 2016. Microbiology Society.

ARAUJO, C. F. M. et al. Detection of Carbapenemase Genes in Aquatic Environments in Rio de Janeiro, Brazil. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, [s.l.], v. 60, n. 7, p.4380-4383, 2 maio 2016.

BRASIL. 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**. GVIMS/GGTES/ANVISA, dez. 2017.

BRAUN, E. et al. Predominance of Gram-negative bacilli among patients with catheter-related bloodstream infections. **Clinical Microbiology And Infection**, [s.l.], v. 20, n. 10, p.627-629, out. 2014.

BUEHRLE, D. J. et al. Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia: risk factors for mortality and microbiologic treatment failure. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s.l.], v. 61, n. 1, p.1-7, jan. 2017.

BUSH, K.; FISHER, J. F. Epidemiological Expansion, Structural Studies, and Clinical Challenges of New β -Lactamases from Gram-Negative Bacteria. **Annual Review Of Microbiology**, [s.l.], v. 65, n. 1, p.455-478, 13 out. 2011.

BUSH, K.; JACOBY, G. A.. Updated Functional Classification of β -Lactamases. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, [s.l.], v. 54, n. 3, p.969-976, 7 dez. 2010. American Society for Microbiology.

CHAGAS, T. P. G. et al. Multiresistance, beta-lactamase-encoding genes and bacterial diversity in hospital wastewater in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal Of Applied Microbiology**, [s.l.], v. 111, n. 3, p.572-581, 4 jul. 2011b.

CHAGAS, T. P. G. et al. Occurrence of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in hospital wastewater. **Journal Of Hospital Infection**, [s.l.], v. 77, n. 3, p.281, mar. 2011.

CHEN, S., et al. Detection and spread of carbapenem-resistant *Citrobacter freundii* in a teaching hospital in China. **American Journal Of Infection Control**, [s.l.], v. 39, n. 9, p.55-60, nov. 2011. Elsevier BV.

CODJOE, F.; DONKOR, E. Carbapenem Resistance: A Review. **Medical Sciences**, [s.l.], v. 6, n. 1, p.1-28, 21 dez. 2017.

DAOUD, Z.; et al. Multidrug-Resistant Enterobacteriaceae in Lebanese Hospital Wastewater: Implication in the One Health Concept. **Microbial Drug Resistance**, [s.l.], v. 24, n. 2, p.166-174, mar. 2018.

DAVOODI, S. et al. Detection of VIM- and IMP-type Metallo-Beta-Lactamase Genes in *Acinetobacter baumannii* Isolates from Patients in Two Hospitals in Tehran. **Iran Journal of Biotechnology**, [s.l.], v. 13, n. 1, p. 63-67, 12 março 2015.

FARIA JUNIOR, C. de. Caracterização de cepas de *Enterobacteriaceae* resistentes a carbapenens isoladas no Distrito Federal. 2014. 87 f., il. Dissertação (Mestrado em Biologia Microbiana)—Universidade de Brasília, Brasília, 2014.

FERNÁNDEZ, M., et al. Analysis of the pathogenic potential of nosocomial *Pseudomonas putida* strains. **Frontiers In Microbiology**, [s.l.], v. 6, p.1-11, 25 ago. 2015. Frontiers Media SA.

KHAN, A. U.; MARYAM, L.; ZARRILLI, R. Structure, Genetics and Worldwide Spread of New Delhi Metallo- β -lactamase (NDM): a threat to public health. **Bmc Microbiology**, [s.l.], v. 17, n. 1, p.1-12, 27 abr. 2017.

KIM, Y. A.; PARK, Y. S. Epidemiology and treatment of antimicrobial-resistant gram-negative bacteria in Korea. **The Korean Journal Of Internal Medicine**, [s.l.], v. 33, n. 2, p.247-255, 1 mar. 2018.

LE, T. H.; et al. Occurrences and Characterization of Antibiotic-Resistant Bacteria and Genetic Determinants of Hospital Wastewater in a Tropical Country. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, [s.l.], v. 60, n. 12, p.7449-7456, 21 nov. 2016.

LIVERMORE, D. M.; WOODFORD, N. The β -lactamase threat in Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. **Trends In Microbiology**, [s.l.], v. 14, n. 9, p.413-420, set. 2006. Elsevier BV.

MARION-SANCHEZ, K., et al. *Achromobacter xylosoxidans* resistance to antiseptics and disinfectants is far from obvious. **Transactions Of The Royal Society Of Tropical Medicine And Hygiene**, [s.l.], p.1-3, 20 mar. 2019. Oxford University Press (OUP).

MCMURRY, L. M.; OETHINGER, M.; LEVY, S. B.. Triclosan targets lipid synthesis. **Nature**, [s.l.], v. 394, n. 6693, p.531-532, ago. 1998. Springer Nature.

MEADE, M. J.; WADDELL, R. L.; CALLAHAN, T. M. Soil bacteria *Pseudomonas putida* and *Alcaligenes xylosoxidans* subsp. *denitrificans* inactivate triclosan in liquid and solid substrates. **Fems Microbiology Letters**, [s.l.], v. 204, n. 1, p.45-48, out. 2001. Oxford University Press (OUP).

MEIR-GRUBER, L. et al. Population Screening Using Sewage Reveals Pan-Resistant Bacteria in Hospital and Community Samples. **Plos One**, [s.l.], v. 11, n. 10, p.1-13, 25 out. 2016. Public Library of Science (PLoS).

MELETIS, G. Carbapenem resistance: overview of the problem and future perspectives. **Therapeutic Advances In Infectious Disease**, [s.l.], v. 3, n. 1, p.15-21, 10 dez. 2016.

MELETIS, G. Carbapenem resistance: overview of the problem and future perspectives. **Therapeutic Advances In Infectious Disease**, [s.l.], v. 3, n. 1, p.15-21, fev. 2016.

MELETIS, G.; BAGKERI, M. Beta-lactamase and Carbapenemase Detection Methods: An Overview of Recent Patents. **Recent Patents On Anti-infective Drug Discovery**, [s.l.], v. 9, n. 1, p.1-5, 16 set. 2014.

MEZZATESTA, M. L.; GONA, F.; STEFANI, S. Enterobacter cloacae complex: clinical impact and emerging antibiotic resistance. **Future Microbiology**, [s.l.], v. 7, n. 7, p.887-902, jul. 2012. Future Medicine Ltd.

MOGES, F. 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**, [s.l.], v. 7, n. 1, p.215-220, 2014.

MOLINA, L., et al. Antibiotic Resistance Determinants in a Pseudomonas putida Strain Isolated from a Hospital. **Plos One**, [s.l.], v. 9, n. 1, p.1-11, 17 jan. 2014. Public Library of Science (PLoS).

MONTEZZI, L. F., et al. Occurrence of carbapenemase-producing bacteria in coastal recreational waters. **International Journal Of Antimicrobial Agents**, [s.l.], v. 45, n. 2, p.174-177, fev. 2015. Elsevier BV.

MURATA, M., et al. The Rapid Induction of Carbapenem-Resistance in an Aeromonas dhakensis Blood Isolate. **Japanese Journal Of Infectious Diseases**, [s.l.], v. 69, n. 5, p.439-441, 2016. Editorial Committee of Japanese Journal of Infectious Diseases, National Institute of Infectious Dis.

NAGY-AGREN, S.; HALEY, H. B. Management of Infections in Palliative Care Patients with Advanced Cancer. **Journal Of Pain And Symptom Management**, [s.l.], v. 24, n. 1, p.64-70, jul. 2002. Elsevier BV.

NASRI, E.; et al. Abundance of carbapenemase genes (blaKPC, blaNDM and blaOXA-48) in wastewater effluents from Tunisian hospitals. **Environmental Pollution**, [s.l.], v. 229, p.371-374, out. 2017.

NORDMANN, P.; DORTET, L.; POIREL, L. Carbapenem resistance in Enterobacteriaceae: here is the storm!. **Trends In Molecular Medicine**, [s.l.], v. 18, n. 5, p.263-272, maio 2012.

PAAUW, Armand et al. Genomic Diversity within the Enterobacter cloacae Complex. **Plos One**, [s.l.], v. 3, n. 8, p.1-11, 21 ago. 2008. Public Library of Science (PLoS).

PAPP-WALLACE, K. M.; et al. Carbapenems: Past, Present, and Future. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, [s.l.], v. 55, n. 11, p.4943-4960, 22 ago. 2011.

PICÃO, R. C. et al. 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**, [s.l.], v. 76, n. 1, p.80-85, maio 2013.

POIREL, L.; POTRON, A.; NORDMANN, P.. OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. **Journal Of Antimicrobial Chemotherapy**, [s.l.], v. 67, n. 7, p.1597-1606, 11 abr. 2012.

PROCOP, G. W.; et al. **Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology**. 7^a ed. North American: LWW, 2016.

QUEENAN, A. M.; BUSH, K. Carbapenemases: the Versatile β -Lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, [s.l.], v. 20, n. 3, p.440-458, 1 jul. 2007.

RAGHUNATH, D. New metallo β -lactamase NDM-1. **Indian Journal of Medical Research**, [s.l.], v. 132, n. 5, p. 478-481, nov. 2010.

RESENDE, A.C.B.; SOARES, R. B. A.; DOS SANTOS D. B.; MONTALVÃO, E.R.; DO CARMO FILHO, J.R. Detection of antimicrobial-resistant Gram-negative bacteria in hospital effluents and in the sewage treatment station of Goiânia Brazil. **O Mundo da Saúde**, [s.l.], v. 33, n. 4, p.385-391, 2009.

SEKIZUKA, T., et al. Potential KPC-2 carbapenemase reservoir of environmental *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas caviae* isolates from the effluent of an urban wastewater treatment plant in Japan. **Environmental Microbiology Reports**, [s.l.], 20 maio 2019.

SIEVERT, D. M. et al. Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated with Healthcare-Associated Infections Summary of Data Reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2009–2010. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, [s.l.], v. 34, n. 1, p.1-14, jan. 2013.

TALAVERA, B. M. M., et al. Susceptibilities to carbapenems and presence of *cphA* gene on food-borne *Aeromonas*. **Brazilian Archives Of Biology And Technology**, [s.l.], v. 49, n. 4, p.677-682, jul. 2006. FapUNIFESP (SciELO).

TEZEL, U.; PAVLOSTATHIS, S. G. Quaternary ammonium disinfectants: microbial adaptation, degradation and ecology. **Current Opinion In Biotechnology**, [s.l.], v. 33, p.296-304, jun. 2015. Elsevier BV.

VINCENT, J. L. International Study of the Prevalence and Outcomes of Infection in Intensive Care Units. **JAMA**, [s.l.], v. 302, n. 21, p.2323-2329, 2 dez. 2009.

VISHWANATH, S.; MUNIM, F.; CHAWLA, K. Nonfermenting gram-negative bacilli other than *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. causing respiratory tract infections in a tertiary care center. **Journal Of Global Infectious Diseases**, [s.l.], v. 5, n. 4, p.144-148, 2013.

WOODFORD, N., et al. Ertapenem resistance among *Klebsiella* and *Enterobacter* submitted in the UK to a reference laboratory. **International Journal Of Antimicrobial Agents**, [s.l.], v. 29, n. 4, p.456-459, abr. 2007.

YANG, F. et al. Prevalence and Fate of Carbapenemase Genes in a Wastewater Treatment Plant in Northern China. **Plos One**, [s.l.], v. 11, n. 5, p.1-14, 26 maio 2016.

YONG, D. et al. Characterization of a New Metallo- β -Lactamase Gene, bla_{NDM-1}, and a Novel Erythromycin Esterase Gene Carried on a Unique

Genetic Structure in *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 14 from India. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, [s.l.], v. 53, n. 12, p.5046-5054, 21 set. 2009.

ZHANG, X.; LÜ, X.; ZONG, Z. Enterobacteriaceae producing the KPC-2 carbapenemase from hospital sewage. **Diagnostic Microbiology And Infectious Disease**, [s.l.], v. 73, n. 2, p.204-206, jun. 2012.

ZHU, L. et al. Triclosan Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Is Due to FabV, a Triclosan-Resistant Enoyl-Acyl Carrier Protein Reductase. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, [s.l.], v. 54, n. 2, p.689-698, 23 nov. 2009. American Society for Microbiology.

ZURFLUH, K.; et al. Wastewater is a reservoir for clinically relevant carbapenemase- and 16s rRNA methylase-producing Enterobacteriaceae. **International Journal Of Antimicrobial Agents**, [s.l.], v. 50, n. 3, p.436-440, set. 2017.