



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA - FACULDADE DE CEILÂNDIA
CURSO DE FARMÁCIA

Lorrane de Lima Antunes

**Detecção de genes para carbapenemase em isolados de *Aeromonas spp.*
recuperados de amostras de esgoto no Distrito Federal.**

BRASÍLIA, 2019

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

dD353d de Lima Antunes, Lorrane
Detecção de genes para carbapenemase em isolados de
Aeromonas spp. recuperados de amostras de esgoto no
Distrito Federal. / Lorrane de Lima Antunes; orientador
Alex Leite Pereira. -- Brasília, 2019.
33 p.

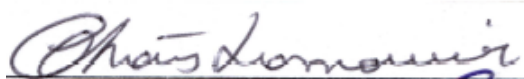
Monografia (Graduação - Farmácia) -- Universidade de
Brasília, 2019.

1. Aeromonas spp.. 2. Carbapenemase. 3. Rede de esgoto.
I. Leite Pereira, Alex, orient. II. Título.

Lorrane de Lima Antunes

**Detecção de genes para carbapenemase em isolados de *Aeromonas spp.*
recuperados de amostras de esgoto no Distrito Federal.**

BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Thaís Alves da Costa Lamounier
UnB – FCE



Mestranda Erika da Silva Monteiro
UnB – FCE



Orientador (a): Alex Leite Pereira
UnB – FCE



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA - FACULDADE DE CEILÂNDIA
CURSO DE FARMÁCIA

Lorrane de Lima Antunes

**Detecção de genes para carbapenemase em isolados de *Aeromonas spp.*
recuperados de amostras de esgoto no Distrito Federal.**

Monografia de Conclusão de Curso
apresentada como requisito parcial para
obtenção do grau de Farmacêutico,
Faculdade de Ceilândia, Universidade de
Brasília,

Orientador: Prof. Dr. Alex Leite Pereira

BRASÍLIA, 2019

DEDICATÓRIA

Aos meus falecidos e amados avós, Antônio Antunes da Silva e Sebastiana Ferreira de Souza.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por toda sabedoria concedida para enfrentar todos os obstáculos durante essa jornada. Agradeço a minha família que me apoiou e entendeu os momentos em que estive ausente, aos meus amigos que tornaram a graduação mais leve e feliz, ao motorista do 107 que errou a rota do ônibus e impediu que eu me atrasasse para a 3ª etapa do PAS, a professora Dra. Izabel Cristina que me ajudou muito nesses últimos semestres, ao meu orientador professor Dr. Alex Leite Pereira e por fim, mas não menos importante ao meu namorado e amigo Lucas Oliveira F. do Nascimento que esteve ao meu lado em todos os momentos, obrigada por toda ajuda, carinho e paciência.

EPÍGRAFE

"E" e "Se" são duas palavras simples e inofensivas como qualquer outra palavra. Mas, quando juntas, "e se..." podem causar estragos inimagináveis.

- Claire Wyman

SUMÁRIO

Resumo	06
Abstract	07
Lista de abreviaturas	08
Lista de tabelas	10
Lista de imagens	11
Lista de gráficos	12
1. Introdução	13
2. Revisão de literatura	14
2.1. Aeromonas spp.	14
2.2. Rede de esgoto e disseminação de contaminação	16
2.3. Beta-lactâmicos	17
2.4. Resistências a carbapenens	18
3. Justificativa	20
4. Objetivos	20
4.1. Objetivo geral	20
4.2. Objetivos específicos	20
5. Metodologia	21
5.1. Amostragem	21
5.2. Identificação	22
5.3. Extração de DNA	23

5.4. PCR e Eletroforese	23
5.5. Análise estatística	24
6. Resultados e Discussão	24
7. Conclusão	26
8. Referências bibliográficas	26

RESUMO

INTRODUÇÃO: *Aeromonas spp.* são bacilos Gram negativos (BGN) ubíquos em ambientes aquáticos naturais. Surtos comunitários de gastroenterites têm sido reportados com o envolvimento de *A. caviae* e *A. sobria* inclusive no Brasil. A resistência a carbapenem produzida pela presença dos genes *bla_{KPC}* e *bla_{NDM}* em *Aeromonas spp.* tem sido esporadicamente relatada. O transposon *Tn4401* é o elemento genético móvel que sustenta a dispersão de *bla_{KPC}*. **METODOLOGIA:** As amostras (n = 290) foram coletadas do esgoto bruto (n = 75), de efluente de esgoto tratado (n = 75), de jusante (n = 74) e montante (n = 66). A identificação bacteriana e perfil de susceptibilidade dos isolados bacterianos foram realizados no LACEN- DF. A detecção molecular de genes *bla* foi feita por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR – Polymerase Chain Reaction) seguida do processo de eletroforese. **RESULTADO:** Das amostras de água (n = 140) e esgoto (n = 150), foram isoladas 24 cepas *Aeromonas spp.* O único gene de carbapenemase detectado foi o *bla_{KPC}* em cerca de 54% dos isolados. O *Tn4401* foi detectado em 100% das cepas positivas para *bla_{KPC}* testadas. **DISCUSSÃO/CONCLUSÃO:** Há a presença de isolados ambientais de *Aeromonas spp.* resistentes a carbapenem portam gene *bla_{KPC}* mobilizado por *Tn4401*. Uma possível causa da presença de *Aeromonas spp.* resistentes a carbapenem em amostras ambientais é o manejo inadequado do esgoto hospitalar pelo sistema de tratamento de esgoto doméstico.

Palavras-chave: *Aeromonas spp.*, carbapenemase, rede de esgoto

ABSTRACT

INTRODUCTION: *Aeromonas spp.* are ubiquitous Gram negative bacilli (BGN) in natural aquatic environments. Community outbreaks of gastroenteritis have been reported with the involvement of *A. caviae* and *A. sobria* even in Brazil. Carbapenem resistance produced by the presence of *bla*_{KPC} and *bla*_{NDM} genes in *Aeromonas spp.* has been sporadically reported. The transposon *Tn4401* is the mobile genetic element that supports the dispersion of *bla*_{KPC}. **METHODOLOGY:** Samples (n = 290) were collected from raw sewage (n = 75), treated sewage effluent (n = 75), downstream (n = 74) and upstream (n = 66). Bacterial identification and susceptibility profile of bacterial isolates were performed at LACEN-DF. Molecular detection of *bla* genes was performed by polymerase chain reaction (PCR) followed by the electrophoresis process. **RESULTS:** From the water (n = 140) and sewage (n = 150) samples, 24 *Aeromonas spp.* The only carbapenemase gene detected was *bla*_{KPC} in about 54% of the isolates. *Tn4401* was detected in 100% of the *bla*_{KPC} positive strains tested. **DISCUSSION/CONCLUSION:** There are environmental isolates of *Aeromonas spp.* Carbapenem-resistant carriers carry a *Tn4401* mobilized *bla*_{KPC} gene. A possible cause of the presence of *Aeromonas spp.* Carbapenem-resistant in environmental samples may occur by inadequate management of hospital sewage by the domestic sewage treatment system.

Keywords: *Aeromonas spp.*, Carbapenemase, sewage system

Lista de abreviaturas

ACT - Gene aerocitotoxina enterotoxina

AmpC - Beta- lactamases cromossômicas induzíveis

*bla*_{IMP} - Genes de carbapenemase do tipo imipenemase

*bla*_{KPC} - Genes de carbapenemase do tipo *K. pneumoniae*

*bla*_{NDM} - Genes de carbapenemase do tipo Nova Deli

*bla*_{OXA-48} - Genes de carbapenemase do tipo oxacilinase tipo 48

*bla*_{VIM} - Genes de carbapenemase do tipo Verona imipenemase

BNG - Bacilo Gram negativo

Carb R - Resistente a carbapenem

DF - Distrito Federal

DNA - Ácido desoxirribonucleico

dNTP - Desoxirribonucleótidos fosfatados

ESBL - Beta-lactamases de espectro estendido

ETE - Estação de tratamento de esgoto

g - Gramas

G - Força gravitacional

LACEN - Laboratório Central de Saúde Pública

LB - Caldo Luria Bertani

MIC - Concentração inibitória mínima

MH - Mueller Hinton

mL - Mililitro

mmol - Milimol

NDM - Nova Deli

PCR - Reação em cadeia da Polimerase

pH - Potencial Hidrogeniônico

p/v - Peso por volume

RA - Regiões Administrativas do DF

RPM - Rotações por minuto

spp. - Espécies

TAE - Tampão Tris-Acetato-EDTA

TAQ - DNA polimerase

μ L - Microlitro

μ g - Micrograma

Lista de tabelas

Tabela 1. Distribuição de bacilos Gram negativos (BGN) resistentes e *Aeromonas spp.* resistentes a carbapenem por locais de coleta de amostra.

Lista de imagens

Imagem 1. Exemplificação dos locais de coleta

Lista de gráficos

Gráfico 1. Contagem de *Aeromonas spp.* KPC positivo e negativo por estação de tratamento de esgoto

1. Introdução

Aeromonas spp. são bacilos Gram negativos (BGN) ubíquos em ambientes aquáticos naturais. A importância das espécies de *Aeromonas* como patógeno humano foi ratificada pelo predomínio desta espécie em infecções de pele e tecidos moles que acometeram sobreviventes do tsunami de 2004 na Tailândia. Pacientes imunocomprometidos e imunocompetentes podem adquirir por via oral ou por contato direto com mucosas infectadas por *Aeromonas spp.* (Hiransuthikul *et al.*, 2005).

Surtos comunitários de gastroenterites têm sido reportados no mundo inteiro com o envolvimento de *A. caviae* e *A. sobria* (Oliveira Luna *et al.*, 2013). Em ambientes hospitalares, *Aeromonas spp.* ainda podem causar uma variedade de infecções tais quais gastroenterites, septicemia e infecções associadas a cateter (Tavares, Cereser e Timm, 2015).

Genes cromossomais para beta-lactamases incluindo AmpC, penicilinases e cefalosporinases estão presentes em *Aeromonas spp.* produzindo resistência desde as penicilinas até as cefalosporinas de terceira geração, como por exemplo ampicilina, cefotaxima e ceftriaxona (Jacoby, G. A., 2009). Adicionalmente, beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) que hidrolisam penicilinas, cefalosporinas de todas as gerações e monobactams, têm sido detectadas em isolados clínicos e ambientais de *Aeromonas spp.*, a resistência aos carbapenems tem sido ocasionalmente reportada nas espécies *A. hydrophila* e *A. veronii* (Janda e Abbott, 2010; Lago *et al.*, 2010; Naas *et al.*, 2008).

A emergência de BGN portando genes de carbapenemase *bla_{KPC}* e *bla_{NDM}* tem ameaçado a vida de pacientes que desenvolvem infecções para as quais não existe antibioticoterapia adequada. Carbapenemases são enzimas que hidrolisam toda gama de antibióticos beta-lactâmicos incluindo os carbapenems (ertapenem, imipenem e meropenem), considerados a opção terapêutica de maior eficácia no controle de infecção por bactérias multirresistentes (Faria-Junior, 2016; Naas *et al.*, 2008; Pinto, FM, 2014).

No Brasil, espécies de predomínio hospitalar, tais como *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*, e *Pseudomonas aeruginosa*, são reportadas com frequência portando *bla_{KPC}* e *bla_{NDM}* em diversas capitais brasileiras, incluindo Brasília. Estudos epidemiológicos têm recentemente relatado a emergência de isolados de *Aeromonas spp.* portando genes *bla_{KPC}* e *bla_{NDM}* em ambientes que recebem efluentes hospitalares provenientes de estações de tratamento de esgoto (Faria- Junior, 2016; Naas *et al.*, 2008; Pinto, FM, 2014).

2. Revisão de literatura

2.1. *Aeromonas spp.*

Aeromonas spp. são bacilos Gram negativos (BGN), que foram primeiramente classificadas como pertencente à família Vibrionaceae por semelhanças bioquímicas, porém por diferenças fenotípicas houve a necessidade de classificá-las em uma família própria, a família Aeromonadaceae, sendo essas aeróbicas facultativas, não formam esporos, são bactérias ambientais de vida livre encontradas na água (água clorada, esgoto bruto ou tratado), no solo, em alimentos, podem fazer parte da microbiota humana e de alguns animais (Dahanayake *et al.*, 2019; Hoel, Vadstein e Jakobsen, 2019; Janda e Abbott, 2010).

Esses micro-organismos são mesófilos, tendo como temperatura ideal para crescimento de 25° a 37°C, algumas espécies suportam melhor as variações de temperatura, podendo crescer em ambientes de 4° a 42°C. Não é considerada uma bactéria fastidiosa, pois as condições para seu crescimento têm uma vasta linha de variação, tais como: faixa de pH 4,0 a 10,0, com preferência pelo pH alcalino (Dahanayake *et al.*, 2019; Janda e Abbott, 2010).

O ambiente com presença de sal em concentração de até 6% (p/v) é tolerado por essas espécies, a osmolaridade favorece o acúmulo de matéria orgânica conferindo proteção para as colônias, também regula a formação de biofilme, pois interfere na motilidade. Além de não serem afetadas pela quantidade de cloro utilizada no tratamento de água para consumo humano (Pires *et al.*, 2018).

O gênero tem capacidade de formar biofilmes que são um aglomerado de colônias aderidas a uma superfície biótica ou abiótica, que tem como função a proteção das bactérias em meio a estímulos nocivos, podendo ser esses os antibacterianos. As células ali presentes produzem e se envolvem em uma matriz de polímeros extracelulares (exopolissacarídeos) (Pires *et al.*, 2018).

Aeromonas spp. são bactérias móveis, pois possuem um flagelo polar com exceção da *A. salmonicida* que é imóvel. Têm capacidade de reduzir nitrato, liquefazer gelatina, de fermentar D-glicose, mas não conseguem fermentar o i-inositol, a maioria das espécies fermenta D-manitol e a sacarose (Hawkey *et al.*, 2012; Lima, 2017).

Esse gênero produz diversos tipos de proteínas intracelulares e extracelulares que agem como fatores de virulência, tais como citotoxinas, alfa e beta hemolisinas, proteases (metaloprotease; elastase), lipases e mecanismos de aderência que são favorecidos pela presença do flagelo. E também enterotoxinas, um exemplo é a aerolisina que é codificada pelo gene aerocitotoxina enterotoxina (ACT) que é responsável principalmente pelo dano tecidual (Batra, Mathur e Misra, 2016).

Na literatura são relatadas infecções esporádicas por *Aeromonas spp.* desde 1960, a maioria relacionada com gastroenterites, infecções de pele e tecidos moles, peritonites e até quadros mais graves como sepse, tanto em pacientes imunocomprometidos quanto em pacientes imunocompetentes (Batra, Mathur e Misra, 2016; Tena *et al.*, 2009).

As gastroenterites podem ser causadas por bactérias (15% a 20% dos casos), vírus e parasitas e são responsáveis por grande parte da morbidade e mortalidade ao redor do mundo (Schuetz, 2019). Na infecção por *Aeromonas spp.* podem ocorrer dores abdominais, vômitos, náuseas e ainda diarreias, principalmente em países em desenvolvimento (diarreia do viajante), que variam entre as formas agudas e crônicas, normalmente sem presença de sangue, essa sintomatologia pode levar a possíveis confusões com infecções causadas por *Vibrio cholerae* (Schuetz, 2019; Tavares, Cereser e Timm, 2015; Tena *et al.*, 2009).

Após o Tsunami de 2004 na Tailândia, foi possível observar o potencial infeccioso das *Aeromonas spp.* em tecidos moles, já que as feridas abertas facilitam a infecção. Foram isoladas de 305 sobreviventes 145 cepas de *Aeromonas spp.*, dentre elas *A. hydrophila* e *A. veronii* em 641 isolados de bactérias, sendo que algumas dessas apresentaram resistência à amoxicilina+clavulanato e cefalosporinas de primeira geração (Hiransuthikul *et al.*, 2005).

Apesar de infecções nosocomiais causadas por *Aeromonas spp.* serem incomuns, deve ser levantado esta possibilidade nos pacientes imunocomprometidos, como os pacientes que utilizam imunossupressor e que possuem câncer, pois, quando esses são acometidos possuem taxa de mortalidade de 37,2%, sendo essa significativamente maior do que quando a mesma é adquirida na comunidade (Tang *et al.*, 2014).

2.2. Efluentes da rede de esgoto e disseminação de contaminação

Devido ao seu habitat majoritariamente aquático as *Aeromonas spp.* causam contaminações em animais de ambientes aquáticos, porém tem sido encontrado também em abatedouros de animais terrestres, na água tratada e após a utilização para lavagem das carcaças. Parte das aparições desse microrganismo se dá pela capacidade de formar biofilmes, isso pode ocorrer tanto nas canalizações das redes de água e esgoto quanto também em materiais utilizados para o abate de animais (Abreu *et al.*, 2010; Tavares, Cereser e Timm, 2015).

Um fator preocupante do despejo de esgoto hospitalar em ambientes aquáticos é a viabilização da transferência de genes de resistência devido à presença de bactérias resistentes em contato com bactérias ambientais. Outros fatores são o resquício de antibacterianos que são excretados pela urina e fezes, e o descarte incorreto de medicamentos em vasos sanitários e pias que podem promover a seleção dos microrganismos resistentes (Abreu *et al.*, 2010; Tavares, Cereser e Timm, 2015).

2.3. Beta-lactâmicos

Os beta-lactâmicos são a classe de antibacterianos mais usada para o tratamento de infecções por Gram negativos. Todo beta-lactâmico possui um elemento estrutural farmacóforo em comum, que envolve o anel azetidínico ou anel beta-lactâmico. De maneira geral, o anel central beta-lactâmico se junta a um outro anel que pode variar de cinco (tiazolidínico) a seis (di-hidrotiazínico) membros (Guimarães, Silva Momesso e Pupo, 2010).

Beta-lactâmicos são agentes bactericidas que tem como mecanismo de ação inibir irreversivelmente a enzima transpeptidase, que catalisa a reação de transpeptidação, durante a síntese da parede celular bacteriana. A transpeptidase é responsável pela formação das ligações cruzadas entre as estruturas peptídicas, tendo por objetivo conferir rigidez à parede celular, desta forma atuando como um importante mecanismo de proteção para a bactéria contra possíveis variações do meio, em especial as osmóticas (Guimarães, Silva Momesso e Pupo, 2010).

Os carbapenens são os beta-lactâmicos com maior espectro de ação, de melhor potência e não são absorvidos por via enteral, somente por via parenteral. São de uso restrito hospitalar e geralmente são utilizados no tratamento de infecções mais severas ou em casos de resistência bacteriana. Os carbapenens são estáveis à maioria das beta-lactamases quando comparados com outros medicamentos da mesma classe e por esse motivo é a última escolha de tratamento. Os pertencentes a esse grupo são meropenem, imipenem, ertapenem e doripenem (Hawkey e Livermore, 2012; Neves *et al.*, 2011; Papp-Wallace *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2019).

2.4. Resistência a carbapenens

O uso indiscriminado e indevido de antibacterianos, como automedicação, tratamento não concluído, uso de antibacterianos para patologias causadas por outros microrganismos, entre outros, contribuem com a seleção bacteriana e resistências aos medicamentos. (Oliveira *et al.*, 2019; Braiolos, Alexandre, 2012).

As bactérias podem ser resistentes intrinsecamente a determinada classe de antibacterianos, ou seja, está expresso em seus genes. É atribuída a ausência do alvo na espécie, incapacidade de atingir o alvo, ou a presença de genes espécie- específicos cromossomais que conferem resistência (Mendes Baptista, 2013).

Existem também bactérias que são resistentes, pois adquiriram os genes de resistência ao longo de sua vida. As formas de adquirir os genes são: transformação (a bactéria absorve o DNA do meio externo, que pode ser proveniente de bactérias mortas); transdução (troca de material genético por meio de vírus bacteriófagos); conjugação (transferência de material genético móvel, como plasmídeos e transposons, através de pili) (Guimarães, Silva Momesso e Pupo, 2010).

Os mecanismos de resistência são por exemplo, bombas de efluxo que transportam o medicamento para fora da célula bacteriana, proteínas que clivam o medicamento o tornando inativo, mudanças conformacionais em receptores impedindo que o medicamento entre na célula bacteriana e faça seu efeito (Guimarães, Silva Momesso e Pupo, 2010).

O principal mecanismo de resistência ao beta-lactâmicos é a produção de enzimas (beta-lactamases, carbapenemases) que clivam o anel beta-lactâmico em sua maioria no resíduo de serina, o que proporciona a abertura do anel e a desativação do medicamento, uma alternativa para esse mecanismo é a adição de medicamentos inativadores da enzima, como por exemplo o ácido clavulânico (Stefaniak, Luciano Aparecido, 2005; Oliveira Luna *et al.*, 2013; Tavares, Cereser e Timm, 2015).

As bactérias do gênero *Aeromonas* são intrinsecamente resistente aos beta-lactâmicos de estreito espectro (penicilinas e cefalosporinas de primeira geração), seus mecanismos de resistência são a produção de beta-lactamases e de bombas de efluxo, porém o contato ambiental com micro-organismos resistentes a outros antibacterianos eleva a aparição de *Aeromonas spp.* multirresistentes, um exemplo são as que produzem carbapenemases (Stefaniak, Luciano Aparecido, 2005; Oliveira Luna, De *et al.*, 2013; Tavares, Cereser e Timm, 2015).

Os genes de carbapenemase KPC (*bla_{KPC}*) foram inicialmente descritos em 2001 na espécie de enterobactéria *Klebsiella pneumoniae*. Chamando a atenção por sua rápida dispersão mundial que ocorreu devido sua disseminação por elementos genéticos móveis e pelos inúmeros surtos hospitalares reportados. Estudos de caracterização molecular comprovam que o transposon *Tn4401* é o elemento genético móvel que sustenta a dispersão de *bla_{KPC}* e independe do plasmídeo o que facilita a distribuição por múltiplas espécies de bactérias. (Naas *et al.*, 2008; Pinto, FM, 2014).

Atualmente, enterobactérias produtoras de carbapenemase do tipo Nova Deli (NDM) estão no foco da atenção mundial, NDM já foi relatada em mais de 40 países, e seu primeiro relato no Brasil foi em 2013 em Porto Alegre. O cenário que cerca a enzima NDM (metaloenzima zinco dependente) é ainda mais preocupante uma vez que produtores de NDM transitam com maior facilidade pelo ambiente comunitário. O gene *bla_{NDM-1}* pode ser encontrado em diferentes plasmídeos que são predispostos a rearranjos, essas modificações genéticas interferem diretamente na mobilidade e patogênese (Pinto, FM, 2014; Seco, BMS, 2016).

Em comparação com os genes *bla_{KPC}* e *bla_{NDM}* os genes *bla_{IMP}* e *bla_{VIM}* e *bla_{OXS-48}* são menos alarmantes para a saúde pública, pois têm disseminação mais lenta. As carbapenemases produzidas a partir desses genes são as metaloenzimas zincodependentes (VIM, IMP, NDM) e mesmo que tenham diferenças moleculares quando comparadas com as serina-betalactamases (KPC e OXS-48) estas inativam os carbapenens e a classe de beta-lactâmicos, exceto o aztreonam que não é clivado pelas metalobetalactamases (Pinto, FM, 2014; Seco, BMS, 2016).

3. Justificativa

A dispersão de genes de carbapenemase tem ocorrido em escala mundial impulsionada pela emergência de espécies de enterobactérias de predomínio hospitalar como *K. pneumoniae* portando *bla_{KPC}* ou *bla_{NDM}*. Há relatos sobre a transferência de genes de carbapenemase para espécies bacterianas ambientais e sobre a formação de reservatórios ambientais de genes *bla_{KPC}* e *bla_{NDM}*. Neste cenário, estações de tratamento

de esgoto podem promover a dispersão de genes de carbapenemase para espécies ambientais, como *Aeromonas spp.*, à medida que processam efluentes hospitalares lançados em corpos d'água.

4. Objetivos

4.1. Objetivos gerais

- Analisar a ocorrência de isolados de *Aeromonas spp.* portando genes de carbapenemase em amostras de água e esgoto coletadas em estações de tratamento de esgoto do Distrito Federal.

4.2. Objetivos específicos

- Estabelecer o perfil de espécies de *Aeromonas* resistentes a carbapenem.
- Verificar a positividade para genes de carbapenemase.
- Descrever o perfil molecular de carbapenemases (*bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{IMP}*, *bla_{VIM}* e *bla_{OXS-48}*) em isolados de *Aeromonas spp.*
- Detectar a presença de transposon *Tn4401* portando *bla_{KPC}* em isolados de *Aeromonas spp.*

5. Metodologia

5.1. Amostragem

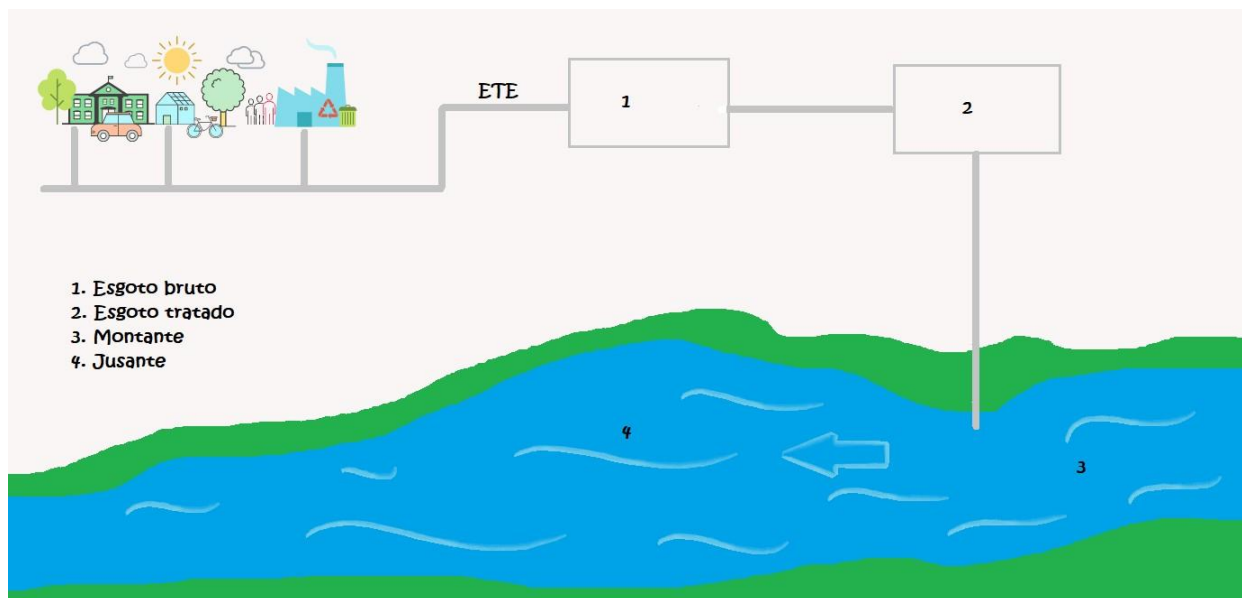
Para atingir o objetivo proposto e realizar a detecção molecular de genes *bla* e do transposon *Tn4401* por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR), primeiramente, foi realizada a coleta das amostras de esgoto bruto e tratado das estações de tratamento de esgoto (n = 13) do Distrito Federal e amostras de corpos d'água aceptores do esgoto tratado (Imagem 1), incluindo Lago Paranoá em áreas sob controle ambiental. As amostras foram coletadas em julho de 2017 e março de 2018.

Os pontos de coleta foram previamente estabelecidos e registrados por suas coordenadas geográficas e mantidos nas coletas subsequentes para melhor comparação de sazonalidade. A coleta de água foi realizada, nos pontos fixados, com o auxílio de um balde de polietileno previamente ambientado com a amostra a ser coletada.

Após a coleta foi realizada a seleção das bactérias com um caldo enriquecido com vancomicina em concentração de 30 µg que foi utilizada para inibir o crescimento de Gram positivos, e o meropenem em concentração de 10 µg foi usado para que somente as bactérias resistentes à classe crescessem no meio, foi adicionado em um tubo falcon de 15 mL, 1 disco de cada um dos antibacterianos para cada mL de amostra, que foram incubadas à $36\pm 1^{\circ}$ C de 18 a 24 horas.

Posteriormente para obter colônias puras, as amostras foram semeadas por método de esgotamento em meio seletivo e cromogênico ou em ágar Macconkey enriquecido com meropenem, as placas foram incubadas em estufa à $36\pm 1^{\circ}$ C de 18 a 24 horas para isolamento e então identificação das espécies. As cepas isoladas são armazenadas na bacterioteca em caldo LB semi-sólido para utilização futura.

Imagem 1. Exemplificação dos locais de coleta



5.2. Identificação

Depois do crescimento das cepas foi feita a identificação bacteriana e perfil de susceptibilidade, os isolados de bacilos Gram negativos foram encaminhados ao LACEN-DF e então cultivados em ágar Mueller Hinton e incubados por 18 a 24 horas em estufa a 36 ± 1 °C. A identificação de espécie foi realizada por espectrometria de massa em plataforma automatizada (VITEK® MS com tecnologia MALDI-TOF - Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight).

Os isolados que apresentaram probabilidade $\leq 80\%$ para identificação de espécie foram reanalisados. A confirmação da identidade da espécie foi realizada por meio da técnica de espectrometria de massa utilizando o Vitek MS (bioMérieux). Os resultados de concentração inibitória mínima foram interpretados seguindo os parâmetros definidos pelo Clinical and Laboratory Standards Institute – guideline M100-S23 de 2013. A resistência a carbapenems foi definida considerando um MIC ≥ 2 mg/mL para pelo menos um dos carbapenems testados (ertapenem, imipenem ou meropenem). Foram preservadas armazenadas em ágar nutriente semi-sólido (0,8% ágar) e temperatura ambiente.

5.3. Extração de DNA

Para a extração de DNA foram utilizadas cepas de *Aeromonas* resistentes recuperadas da bacterioteca em caldo LB líquido, incubadas a 36 ± 1 ° C de 18 a 24 horas, em seguida deu-se continuidade ao processo de extração por fervura que consiste em colocar em um microtubo 1 mL do caldo contendo a amostra, centrifugar a 3000xg por 3 minutos, descartar o sobrenadante e adicionar 1 mL de água ultrapura, homogeneizar, retornar a amostra para a centrífuga por 3 minutos a 3000xg, retirar o sobrenadante, então adicionar 1 mL de Tris 10 mmol, homogeneizar, levar ao banho-maria por 15 minutos, centrifugar a 11000 RPM por 1 minuto, por fim transferir 600 μ L do sobrenadante para um novo eppendorf e armazenar de 2° a 8°C.

5.4. PCR e Eletroforese

A detecção molecular de genes bla se deu por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR), com objetivo de estabelecer o perfil genético relacionado à presença de genes para carbapenemase e do transposon *Tn4401*. Para esta reação foi realizado um mix contendo: 13,4 µL de água de-ionizada, 3,0 µL de tampão 10X, 1,5 µL dos primers F e R, 0,3 µL de dNTP e TAQ e por fim 7,0 µL de DNA das amostras. Depois o mix foi levado para o termociclador onde foi realizado 30 ciclos: desnaturação inicial à 90°C por 1 minuto, seguido de uma nova desnaturação à 94°C por 1 minuto, depois o anelamento à 60°C por 1 minuto, extensão à 72°C por 1 minuto, após as amostras podem ser lidas em eletroforese ou são mantidas a 5°C por até 7 dias.

Para o preparo de 100 mL do gel de agarose 1% pesou-se 1 g de agarose, 2 mL de TAE 50X e adicionou água em quantidade suficiente para completar os 100 mL de solução, seguido do aquecimento da mesma de modo a dissolver a agarose, e então o gel foi colocado na cuba de eletroforese com o pente, o qual após gelificação está pronto para receber a amostra previamente preparada, seguida do processo de eletroforese.

5.5. Análise estatística

A análise estatística dos dados categóricos foi realizada através do teste exato de Fisher, utilizando o graphpad prism, no qual foi observado os valores frente às tabelas de contingência analisadas. Resultados com valor de p menor ou igual a 0,05 serão considerados estatisticamente significativos.

6. Resultados e Discussão

Após a realização da espectrometria de massa utilizando o Vitek® MS todos os isolados de *Aeromonas spp.* recuperados foram considerados mesófilos e de importância clínica, já que ao crescerem em temperatura de 25°C a 37°C têm a capacidade de infectar humanos.

Tabela 1. Distribuição de bacilos Gram negativos (BGN) resistentes e *Aeromonas spp.* resistentes a carbapenem por locais de coleta de amostra

	Bruto	Tratado	Jusante	Montante	Total
Total de colônias de BGN recuperados	240	164	146	77	627
Total de <i>Aeromonas spp.</i> (% de recuperação – <i>Aeromonas</i> /BGN)	9 (3,75)	8 (4,88)	6 (4,11)	1 (1,30)	24 (3,83)
<i>Aeromonas spp.</i> KPC ⁺ (% de recuperação – <i>Aeromonas</i> KPC/BGN)	4 (1,67)	5 (3,05)	3 (2,05)	1 (1,30)	13 (2,07)

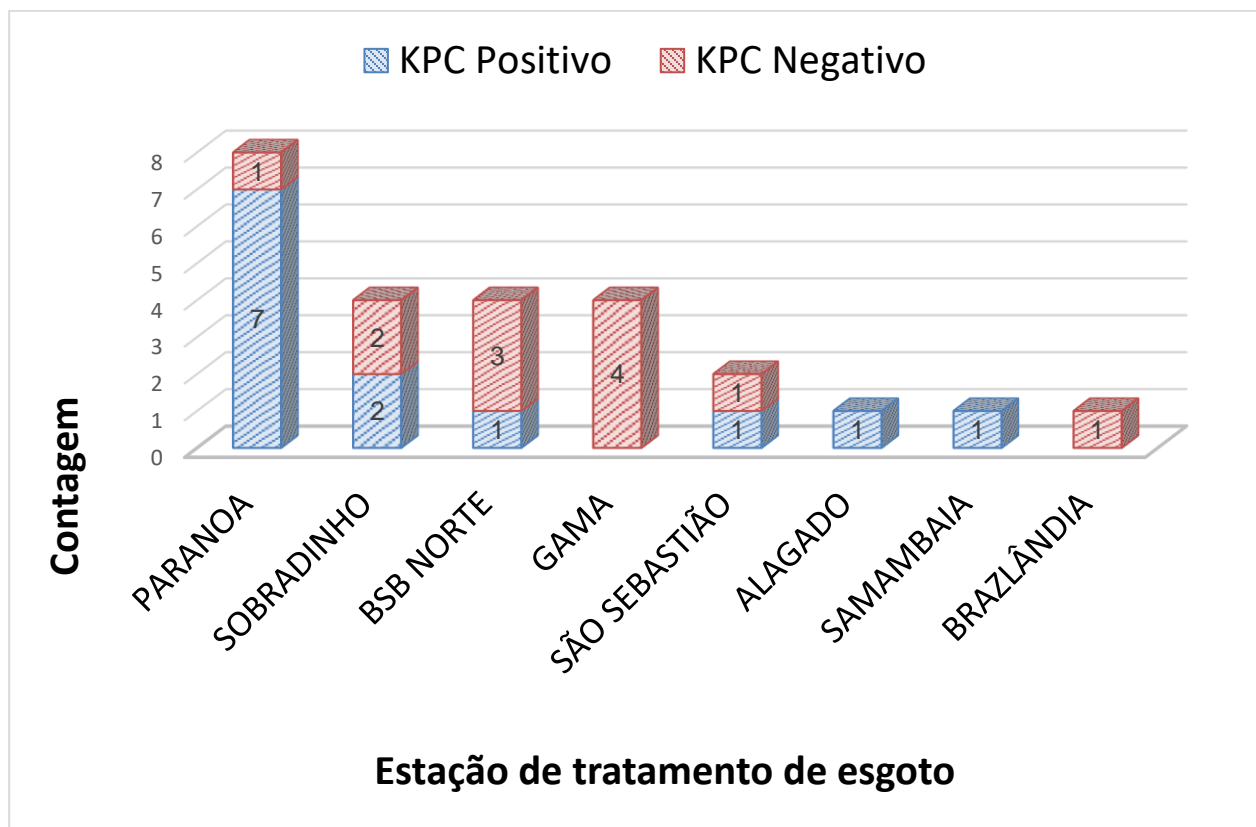
O resultado encontrado demonstra que a amostra de água jusante e o esgoto tratado foram os locais de amostra/tipo de esgoto com maior porcentagem de isolados resistentes a carbapenens com 4,11% e 4,88% respectivamente. Sobre os isolados resistentes a carbapenens portando o gene *bla*_{KPC}, a frequência de recuperação também foi maior na amostra jusante e em esgoto tratado, sendo a frequência de 2,05% e 3,05%

respectivamente. O gene *bla_{KPC}* foi encontrado em cerca de 2,07% do total de recuperados. Além disso, foram analisados outros 4 genes de resistência, sendo eles NDM, VIM, IMP e OXS-48 no total de 24 isolados de *Aeromonas spp.*, sendo que nenhum desses genes foi encontrado.

É importante ressaltar que esse resultado mostra que as bactérias resistentes podem chegar até a população, já que algumas famílias sem acesso a água potável, por exemplo, podem utilizar de corpos d'água aceptores de esgoto tratado como fonte de água para consumo. Outro fato importante é que a população usa corpos d'água aceptores de esgoto tratado como local de lazer.

Apenas 8 das 13 estações de tratamento de esgoto (ETE) contribuíram para o isolamento de *Aeromonas spp.* resistentes a carbapenens. Observou-se que a maioria dos isolados (33,33% do total) de *Aeromonas spp.* foram recuperados da ETE Paranoá, sendo que destes, 87,5% são positivas para *bla_{KPC}*. Entretanto, nos recuperados do Gama (16,67% do total) o resultado foi de 100% negativo para *bla_{KPC}*, uma das possibilidades para essa diferença, é o perfil da população das regiões administrativas do DF (RA), o tamanho da RA, e se há ou não a presença de hospitais na região. Portanto, é possível afirmar que alguns dos resultados do presente trabalho estão de acordo com a literatura, pois, Sekizuka *et, al*, 2019. relatou a presença de *bla_{KPC}* em *Aeromonas spp.* resistente a carbapenens (carba-R); e que o isolamento de cepas de *Aeromonas spp.* carba-R negativas para *bla_{KPC}*, tais como ocorreram na ETE do Gama se contrapõe a esse mesmo autor.

Gráfico 1. Contagem de *Aeromonas spp.* KPC positivo e negativo por estação de tratamento de esgoto



Neste estudo foi possível observar que a dispersão de *bla_{KPC}* permanece sustentada pelo transposon *Tn4401*. Das 13 cepas KPC⁺, 10 também foram positivas para o *Tn4401*, 1 cepa foi perdida. Entretanto, 2 cepas apresentaram resultados negativos para *Tn4401*, as possíveis causas são, a perda da região de anelamento do primer por mudanças evolutivas e alocação de *bla_{KPC}* em ambiente genético diferente do *Tn4401*. O resultado encontrado está em concordância com a literatura, pois NAAS et, al. observaram que na maioria das suas cepas havia presença de *bla_{KPC}* e do *Tn4401*.

Ao realizar o teste exato de Fisher observou que os resultados encontrados não são estatisticamente significantes, pois ao comparar os grupos (locais de coleta; BGN carb R; *Aeromonas carba-R*) o menor valor de p valor encontrado foi 0.2786 após comparar os locais tratado e montante.

Por fim, uma possível causa para esses resultados podem ser o manejo inadequado do esgoto hospitalar e o descarte inadequado de medicamentos pela população. E estudos futuros são necessários para identificar quais espécies são mais frequentes, quais outros genes de resistência possuem e porque esses resultados foram encontrados para cada tipo de esgoto.

7. Conclusão

Neste trabalho foi possível observar a presença de isolados de *Aeromonas spp.* portando gene para carbapenemase do tipo KPC nas águas e esgotos do Distrito Federal. Todas as espécies recuperadas foram consideradas *Aeromonas mesófilas*, as quais, 24 são *Aeromonas spp.* resistentes a carbapenem, destes, 13 possuem o gene de resistência *bla_{KPC}*, e também pode-se observar que o transposon *Tn4401* ainda é o principal elemento mobilizador de KPC em *Aeromonas spp.*

8. Referências bibliográficas

ABREU, Elenice Tavares; PRETTO, João Adelmo; CALEARE, Ângelo de Oliveira; TAVARES, Célia Regina Granhen; NAKAMURA, Celso Vataru. Avaliação da resistência a antibióticos de bactérias isoladas de efluente hospitalar, 2010.

BATRA, Priyam e MATHUR, Purva e MISRA, MaheshC. *Aeromonas spp.*: An emerging nosocomial pathogen. *Journal of Laboratory Physicians*, v. 8, n. 1, p. 1, 2016.

BRAIOS, Alexandre. Uso de antimicrobianos pela população da cidade de Jataí (GO), Brasil The use of antimicrobial drugs by the population in the city of Jataí, State of Goiás, Brazil. p. 3055–3060, [S.d.], 2012.

DAHANAYAKE, P. S.; HOSSAIN, S.; WICKRAMANAYAKE, M. V. K. S.; HEO, G.-J. Antibiotic and Heavy-Metal Resistance Genes in *Aeromonas spp.* Isolated from Marketed Manila Clam (*Ruditapes philippinarum*) in Korea. *Journal of Applied Microbiology*, p. 0–3, 2019.

FARIA-JUNIOR C, Rodrigues LDO, Carvalho JOD, Franco OL, Pereira AL, et al. NDM-Producing Enterobacteriaceae Strains among Hospitals in Brasília, Brazil. *J Microbiol Exp* 3(2): 00083, 2016.

GUIMARAES, Denise Oliveira; MOMESSO, Luciano da Silva; PUPO, Mônica Tallarico. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. *Quím. Nova*, São Paulo, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.

HAWKEY, Peter M. e LIVERMORE, David M. Carbapenem antibiotics for serious infections. *BMJ (Online)*, v. 344, n. 7863, p. 1–7, 2012.

HIRANSUTHIKUL, N. e colab. Skin and Soft-Tissue Infections among Tsunami Survivors in Southern Thailand. *Clinical Infectious Diseases*, v. 41, n. 10, p. e93–e96, 2005.

HOEL, S.; VADSTEIN, O.; JAKOBSEN, A. The Significance of Mesophilic *Aeromonas* spp. in Minimally Processed Ready-to-Eat Seafood. *Microorganisms*, v. 7, n. 3, p. 91, 2019.

JACOBY, G. A. AmpC - Lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*, 22(1), 161–182, 2009.

JANDA, J. M.; ABBOTT, S. L. The genus *Aeromonas*: Taxonomy, pathogenicity, and infection. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 23, n. 1, p. 35–73, 2010.

LAGO, Aldalise; FUENTEFRIA, Sergio Roberto; FUENTEFRIA, Daiane Bopp. Enterobactérias produtoras de ESBL em passo fundo, estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop*, v. 43, n. 4, p. 430-4, 2010.

LIMA, Camila Correa; Benjamim, Sanda Cristina Calixto; dos Santos, Rosana Francisco Siqueira. Mecanismo de resistência bacteriana frente aos fármacos: uma revisão, 2017.

MENDES BAPTISTA, Maria Galvão de Figueiredo. Mecanismos de Resistência aos Antibióticos. Tese de mestrado. Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia - Faculdade de Ciências e Tecnologia da Saúde, 2013.

NAAS, Thierry e colab. Genetic structures at the origin of acquisition of the β -lactamase blaKPC gene. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 52, n. 4, p. 1257–1263, 2008.

NEVES, Patrícia R. et al. *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente: um problema endêmico no Brasil. *J. Bras. Patol. Med. Lab.*, Rio de Janeiro, v. 47, n. 4, p. 409-420, Aug, 2011.

OLIVEIRA, Moisés e AQUINO, Simone. Resistência aos antimicrobianos: uma revisão dos desafios na busca por novas alternativas de tratamento. p. 1–11, 2019.

OLIVEIRA LUNA, Rejane e colab. Identificação molecular e perfil de resistência a antimicrobianos de *Aeromonas* spp. isoladas de queijo de coalho tipo A. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v. 35, n. 3, p. 205–211, 2013.

PAPP-WALLACE, K. M.; ENDIMIANI, A.; TARACILA, M. A.; BONOMO, R. A. Carbapenems: Past, Present, and Future. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 55, n. 11, p. 4943–4960, 2011.

PINTO, FM, et al. Prevalência de carbapenemases em enterobactérias resistentes a carbapenêmicos em quatro hospitais terciários de Porto Alegre. *Artigo Original Clin Biomed Res Clin Biomed Res*, v. 473434, n. 11, p. 47–52, 2014.

PIRES, I. C.; FREIRE, N. B.; FERNANDES, A. W. C.; SOUZA, R. F. S.; SILVA, F. A. G.; OLIVEIRA, H. P.; COSTA, M. M. Influência do polipirrol e dos níveis de salinidade na formação de biofilme em *Aeromonas* spp. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 38, n. 8, p. 1528–1536, 2018.

SCHUETZ, Audrey N. Emerging agents of gastroenteritis: *Aeromonas*, *Plesiomonas*, and the diarrheagenic pathotypes of *Escherichia coli*. *Seminars in Diagnostic Pathology*, 2019.

SECO, B.M.S., 2016. Persistência de plasmídeos que codificam carbapenemases do tipo New-Delhi- β -Lactamase. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

SEKIZUKA, Tsuyoshi e colab. 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*, 2019.

STEFANIAK, Luciano Aparecido et al. Resistência bacteriana: a importância das beta-lactamases. *REVISTA UNINGÁ*, [S.l.], v. 4, n. 1, out, 2017.

TANG, Hung-jen e colab. Clinical Manifestations of Bacteremia Caused by *Aeromonas* Species in Southern Taiwan. v. 9, n. 3, p. 2–7, 2014.

TAVARES, A. B., Cereser, N. D., & Timm, C. D. Ocorrência de *Aeromonas* spp. em alimentos de origem animal e sua importância em saúde pública. *Arquivos do Instituto Biológico*, 82(0), 2015.

TENA, D.; ASPÍROZ, C.; FIGUERAS, M. J.; GONZÁLEZ-PRAETORIUS, A.; ALDEA, M. J.; ALPERÍ, A.; BISQUERT, J. Surgical site infection due to *Aeromonas* species: Report of nine cases and literature review. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, v. 41, n. 3, p. 164–170, 2009.

ZHANG, D.; CUI, K.; LU, W.; BAI, H.; ZHAI, Y.; HU, S.; LI, H.; DONG, H.; FENG, W.; DONG, Y. Evaluation of carbapenem use in a tertiary hospital: Antimicrobial stewardship urgently needed. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, v. 8, n. 1, p. 1–7, 2019.