



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE RORAIMA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE**  
**E BIOTECNOLOGIA DA REDE BIONORTE**



**MÁRCIA BRAZÃO E SILVA BRANDÃO**

**DIVERSIDADE DE CEPAS PRODUTORAS DE BETALACTAMASES DE ESPECTRO  
ESTENDIDO EM UM HOSPITAL PÚBLICO DE BOA VISTA-RR**

**BOAVISTA, RR**  
**2018**

**MÁRCIA BRAZÃO E SILVA BRANDÃO**

**DIVERSIDADE DE CEPAS PRODUTORAS DE BETALACTAMASES DE ESPECTRO  
ESTENDIDO EM UM HOSPITAL PÚBLICO DE BOA VISTA-RR**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE, na Universidade Federal de Roraima como requisito para a obtenção do Título de Doutora em Biodiversidade e Conservação.

Orientadora: Profa. Dra. Fabiana Granja

**BOA VISTA, RR  
2018**

Dados Internacionais de Catalogação na publicação (CIP)

Biblioteca Central da Universidade Federal de Roraima

B817d Brandão, Márcia Brazão e Silva.

Diversidade de cepas produtoras de betalactamases de espectro estendido em um hospital público de Boa Vista-RR / Márcia Brazão e Silva Brandão – Boa Vista, 2018.

109 f.: il.

Orientadora: Profa. Dra. Fabiana Granja.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Roraima, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal.

1 – Antimicrobianos. 2 – Enterobacteriaceae. 3 – Efluente. 4 – ESBL 5 – Resistência. I – Título. II – Granja, Fabiana (orientador).

Ficha Catalográfica elaborada pela: Bibliotecária/Documentalista:

Marcilene Feio Lima - CRB-11/507-AM

**MÁRCIA BRAZÃO E SILVA BRANDÃO**

**BIODIVERSIDADE DE CEPAS PRODUTORAS DE BETALACTAMASES DE ESPECTRO  
ESTENDIDO EM UM HOSPITAL PÚBLICO DE BOA VISTA-RR**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE, na Universidade Federal de Roraima como requisito para a obtenção do Título de Doutor em Biodiversidade e Conservação. Defendida em 25 de junho de 2018 e avaliada pela seguinte banca examinadora:

---

Prof. Dra Fabiana Granja  
Orientadora/ Centro de Estudos da Biodiversidade – UFRR  
Presidente da banca

---

Prof. Dr. Marcos José Vital  
Universidade Federal de Roraima – UFRR

---

Prof. Dr. Mário Maciel de Lima Junior  
Universidade Estadual de Roraima - UERR

---

Profa. Dra. Jackeline da Costa Maciel  
Universidade Federal de Roraima

---

Profa. Dra. Vanderly Andrade Souza  
Universidade Federal de Roraima – UFRR

**BOA VISTA,RR  
2018**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus anjos protetores e a Deus por iluminar minha jornada com sabedoria, harmonia, respeito ao próximo e coragem para ultrapassar todos os obstáculos do caminho.

Agradeço à minha mãe Rosangela Brazão, que sempre ressaltou que a educação era o maior investimento, herança que poderia ser dada a seus filhos. Que para isso, qualquer economia não valeria à pena. Com esse pensamento, colocou seus filhos em uma trilha frutífera e formou cidadãos que irão compartilhar de todo o ensinamento que foi oportunizado. Te amo mãe.

Agradeço a meu marido, um anjo em minha vida, parceiro em tudo, seja no meio científico quanto no cuidar dos presentes que Deus nos concedeu: Nossos filhos André Samuel e Maria Luiza, estes, que entenderam todo o momento de estudo da mãe e conseguiram nesta jornada compreender que eu também precisava aprender mais coisas, assim como eles. Amo muito vocês.

Ao meu Pai Antônio Duarte Brandão Filho e irmãos (Renata, Toninho, Marcelo e Marcela), membros da melhor torcida organizada que pode existir: a da felicidade e prosperidade da família.

À minha orientadora Fabiana Granja, por toda a experiência compartilhada, auxílio e atenção com que conduziu o meu trabalho e pela amizade. Por ter entendido meus momentos de fraqueza, por ter sido uma mola propulsora em vários eventos de desânimo ocasionados pelos obstáculos interpostos pela vida.

À minha amiga/irmã Cátia Alexandra Ribeiro Meneses, pela motivação eterna, carinho com toda a minha família, por dividir tristezas e alegrias, por mostrar que existe verdade e sinceridade.

Aos meus braços direito e esquerdo (sem distinção de quem é qual), Rafael Assis e Edmilla Carneiro Cunha, fundamentais para o desenvolvimento técnico deste trabalho. Pelo crescimento pessoal através do compartilhamento de vivências. Ultrapassamos o patamar de Aluno/Co-Orientadora. Somos amigos!!

Aos alunos do Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Federal de Roraima – LabMol, por todo o apoio, companheirismo, experiência dividida. Importante mencionar o

nosso saudoso e eternamente presente em nossos pensamentos, professor Pablo Amézaga Acosta.

À toda equipe da Bacteriologia do LACEN-RR (Claudete, Gabriel, Luiza e Léia), ao diretor do LACEN Marconi Aragão Gomes, pela parceria disponibilizada com o intuito de promover a saúde do Estado de Roraima.

Ao Instituto Federal de Roraima, especialmente ao Campus Boa Vista (Gestores, professores) pelo apoio dado para o desenvolvimento deste trabalho. Ao programa institucional de financiamento de pesquisa docente, que através dos editais que fui contemplada, proporcionou os recursos para as várias etapas que foram desenvolvidas na tese.

À Universidade Federal de Roraima, que em Co-participação com o Instituto Federal de Roraima, disponibilizaram todo o esforço necessário para o depósito da patente desenvolvida a partir deste trabalho.

Ao programa de doutorado da rede Bionorte que objetiva integrar competências para o desenvolvimento de projetos de pesquisa, desenvolvimento, inovação e formação de recursos humanos, com foco na biodiversidade e biotecnologia. Agradeço aos coordenadores Geral e Estadual.

Agradeço a todos os que contribuíram diretamente ou indiretamente para a realização deste trabalho.

## RESUMO

O surgimento de bactérias resistentes à antimicrobianos está ocorrendo em todo o mundo em velocidade superior ao descobrimento de novos fármacos, pondo em risco a eficácia destes. As bactérias da família Enterobacteriaceae produtoras de beta-lactamase de espectro estendido (ESBL) estão amplamente disseminadas nos ambientes hospitalares. O descarte incorreto de dejetos clínicos em efluentes hospitalares, possibilita que estes apresentem elevadas concentrações de bactérias com perfis de resistência a antimicrobianos e demonstrem risco ambiental na medida em que possibilitam a disseminação desta resistência. Esta pesquisa abrange a caracterização da presença de bactérias multirresistentes à antimicrobianos em cepas clínicas e a comparação destas com as isoladas em efluentes hospitalares, cujos riscos associados, incluem a disseminação de microrganismos patogênicos no ambiente. Para a resolução desta pesquisa, os objetivos propostos são caracterizar a biodiversidade das cepas do efluente hospitalar gerado pelo Hospital Geral de Roraima (HGR) comparando-a com as bactérias clínicas identificadas no mesmo hospital e realizar a pesquisa de genes de resistência das famílias TEM, SHV e CTX, responsáveis pela codificação de ESBL e hidrólise aos antimicrobianos da classe das cefalosporinas, penicilinas e monobactams. Para a detecção proposta, foram analisados materiais clínicos provenientes de pacientes internados no HGR e coletadas amostras do tanque séptico do hospital, no período de junho de 2014 a junho de 2016, submetidos à identificação molecular para a detecção dos genes de resistência através da reação em cadeia da polimerase (PCR) e teste de sequenciamento pelo método de Sanger. Os resultados demonstraram o material clínico mais prevalente em relação à detecção de ESBL, foram provenientes de amostras de urina, ponta de cateter, secreção traqueal e sangue. O perfil de resistência em amostras clínicas e efluentes identificou os antimicrobianos piperacilina/tazobactam, imipenem e amicacina como fármacos mais sensíveis para as bactérias produtoras de ESBL, assim como a predominância das cepas de *Klebsiella sp.* entre os isolados e do gene TEM entre os codificantes de beta-lactamases. Os genes de ESBL foram identificados em frequências isoladas e em combinação. A caracterização dos subtipos de ESBL evidenciou a presença do gene CTX-M-15, mais frequente mundialmente, ampla variedade de subtipos do gene SHV e o gene TEM-181 em cepas do efluente. Os resultados indicaram a ampla disseminação dos genes de ESBL nas cepas clínicas e no efluente do HGR.

**PALAVRAS-CHAVE:** Antimicrobianos. Enterobacteriaceae. Efluente. ESBL. Resistência.

## ABSTRACT

The emergence of antimicrobial resistant bacteria is occurring all over the world at a faster rate than the discovery of new drugs, putting their registration at risk. Bacteria of the extended-spectrum beta-lactam-producing Enterobacteriaceae (ESBL) are widely disseminated in hospital settings. The incorrect disposal of clinical waste in hospital effluents, allowing the antimicrobial resistance clones to be more recent and demonstrate environmental risk insofar as they allow the dissemination of this resistance. This research was presented with a series of information that characterized the antimicrobial agents in clinical strains and a picture with the presence of hospital nurses, the faces followed, the dissemination of pathogenic microorganisms in the environment. The aim of this research is to characterize a diversity of hospital strains of the General Hospital of Roraima (HGR) comparing them with health clinics without the same hospital and to conduct a survey of resistance genes of the families: TEM, SHV and CTX, responsible for ESBL coding and hydrolysis to antimicrobials of the class of cephalosporins, penicillins and monobactams. For the proposed proposal, we included the clinical data of patients hospitalized in the HGR and collected hospital septic tank samples in a period of June 2014 in June 2016 in a molecular study to identify resistance genes through the chain reaction polymerase chain reaction (PCR) and sequencing test by the Sanger method. The results showed greater clinical relevance regarding the detection of ESBL, were of urine samples, catheter tip, tracheal secretion and blood. The resistance profile in samples from patients and children is identified as piperacillin / tazobactam, imipenem and amikacin as the most sensitive drugs for ESBL-producing bacteria, as well as the predominance of *Klebsiella* sp. Among the problems of the TEM gene among the coding of beta-lactamases. ESBL genes were identified in frequencies and isolated and in combination. A characterization of the ESBL subtypes evidences a presence of the CTX-M-15 gene, more frequent worldwide, besides the presence of the SHV gene and the TEM-181 gene in Effluent strains. The results indicate a wide dissemination of the ESBL genes in the clinical strains and in the effluent of HGR.

**Keywords:** Antimicrobials. Enterobacteriaceae. Effluent. ESBL. Resistance.

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Perfil de sensibilidade à antimicrobianos das cepas clínicas ESBL positivas .....	57
Gráfico 2 – Perfil de resistência à antimicrobianos das cepas clínicas ESBL positivas .....	58
Gráfico 3 – Distribuição dos subtipos dos genes relacionados a resistência (n) em amostras clínicas .	64
Gráfico 4 – Perfil de resistência a antimicrobianos das cepas do efluente ESBL positivas.....	70
Gráfico 5 – Perfil de sensibilidade à antimicrobianos das cepas do efluente ESBL positivas.....	71
Gráfico 6 – Distribuição dos subtipos dos genes relacionados a resistência (n) nos efluentes hospitales .....	74

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Principais classes de antimicrobianos (continua) .....	15
Tabela 2 – Classificação das cefalosporinas por geração e espectro de ação.....	22
Tabela 3– Classificação das enzimas de beta-lactamases de acordo com o gene e grupo funcional (continua) .....	25
Tabela 4– Classificação das enzimas de beta-lactamases de acordo com o gene e grupo funcional (continua) .....	25
Tabela 4 – Meios de cultura e características de interpretação (continua) .....	45
Tabela 5 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a pesquisa de genes de resistência e seu peso molecular e condições do PCR para sua amplificação.....	50
Tabela 6 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a pesquisa de genes RNAr16s, seu peso molecular e condições do PCR para sua amplificação.....	51
Tabela 7 – Frequência dos diferentes materiais clínicos coletados no Hospital Geral de Roraima. ....	53
Tabela 8 – Identificação fenotípica das cepas confirmadas como produtoras de ESBL.....	55
Tabela 9 – Comparação dos resultados fenotípicos e genotípicos (sequenciamento do gene RNAr16S) para confirmação da identidade entre as cepas clínicas (somente resultados discordantes). .....	55
Tabela 10 – Distribuição nas cepas clínicas dos Genes Codificantes de ESBL por gênero/espécie bacteriana .....	62
Tabela 11 – Subtipos de genes de ESBL de acordo com a cepa clínica isolada. ....	64
Tabela 12 – Distribuição das espécies identificadas de acordo com o ponto de coleta de efluente. ....	68
Tabela 13 – Comparação dos resultados fenotípicos e genotípicos (sequenciamento do gene RNAr16S) das amostras do efluente (apenas resultados discordantes).....	69
Tabela 14 – Distribuição nas cepas do efluente hospitalar dos genes codificantes de ESBL por gênero/espécie bacteriana.....	73
Tabela 15 – Subtipos de genes de ESBL provenientes de cepas isoladas do efluente de acordo com o gênero/espécie.....	75
Tabela 16 – Subtipos identificados no efluente hospitalar e amostras clínicas. Relação gene/subtipo.	78

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura da parede celular em bactérias Gram positivas e Gram-negativas .....	12
Figura 2 – Cronologia de descobrimento das distintas classes de antimicrobianos .....	14
Figura 3– Representação do plasmídeo e seus elementos genéticos móveis .....	18
Figura 4 – Antimicrobianos betalactâmicos .....	20
Figura 5 – Penicilinas semissintéticas .....	21
Figura 6– Penicilinas naturais G e V .....	21
Figura 7– Estrutura química dos antimicrobianos derivados do carbapenêmicos.....	23
Figura 8 – Hidrólise do anel Betalactâmico .....	24
Figura 9 – Inibidores de beta-lactamases .....	27
Figura 10 – Distribuição de ESBL em Enterobacteriaceae no Brasil. ....	28
Figura 11 – Gene TEM, variações de aminoácidos e variantes do gene. ....	30
Figura 12 – Gene SHV, variações de aminoácidos e variantes do gene .....	31
Figura 13 – Distribuição dos blocos e alas do Hospital Geral de Roraima .....	41
Figura 14 – Pontos das coletas dos efluentes no Hospital Geral de Roraima – HGR.....	42
Figura 15 – Coleta dos efluentes nos tanques sépticos do Hospital Geral de Roraima.....	43
Figura 16– Diluição e semeio das amostras .....	44
Figura 17 – Identificação fenotípica de gênero e espécie bacterianas.....	45
Figura 18– Teste de sensibilidade e interpretação positiva de ESBL. ....	48
Figura 19 – Gel de agarose a 1,5% com as amostras submetidas à amplificação dos genes TEM e SHV, a banda representa positividade para o gene amplificado.....	60
Figura 20 – Gel de agarose a 1,5% com as amostras submetidas à amplificação dos genes CTX-M, a banda representa positividade para o gene amplificado. ....	61
Figura 21 Mapa de identificação genotípica de cepas ESBL positivas atualizado com os resultados desta pesquisa .....	77

## LISTA DE SIGLAS

ATB: Antibiótico

ATCC: *American Type Culture Collection*

BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool*

CLSI: *Clinical & Laboratory Standards Institute*

DNA: Ácido desoxirribonucleico

ESBL: Beta-Lactamase de Espectro Estendido

ETE: Estação de Tratamento de Esgotos

HGR: Hospital geral de Roraima - Rubens de Sousa Bento

IFRR: Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Estado de Roraima

LACEN/RR: Laboratório Central de Saúde Pública do Estado de Roraima

NCBI: *National Center for Biotechnology Information*

PCR: *Polymerase Chain Reaction*

RNA: Ácido Ribonucleico

RDC: Resolução da Diretoria Colegiada

UFRR: Universidade Federal de Roraima

UTI: Unidade de Terapia Intensiva

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	10
1.1	ESTRUTURA BACTERIANA: CARACTERÍSTICAS GERAIS .....	12
1.2	ANTIMICROBIANOS E MECANISMOS DE RESISTÊNCIA BACTERIANA .....	13
1.2.1	Mecanismos de escape à ação dos antimicrobianos.....	14
1.2.2	Mecanismo genético de resistência: transferência horizontal de genes .....	18
1.3	ANTIMICROBIANOS BETALACTÂMICOS .....	19
1.3.1	Penicilinas .....	20
1.3.2	Cefalosporinas.....	21
1.3.3	Carbapenêmicos .....	23
1.3.4	Monobactâmicos .....	23
1.4	BETA-LACTAMASES.....	24
1.5	EFLUENTES HOSPITALARES .....	32
1.5.1	ESBL em efluentes hospitalares.....	33
1.6	MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DE RESISTÊNCIA BACTERIANA.....	34
1.6.1	Disco difusão.....	34
1.6.2	E-TEST .....	35
1.6.3	Diagnóstico automatizado .....	35
1.6.4	Diagnóstico molecular.....	36
1.7	TRATAMENTO E PREVENÇÃO DAS INFECÇÕES POR ESBL .....	36
2	OBJETIVOS.....	39
2.1	GERAL.....	39
2.2	ESPECÍFICOS .....	39
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
3.1	LOCAL DE ESTUDO: O HOSPITAL GERAL DE RORAIMA – HGR.....	40
3.2	COLETA DO EFLUENTE HOSPITALAR.....	41
3.3	IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA E TESTE DE DISCO APROXIMAÇÃO PARA PESQUISA DE ESBL.....	43
3.4	EXTRAÇÃO DO DNA E AMPLIFICAÇÃO POR REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE.....	49
3.4.1	Amplificação do gene ribossomal RNAr16S .....	51
3.5	SEQUENCIAMENTO DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS.....	51
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	52
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	53
4.1	CARACTERIZAÇÃO DE ESBL EM CEPAS ISOLADAS DE AMOSTRAS CLÍNICAS .....	53
4.1.1	Identificação fenotípica e genotípica das cepas isoladas produtoras de ESBL. ....	54

4.1.2	Perfis de sensibilidade e resistência das cepas isoladas .....	57
4.1.3	Detecção dos genes TEM, SHV e CTX-M das cepas isoladas .....	60
4.1.4	Sequenciamento dos genes amplificados por PCR das cepas isoladas em amostras clínicas. ... .....	63
4.2	CARACTERIZAÇÃO DE ESBL EM CEPAS ISOLADAS NO EFLUENTE HOSPITALAR ...	67
4.2.1	Identificação fenotípica e genotípica das cepas isoladas no efluente hospitalar. ....	68
4.2.2	Perfis de sensibilidade e resistência das cepas isoladas .....	70
4.2.3	Detecção molecular dos genes TEM, SHV e CTX-M das cepas isoladas .....	72
4.3	CARACTERIZAÇÃO DE ESBL EM CEPAS ISOLADAS NO EFLUENTE HOSPITALAR ...	77
5	CONCLUSÃO.....	79
	REFERÊNCIAS .....	81
	ANEXO 1: Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.....	91
	APÊNDICE A: Patente: Coletor de efluentes em profundidade .....	92
	APÊNDICE B: Artigo científico publicado .....	94

## 1 INTRODUÇÃO

As infecções associadas com bactérias resistentes a antimicrobianos estão relacionadas às altas taxas de adoecimento, mortalidade e aumento do tempo de internação no ambiente hospitalar, ocasionando efeitos à saúde pública e ao custo do tratamento dos pacientes infectados, sendo fator de grande preocupação para o corpo clínico de saúde e para a comunidade em geral (HARRIS et al., 2007).

Entre os mais variados mecanismos de resistência aos antimicrobianos, destaca-se a produção de enzimas que possuem a propriedade de inativar antimicrobianos (CARMO et al., 2012). A principal delas denomina-se betalactamase de espectro estendido (ESBL), que hidrolisam a cadeia oximino-betalactâmica, degradando antimicrobianos betalactâmicos como as penicilinas, cefalosporinas e monobactâmicos, exceto carbapenens, sendo suprimidas por inibidores de betalactamase, como clavulanato, sulbactam e tazobactam (MEYER; PICOLI, 2011). Mais de 430 ESBL foram caracterizadas, havendo descrição de muitas delas no Brasil (MUNIER et al., 2010; SILVA; LINCOPAN, 2012).

Os efluentes hospitalares não tratados podem ser graves problemas de saúde pública, pois são os grandes responsáveis pelo lançamento de microrganismos patogênicos portadores de genes de resistência a antimicrobianos no ambiente. Estes possivelmente contêm microrganismos que formam considerável banco genético associado à resistência bacteriana, levando em consideração que exista uma aglomeração de populações de bactérias patogênicas e não-patogênicas sob constante pressão de seleção evolutiva exercida pelo tratamento de pacientes com antimicrobianos. Desse modo, seria imperioso que resíduos sólidos e efluentes de origem hospitalar fossem sempre tratados com especial atenção, para a não disseminação de agentes infecciosos no ambiente (ARAÚJO et al., 2009).

Os antimicrobianos e os seus metabólitos são excretados com a urina e as fezes em águas residuais. A baixa eficácia do tratamento hospitalar de esgoto ou a falta de qualquer tratamento, podem contribuir para a difusão de bactérias multirresistentes de efluentes hospitalares para o esgoto municipal e, em seguida, para o meio ambiente diretamente nos corpos d'água (lagos/rios). Em águas residuais, especialmente no esgoto bruto, onde a densidade bacteriana é muito alta, esses microrganismos têm acesso a um grande intercâmbio de genes de resistências, realizando trocas genéticas entre as cepas (KORZENIEWSKA; HARNISZ, 2013).

Na última década, a resistência à antimicrobianos tem sido frequente nas unidades hospitalares e fora desta. A disseminação das cepas produtoras de enzimas relacionadas às ESBL tem sido reportada como uma preocupação mundial devido ao aumento da morbimortalidade. Estudos para a elucidação da diversidade e prevalência de bactérias produtoras de ESBLs em ambientes clínicos e destes para os efluentes hospitalares tornam-se necessários para a compreensão dos mecanismos de disseminação dos genes de resistência no meio ambiente, a geração de efluentes e sua liberação. Concentrações elevadas de cepas ESBL

positivas nos efluentes dos hospitais e nas estações de tratamento de esgoto podem transformá-los em reservatórios para a seleção de bactérias resistentes.

O diagnóstico clínico de ESBL em Roraima é baseado em resultados liberados por testes fenotípicos, considerados apenas como presuntivos para a presença de ESBL. A identificação dos genes de resistência e os subtipos relacionados é fundamental para determinar o perfil das betalactamases prevalentes no Estado.

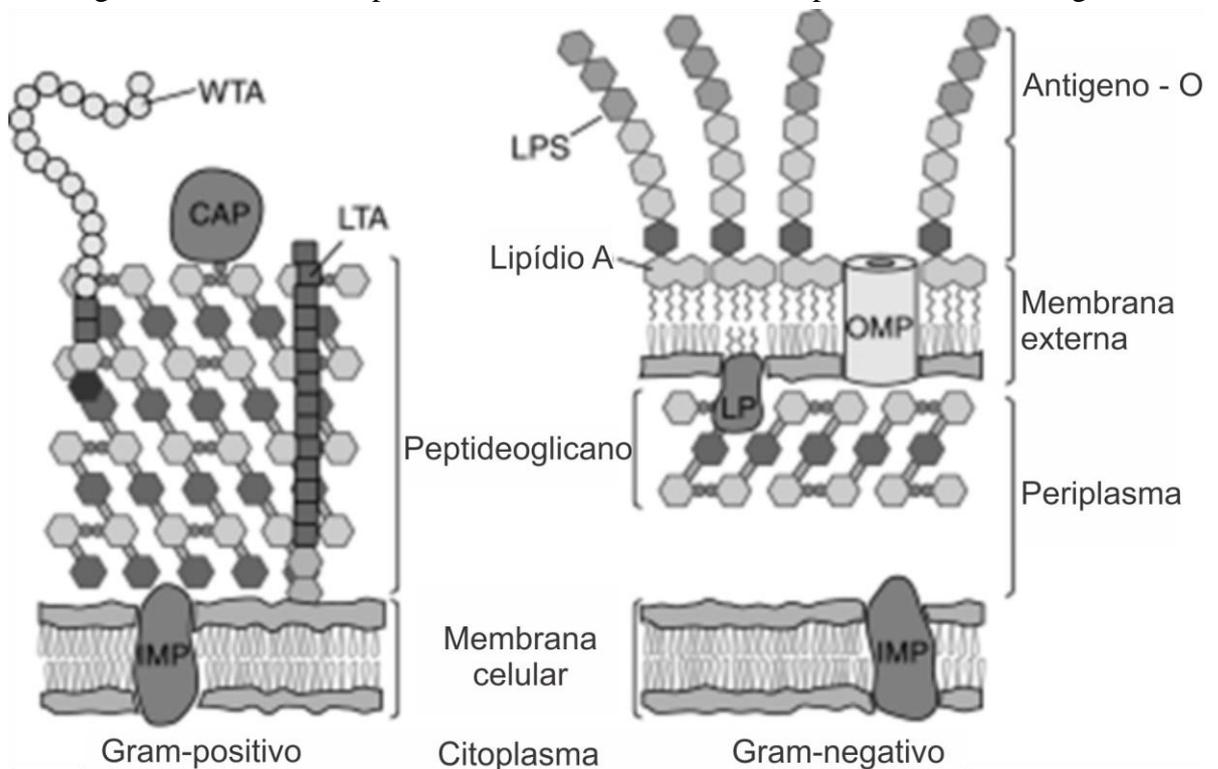
A caracterização dos diferentes genes e subtipos genéticos entre as cepas produtoras de betalactamases permitirá a análise da ocorrência e frequência desses genes, tanto no ambiente hospitalar como nos efluentes. A comparação entre esses dois ambientes possibilitará inferirmos o comportamento e as possíveis rotas de circulação e propagação desses genes, assim como a análise de dados de pesquisas realizadas em outros estados e países.

Esses dados podem gerar subsídios para discussões sobre o uso racional dos antimicrobianos além das instituições de saúde e o comportamento dessa transição entre o ambiente hospitalar e o meio ambiente. O que também nos possibilitará propor medidas visando a diminuição da contaminação ambiental através de tratamento dos resíduos hospitalares anteriormente à destinação a estação de tratamento, objetivando métodos eficazes de eliminação destes agentes.

## 1.1 ESTRUTURA BACTERIANA: CARACTERÍSTICAS GERAIS

Há mais de 120 anos, Christian Gram, em 1884, desenvolveu um procedimento de coloração que lhe permitiu classificar quase todas as bactérias em dois grandes grupos de acordo com a estrutura da parede celular (Figura 1): as Gram-positivas possuem uma espessa camada de peptideoglicano, componente essencial e específico da parede celular bacteriana, polímero de polissacarídeo formado por camadas alternadas de N-acetil-glicosamina e N-acetil-murâmico, interligadas entre si por tetrapeptídios. Já as Gram-negativas possuem uma fina camada de peptideoglicano que se associa ainda à uma membrana externa. Possuem também uma endotoxina, o lipopolissacarídeo (LPS), localizado na membrana externa, responsável pelo elevado grau de patogenicidade do grupo (BEVERIDGE, 1999). As principais funções da parede celular são a preservação da integridade bacteriana e o equilíbrio osmótico entre o meio intra e extracelular. Também contribui para a manutenção da forma bacteriana (VOLLMER et al., 2008).

Figura 1 – Estrutura da parede celular em bactérias Gram positivas e Gram-negativas



Fonte: adaptado de Silhavy et al., (2010).

Dentre as bactérias Gram-negativas, as Enterobacteriaceae representam uma das famílias com maior número de membros com potencial de patogenicidade e maior capacidade de adquirir resistência à antimicrobianos. A família das Enterobactérias caracteriza-se como cepas em forma de bacilos, móveis por flagelos com tamanho de aproximadamente 1-3 µm. São anaeróbios facultativos e seu habitat natural é o intestino humano e animal, onde pertencem à flora microbiana comensal (KOCSIS; SZABO, 2013).

Destacam-se nesse grupo os gêneros Citrobacter, Enterobacter, Escherichia, Klebsiella, Proteus, Salmonella, Shigella e Serratia como sendo os mais relacionados às infecções presentes no trato urinário, do trato respiratório, sangue e feridas e em e surtos de multirresistência (FARIÑAS; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, 2013).

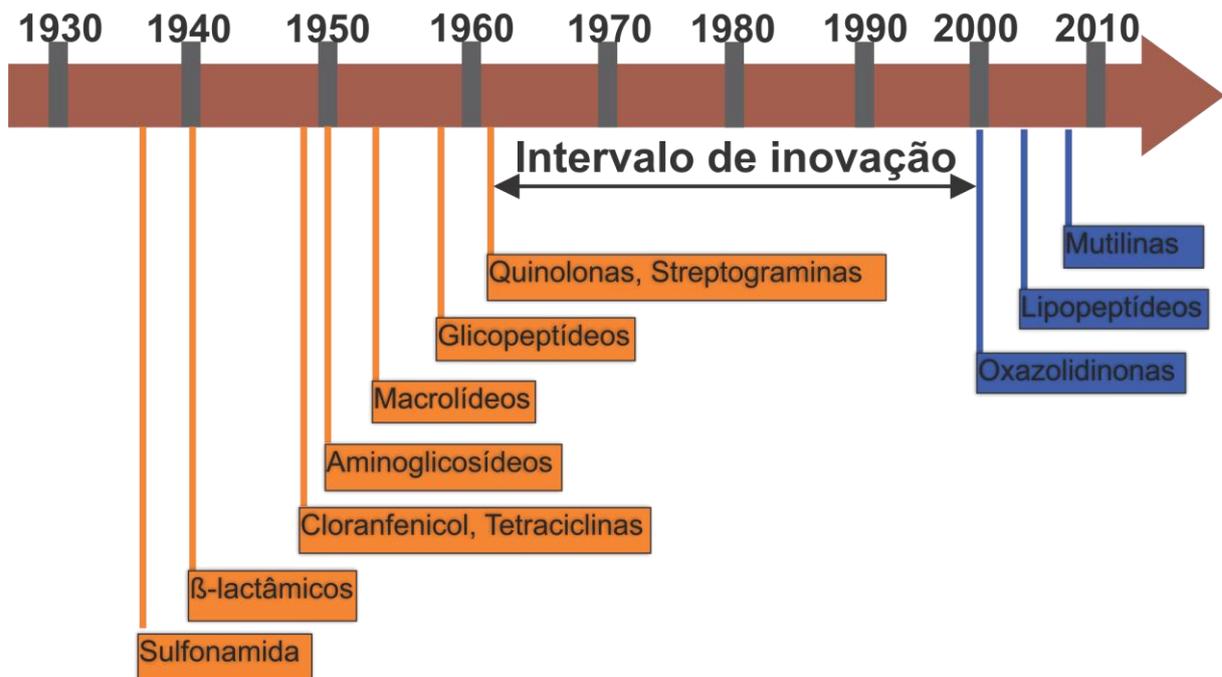
## 1.2 ANTIMICROBIANOS E MECANISMOS DE RESISTÊNCIA BACTERIANA

Antimicrobianos são substâncias ou compostos que destroem ou inibem o crescimento de bactérias. Aqueles que matam bactérias são considerados bactericidas, enquanto que aqueles que inibem o crescimento de organismos são denominados bacteriostáticos. São, uma das formas mais bem-sucedidas de quimioterapia na história da medicina. A "era moderna do surgimento de antimicrobianos" adviu dos anos de 30 e 40 com o nome de Paul Ehrlich. A ideia de Ehrlich de uma "bala mágica" que atinge seletivamente apenas micróbios causadores de doenças e não o hospedeiro iniciou a produção de compostos que inibissem a ação de microrganismos como Salvarsan (composto por arsênico) que era utilizado no tratamento de sífilis (SILVER, 2011).

Posteriormente, em 1935, os químicos da empresa Bayer, Josef Klarer e Fritz Mietzsch, descobriram que a substância Sulfa possuía grande ação de inibição bacteriana. Apesar de Alexander Fleming, ter descoberto a Penicilina em 03 de setembro de 1928, este postergou por 12 anos a fabricação do fármaco, na tentativa de obter químicos interessados em resolver persistentes problemas com a purificação e estabilidade da substância ativa. Fleming também estava entre os primeiros que advertiu sobre o potencial de resistência à penicilina se usado muito pouco ou demasiado para um curto período durante o tratamento de infecções (AMINOV, 2010).

A Figura 2 mostra os primeiros fármacos descobertos e as três classes mais recentemente introduzidas: mtilinas, lipopeptídeos e oxazolidinonas. É importante observar o intervalo de 40 anos (1960 a 2000) sem o surgimento de nenhuma nova classe.

Figura 2 – Cronologia de descobrimento das distintas classes de antimicrobianos



Fonte: adaptado de Silver (2011).

### 1.2.1 Mecanismos de escape à ação dos antimicrobianos.

Para sobreviver na presença de um antimicrobiano, os organismos bacterianos devem ser capazes de ter mecanismos de escape à ação efetiva do fármaco. Os modos de ação podem ser através de várias estratégias como impedir a entrada do antimicrobiano na célula bacteriana ou degradação do componente ativo do fármaco. Vários mecanismos diferentes podem atuar em conjunto para conferir resistência para um único agente antimicrobiano (THENMOZHI et al., 2014).

São quatro as principais estratégias de resistência bacteriana:

- (1) Impedir o antimicrobiano de atingir o seu alvo, reduzindo a sua capacidade de penetrar na célula;
- (2) Modificação do alvo do antimicrobiano;

(3) Expulsão dos agentes antimicrobianos a partir da célula através de bombas de efluxo específicas;

(4) Inativação de agentes antimicrobianos através de modificação ou degradação.

Compostos antimicrobianos acessam canais proteicos de porina para atravessar a membrana externa bacteriana e assim atingir seus alvos, como os ribossomos e as proteínas ligadoras de Penicilina – PBPs (atuam na ligação das moléculas de peptídeos da parede celular), alterando assim a atividade bacteriana e levando à morte celular. A modificação destes canais impede os antimicrobianos de agir no meio intracelular. Algumas bactérias resistentes à antimicrobianos podem alterar ou camuflar alvos críticos para evitar o reconhecimento. Como a modificação na estrutura das PBPs, e a não ligação do antimicrobiano por não reconhecimento do alvo de ligação na molécula. Assim, apesar da presença do composto antimicrobiano, a cepa permanecerá intacta e ativa (BROLUND, 2014). Na Tabela 1 estão evidenciados os principais antimicrobianos, com respectivos mecanismo de ação dos antibióticos e mecanismos bacterianos de resistência.

Tabela 1 – Principais classes de antimicrobianos (continua)

<b>Antimicrobianos</b>	<b>Mecanismo de ação do antibiótico</b>	<b>Mecanismo bacteriano de Resistência</b>
<b>Beta Lactâmicos</b>		
Penicilinas	Inibição da parede celular bacteriana através da adesão às proteínas ligadoras de penicilinas (PBPs)	Destruição enzimática do anel beta lactâmico
Cefalosporinas		Modificação do Alvo (PBP)
Carbapenênicos		Acumulação intracelular reduzida (transporte ativo do ATB)
<b>Glicopeptídeos</b>	Inibem os estágios finais de montagem da parede celular, prevenindo as reações de ligação cruzada	
Vancomicina		Modificação do alvo (PBP)
Teicoplanina		Produção de falsos alvos

Tabela 1 – Principais classes de antimicrobianos (continuação)

<b>Antimicrobianos</b>	<b>Mecanismo de ação do antibiótico</b>	<b>Mecanismo bacteriano de Resistência</b>
<b>Quinolonas</b>		
<b>Fluoroquinolonas</b>		
Norfloxacina	Tem como alvos a DNA girase e topoisomerase IV das bactérias e inibem a etapa necessária de super enrolamento do material genético	Modificação de alvo
Ciprofloxacina		Acumulação intracelular reduzida (transporte ativo do ATB)
Levofloxacina		
Gatifloxacina		
Moxifloxacina		
<b>Aminoglicosídeos</b>		
Gentamicina	Tem como alvo a subunidade ribossomal 30s e se ligam à ela para causar leitura errada do código genético que resulta na inibição da síntese de proteínas	Modificação estrutural do ATB
Tobramicina		Modificação do alvo
Amicacina		Redução da Absorção do ATB
Netilmicina		
Paramomicina		
Espectinomomicina		
<b>Macrolídeos</b>		
Eritromicina	Tem como alvo a subunidade ribossomal 50s e se ligam à ela para inibir a translocação e o processo de formação da transpeptidase, que resulta na inibição da síntese de proteínas	Redução da Absorção Intracelular do ATB
Claritromicina		Modificação do alvo
Azitromicina		
<b>Mutilins</b>		
Retapamutilin		
<b>Oxazolidinonas</b>		
Linezolida	Exerce sua atividade por inibição da síntese proteica	Raros relatos de resistência por mutação do gene ribossomal 23S

Tabela 1 – Principais classes de antimicrobianos (conclusão)

<b>Antimicrobianos</b>	<b>Mecanismo de ação do antibiótico</b>	<b>Mecanismo bacteriano de Resistencia</b>
<b>Polipetídeos</b>		
Colistina (Polimixina E)	Retiram cálcio e Magnésio da membrana externa ocasionando dano estrutural e falha na permeabilidade celular levando à morte da célula.	Modificação do Alvo
Polimixina B		
<b>Tetraciclínas</b>	Tem como alvo a subunidade ribossomal 30s e se ligam a ela para prevenir o acoplamento do RNAt ao RNA do Complexo Ribossomal, inibindo a síntese de proteínas	Acumulação intracelular reduzida (transporte ativo do ATB) Modificação do alvo
<b>Rifampicinas</b>	Interagem com a subunidade beta da RNA-polimerase bacteriana bloqueando a síntese do RNA	Modificação do alvo
<b>Sulfonamidas</b>	Tem como alvo as diidropteroato sintetase (DHPS) prevenindo a adição de ácido para-aminobenzóico (PABA), inibindo a síntese de ácido fólico	Modificação do alvo
Sulfametoxazol		
<b>Cloranfenicol</b>	Tem como alvo a subunidade ribossomal 50s, inibindo a síntese proteica	

Fonte: adaptado de DAVIES (2010).

Para serem eficazes, agentes antimicrobianos também devem estar presentes numa concentração suficiente no interior da célula bacteriana para provocar o efeito correspondente. Algumas bactérias possuem proteínas da membrana que atuam como uma bomba de exportação para determinados antimicrobianos, expulsando o fármaco para fora da célula. Isto resulta em baixas concentrações intracelulares que são insuficientes para provocar efeito. Algumas bombas de efluxo expulsam seletivamente antimicrobianos específicos, tais como macrólídeos, lincosamidas, estreptograminas e tetracilinas (BRADFORD, 2001).

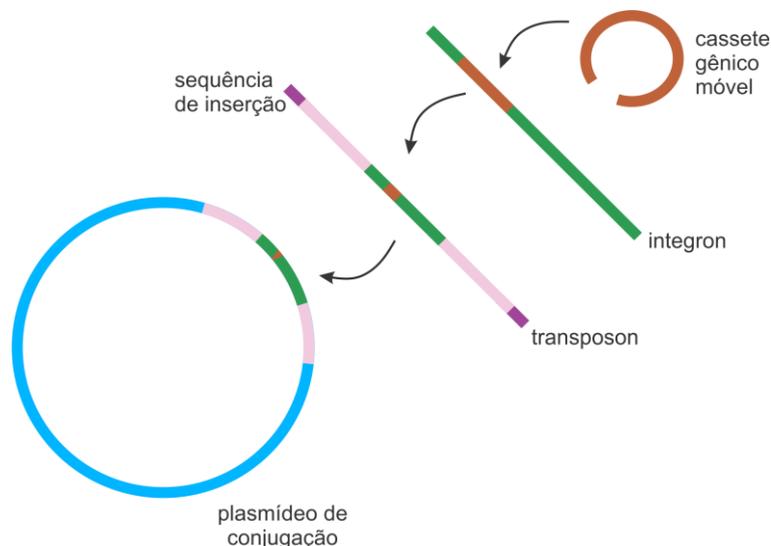
Um outro meio pelo qual as bactérias preservam-se, é a destruição do componente ativo do agente antimicrobiano. Um exemplo clássico é a desativação hidrolítica do anel betalactâmico em penicilinas e cefalosporinas pela enzima bacteriana chamada beta lactamase (THENMOZHI et al., 2014).

### 1.2.2 Mecanismo genético de resistência: transferência horizontal de genes

A transferência horizontal do gene, ou o processo de troca de material genético entre cepas, é um mecanismo pelo qual a resistência pode ser adquirida. Muitos dos genes de resistência à antimicrobianos são transportados em plasmídeos, transposons ou integrons (NORMAN et al., 2009.).

Plasmídeos são elementos genéticos compostos de DNA de cadeia dupla, que replicam-se independentemente do cromossomo da célula bacteriana hospedeira. Os plasmídeos (Figura 3) são altamente diversificados e seu genoma é frequentemente disperso com elementos genéticos móveis, que se movem em torno de genes dentro deste, e entre este e o cromossoma bacteriano. Exemplos de elementos genéticos móveis encontrados em plasmídeos são transposons, integrons e sequências de inserção (ISCR), dos quais o último é associado a genes de ESBL (BENNETT, 2008).

Figura 3– Representação do plasmídeo e seus elementos genéticos móveis



Fonte: modificado de Norman et al., (2009).

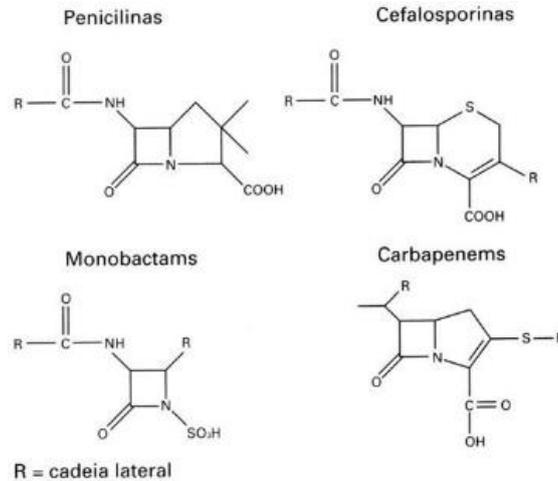
Os transposons são elementos genéticos capazes de mover-se através do genoma, mediados pela enzima transposase podem realizar transferência de genes de resistência. Integrons compreendem um sistema especializado de recombinação que consiste de um gene *int*, que codifica uma enzima de recombinação específica chamada integrase, um local que contém sequências de DNA curtas chamadas cassetes de genes e um sítio de ligação para estes cassetes denominado *att*. Estes são elementos móveis que incluem um único gene (mais comumente um gene de resistência a antimicrobianos) e são inseridos no integron pela enzima integrase. Um cassete de gene é definido como uma molécula pequena, autônoma não-replicante de cadeia dupla circular de DNA e que não têm promotores para expressar os genes que carregam. Sequências de inserção são elementos capazes de mobilizar sequências de DNA adjacentes, por conseguinte, constituem uma forma muito eficaz de transferência de genes de resistência (OCHMAN et al., 2000)

A transferência horizontal de genes pode ocorrer através de três mecanismos principais: transformação, transdução ou conjugação. A transformação envolve a captação de pequenos fragmentos de DNA dispersos e que são incorporados ao DNA bacteriano. Essas bactérias ficam geneticamente modificadas e são chamadas transformadas. A transdução envolve a transferência do DNA de uma bactéria para outra por meio de vírus bacteriófagos. A conjugação envolve a transferência de DNA via *pilus* sexual e requer contato célula-célula. Genes que contêm fragmentos de DNA de doadores resistentes à antimicrobianos podem tornar bactérias anteriormente sensíveis a determinados fármacos, a expressar resistência codificada por esses genes recém-adquiridos (VAIDYA et al., 2011).

### 1.3 ANTIMICROBIANOS BETALACTÂMICOS

Os antimicrobianos betalactâmicos representam a classe mais utilizada clinicamente, sendo composta por penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e os carbapenêmicos (Tabela 1) e tem em comum a presença do anel Beta Lactâmico. Estes fármacos agem na inibição da enzima transpeptidase, cuja atividade leva a formação de ligações cruzadas entre as cadeias peptídicas da estrutura peptidoglicana, que confere resistência a parede celular (CHANDRAMOHAN; REVELL, 2012)

Figura 4 – Antimicrobianos betalactâmicos



Fonte: adaptado de Drawz e Bonomo (2010)

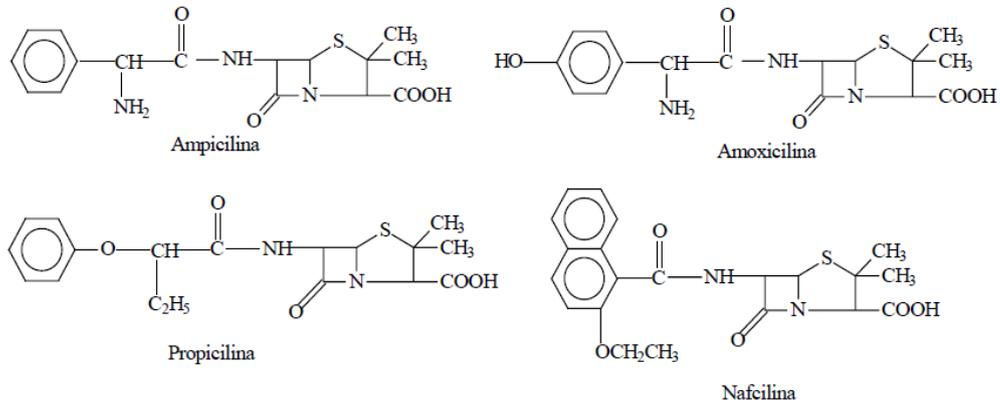
Ao longo dos últimos 20 anos, novos antimicrobianos betalactâmicos têm sido desenvolvidos, especificamente concebidos para serem resistentes à ação de enzimas hidrolíticas. No entanto, com cada nova classe que tem sido utilizada para tratar pacientes, emergem novas enzimas que tornam as cepas resistentes à estas drogas. Presumivelmente, a pressão seletiva do uso indiscriminado de novos antimicrobianos no tratamento de infecções proporcionou o surgimento de variantes de cepas resistentes (DAVIES; DAVIES, 2010).

### 1.3.1 Penicilinas

O grupo das Penicilinas, engloba mais de 50 antimicrobianos quimicamente relacionados, primeiro grupo a ser desenvolvido e utilizado contra bactérias patogênicas, atuam realizando a ligação cruzada entre peptídeoglicanos, o que interfere nos estágios finais da construção das paredes celulares (ESSACK, 2001).

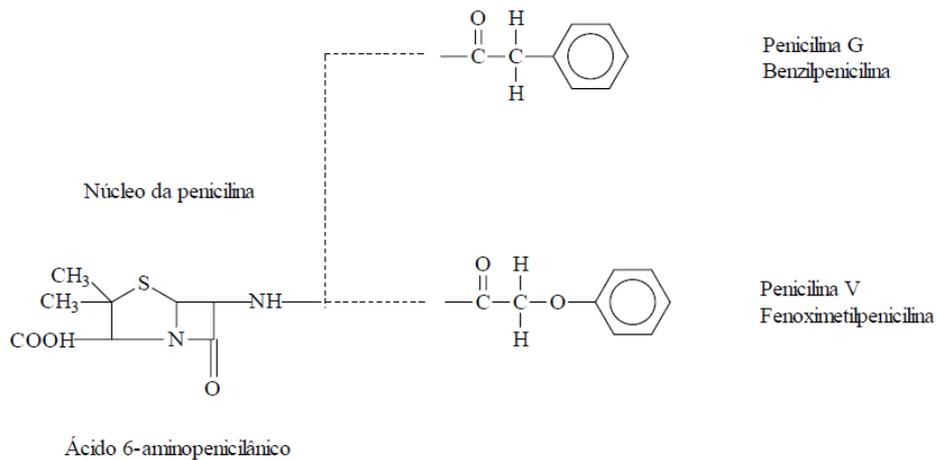
As penicilinas dependendo da forma de obtenção podem ser classificadas em natural ou semi-sintética, sendo esta desenvolvida na tentativa de superar as desvantagens das penicilinas naturais, por apresentarem maior estabilidade e absorção, além de exibirem diminutos efeitos colaterais. As penicilinas naturais são aquelas extraídas a partir do cultivo do fungo *Penicillium*, as penicilinas G e V são as mais utilizadas na terapêutica. A estrutura das penicilinas está demonstradas na figuras 5 e 6 (PAPP-WALLACE et al., 2011).

Figura 5 – Penicilinas semissintéticas



Fonte: adaptado de Drawz e Bonomo (2010)

Figura 6– Penicilinas naturais G e V



Fonte: adaptado de Drawz e Bonomo (2010)

### 1.3.2 Cefalosporinas

A primeira fonte de cefalosporina, o fungo *Cephalosporium acremonium*, foi isolada no ano de 1948, a molécula possuía um espectro de ação superior a Penicilina G. As cefalosporinas foram descobertas para combater as infecções por cepas produtoras de beta-lactamase. Posteriormente, estas cepas tornaram-se resistentes à primeira geração de cefalosporina sintetizada. A introdução da segunda geração de cefalosporinas, foi capaz de

corrigir a deficiência da classe anterior . Mas o alívio desta descoberta foi de curta duração com o surgimento de resistência (LAUDANO, 2011).

Em geral, as cefalosporinas de menor geração têm mais atividade contra cepas Gram-positivas e as de maior geração, atividade contra cepas Gram-negativas. O cefepime, fármaco de quarta geração é uma exceção, com atividade à bacterias Gram-positivas equivalente à primeira geração e em cepas Gram-negativas equivalente à terceira geração de cefalosporinas. A Terceira geração é menos ativa contra cocos Gram positivos, é utilizada amplamente no tratamento de infecções, como exemplo, as pneumonias. Devido à 3ª e 4ª gerações possuírem atividade contra Gram positivos (moderada na 3ª geração) e Gram negativos, são consideradas gerações de amplo espectro. As cefalosporinas divididas em 4 grupos, denominados 1ª, 2ª, 3ª e 4ª geração, estão descritas na Tabela 2 (THENMOZHI et al., 2014).

Tabela 2 – Classificação das cefalosporinas por geração e espectro de ação.

Geração	Espectro de Atividade		Antimicrobiano
	Gram +	Gram -	
1ª	+++	+/-	Cefalotina
			Cefazolina
			Cefalexina
			Cefradroxila
			Cefoxitina
2ª	++	+	Cefuroxina
			Cefaclor
			Cefotaxima
			Ceftriaxona
3ª	+	+++	Ceftazidima
			Cefepima

Fonte: adaptado de Laudano (2011)

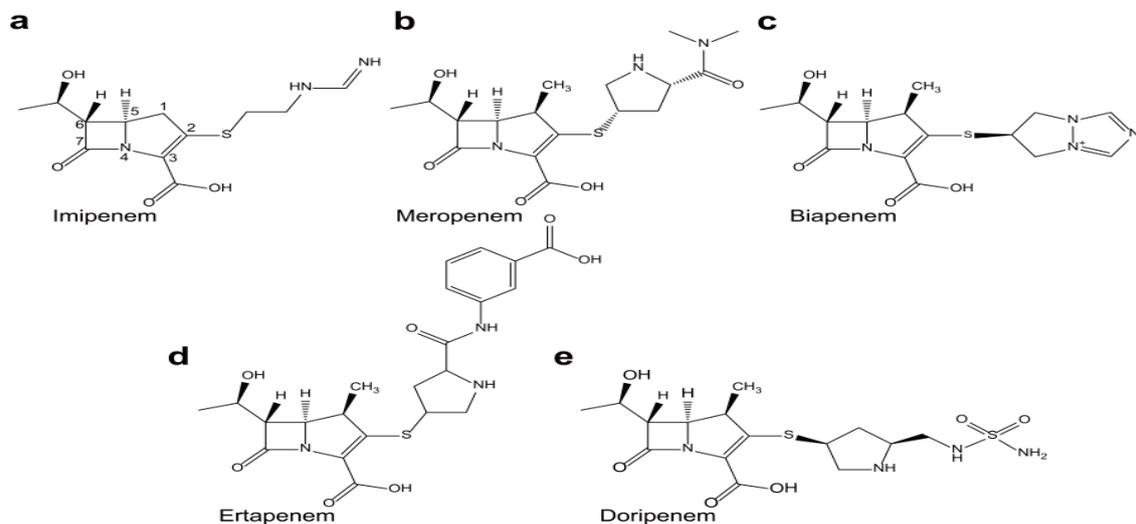
### 1.3.3 Carbapenêmicos

Os carbapenêmicos surgiram, no final da década de 70, originam-se da tienamicina, que ocorre naturalmente da bactéria *Streptomyces cattleya*, estes já foram considerados as últimas linhas de defesa contra infecções por microrganismos multirresistentes, produtoras de ESBL (BENNET, 2008).

Os antimicrobianos da classe dos carbapenêmicos contém um anel beta-lactâmico ligado a um anel pirrolidínico compartilhando uma molécula de nitrogênio. (PAPP-WALLACE et al., 2011).

A tienamicina não demonstrou ser um potente antimicrobiano, entretanto foi utilizado como molde para a fabricação todos os outros derivados deste antibiótico, sendo o que melhor evidenciou propriedades para terapia clínica foi o imipenem. Nos dias de hoje há novos carbapenêmicos para uso clínico como o meropenem, biapenem, ertapenem e doripenem, conforme evidenciado na Figura 7 (JEON, 2015).

Figura 7– Estrutura química dos antimicrobianos derivados do carbapenêmicos



Fonte: Jeon et al., (2015).

### 1.3.4 Monobactâmicos

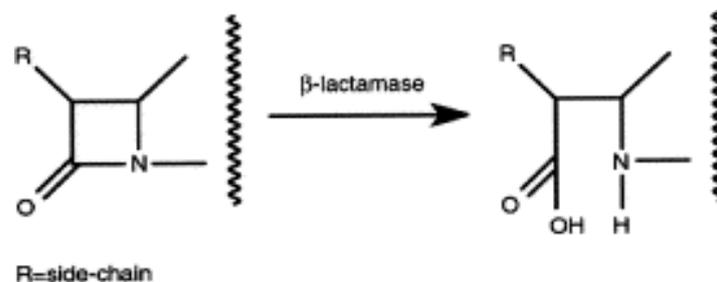
Os antimicrobianos monobactâmicos, extraídos a partir da bactéria *Nocardia uniformis*, foram descobertos em 1975, o único comercializado é o Aztreonam. Tem atividade

contra a maioria dos bacilos Gram-negativos, incluindo a *Pseudomonas aeruginosa* que é evidenciada por resistência a múltiplos fármacos. Não é descrito como nefrotóxico, é fracamente imunogênico, e não tem sido associado com distúrbios de coagulação. O composto aztreonam é utilizado principalmente como uma alternativa aos aminoglicosídeos e as indicações aprovadas para a sua utilização incluem infecções do trato urinário ou do trato respiratório inferior, infecções intra-abdominais e ginecológicas, septicemia e infecções cutâneas provocadas por organismos susceptíveis. Possui elevada estabilidade, igual ou superior as cefalosporinas de 3ª geração (HELLINGER, Walter C.; BREWER, 1999).

#### 1.4 BETA-LACTAMASES

A hidrólise do anel betalactâmico central dos antimicrobianos pertencentes a este grupo (Figura 8) ocorre através da enzima hidrolítica beta-lactamase, que ao clivar o anel, confere o primeiro mecanismo de resistência bacteriana aos antimicrobianos betalactâmicos. A separação em duas partes leva à formação de um complexo ácido inerte, desprovido de atividade biológica funcional. As bactérias produtoras de beta-lactamases de espectro estendido também apresentam resistência às outras drogas não-betalactâmicas (aminoglicosídeos, quinolonas, cloranfenicóis), o que causa um verdadeiro dilema no que diz respeito à terapêutica a ser utilizada em infecções relacionadas às ESBLs (AHMED et al., 2013; MEYER; PICOLI, 2011; RIVA et al., 2008).

Figura 8 – Hidrólise do anel Betalactâmico



Fonte: ZARFEL et al., (2013).

O método original de categorização destas enzimas, baseia-se na Classificação de Ambler, que organiza estas em 4 classes (A, B, C e D) baseado na estrutura molecular

(DHILLON; CLARK, 2011). A maioria das ESBL pertencem à classe A, que é caracterizada pela adição do aminoácido serina no local ativo da enzima, uma massa molecular de aproximadamente 29.000 Daltons, e a hidrólise preferencial de penicilinas. Esta classe inclui enzimas tais como TEM-1, SHV-1, e a penicilinase encontrada em *S. aureus*.

Atualmente, cerca de 300 genes de ESBL foram descritos, todos codificantes de beta-lactamases dos grupos A e D de Ambler e agrupados em diferentes famílias de genes de ESBL (ZARFEL *et al.*, 2013).

Mais recentemente, um sistema de classificação foi concebido por Bush e Jacoby (2010), que utiliza as propriedades bioquímicas da enzima mais a estrutura molecular e a sequência de nucleotídeos dos genes relacionados e os classifica em grupos funcionais (Tabela 3).

Tabela 3– Classificação das enzimas de beta-lactamases de acordo com o gene e grupo funcional (continua)

<b>Família Enzimática</b>	<b>Grupo ou subgrupo funcional</b>	<b>Número de enzimas</b>	<b>Enzimas representativas</b>
<b>CMY</b>	1, 1e	50	CMY-1 a CMY-50
	2b, 2be, 2br, 2ber	172	
	2b	12	TEM-1, TEM-2, TEM-13
<b>TEM</b>	2be	79	TEM-3, TEM-10, TEM-26
	2br	36	TEM-30 (IRT-2), TEM-31 (IRT-1), TEM-163
	2ber	9	TEM-50 (CMT-1), TEM-158 (CMT-9)
<b>SHV</b>	2b, 2be, 2br	127	
	2b	30	SHV-1, SHV-11, SHV-89
	2be	37	SHV-2, SHV-3, SHV-115
	2br	5	SHV-10, SHV-72

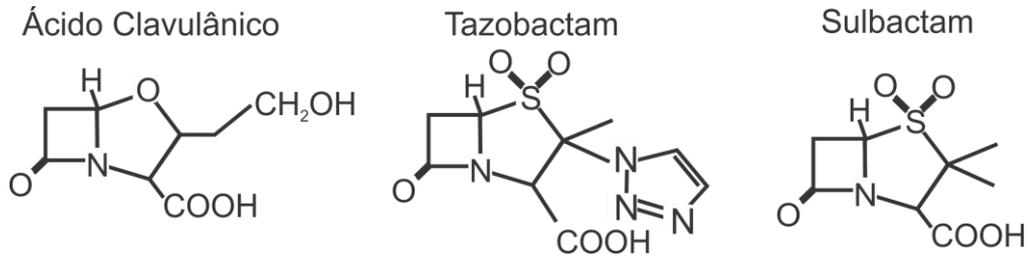
Tabela 3 – Classificação das enzimas de beta-lactamases de acordo com o gene e grupo funcional (conclusão)

<b>Família Enzimática</b>	<b>Grupo ou subgrupo funcional</b>	<b>Número de enzimas</b>	<b>Enzimas representativas</b>
<b>CTX-M</b>	2be	90	CTX-M-1, CTX-M-44 (Toho-1) a CTX-M-92
<b>PER</b>	2be	5	PER-1 a PER-5
<b>VEB</b>	2be	7	VEB-1 a VEB-7
<b>GES</b>	2f	15 <i>d</i>	GES-2 a GES-7 (IBC-1) a GES-15
<b>KPC</b>	2f	9	KPC-2 a KPC-10
<b>SME</b>	2f	3	SME-1, SME-2, SME-3
	2d, 2de, 2df	158	
<b>OXA</b>	2d	5	OXA-1, OXA-2, OXA-10
	2de	9	OXA-11, OXA-14, OXA-15
	2df	48 <i>e</i>	OXA-23 (ARI-1), OXA-51, OXA-58
<b>IMP</b>	3 <sup>a</sup>	26	IMP-1 a IMP-26
<b>VIM</b>	3 <sup>a</sup>	23	VIM-1 a VIM-23
<b>IND</b>	3 <sup>a</sup>	8	IND-1, IND-2, IND-2a, IND-3 a IND-7

Fonte: adaptado de Bush;Jacoby (2010).

Utilizando este sistema proposto pelos autores supracitados, ESBLs são definidas como enzimas capazes de hidrolisar oximino-cefalosporinas que caracterizam-se por serem inibidas pelo ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam (Figura 9) que associados à antimicrobianos atuam como inibidores destas enzimas (DRAWZ; BONOMO, 2010).

Figura 9 – Inibidores de beta-lactamases



Fonte: adaptado de Drawz; Bonomo (2010)

A função dos inibidores de beta-lactamases ocorre devido a uma cadeia lateral modificada que se liga à enzima, mantendo-a inativa. O tratamento utilizando os inibidores em associação com outros betalactâmicos podem ser boas opções de tratamento por exemplo ceftazidima/ác clavulânico (PATERSON; BONOMO, 2005).

#### 1.4.1 Epidemiologia das Beta-Lactamases

Organismos produtores de ESBL foram detectados pela primeira vez na Europa. Embora os relatórios iniciais sejam da Alemanha e Inglaterra, a vasta maioria destes para a primeira década após a descoberta de ESBLs são provenientes da França. O primeiro grande surto no país foi relatado em 1986 quando 54 pacientes em três unidades de terapia intensiva foram infectados e ocorreu a propagação da infecção a outras quatro enfermarias. No início da década de 1990, de 25 a 35% das infecções hospitalares relacionadas à *Klebsiella pneumoniae* na França eram cepas produtoras de ESBL (ZARFEL et al., 2013).

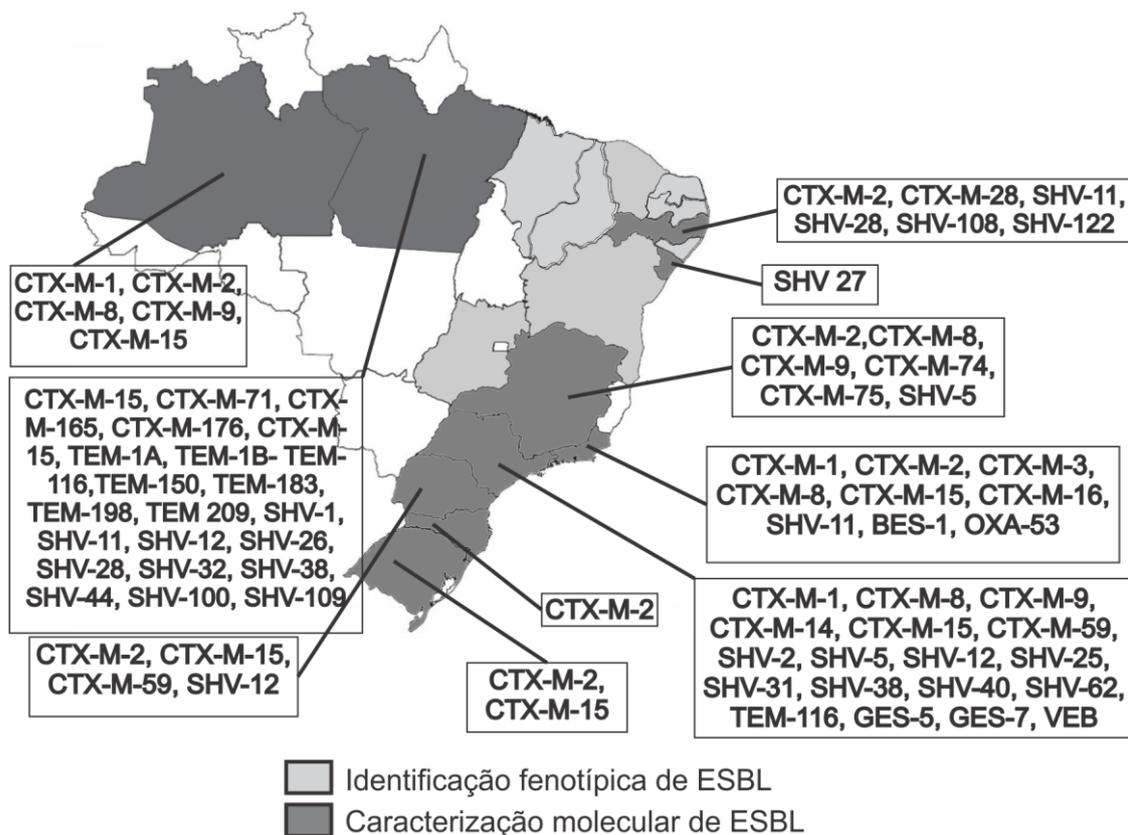
A epidemiologia dos genes de ESBL está mudando rapidamente e mostra diferenças marcantes na distribuição geográfica de genótipos relacionados à produção destas enzimas. Nos Estados Unidos, o gene de resistência mais prevalente em humanos é atualmente o gene CTX, o qual muitas vezes está associado com uma variante amplamente distribuída de *Escherichia coli*. As bactérias que contêm os genes de ESBL são atualmente uma causa comum de infecções originárias em pessoas que vivem na comunidade sem história de hospitalização, e esses organismos podem, em seguida, ser introduzido em hospitais (OVERDEVEST et al., 2011).

Infecções por bactérias produtoras de beta-lactamases estão amplamente disseminadas em ambientes hospitalares adultos e neonatais. Em estudos relacionados a neonatos no Brasil,

Itália, Suíça e Espanha, entre 12 a 50% dos pacientes colonizados com bactérias positivas para ESBL desenvolveram infecções sanguíneas, com hemoculturas positivas (NORDBERG et al., 2013). As ESBLs são encontradas com frequência em 30 a 60% em cepas de *Klebsiella* em unidades de terapia intensiva adulta no Brasil, Colômbia e Venezuela. Relatórios similares de organismos produtores de ESBL também ocorrem na América Central e Caribe (HARRIS et al., 2007).

No Brasil, ainda não existem programas de monitoramento relativos à distribuição de ESBL para o controle da resistência antimicrobiana e análise da frequência destas enzimas em cada Estado. O Mapa de resistência à ESBL no Brasil, apresenta várias lacunas em diferentes Estados, demonstrando a insuficiência dos dados em várias regiões, principalmente na região Norte (Figura 10).

Figura 10 – Distribuição de ESBL em Enterobacteriaceae no Brasil.



Fonte: Adaptado de Marques (2016) e Santos (2016).

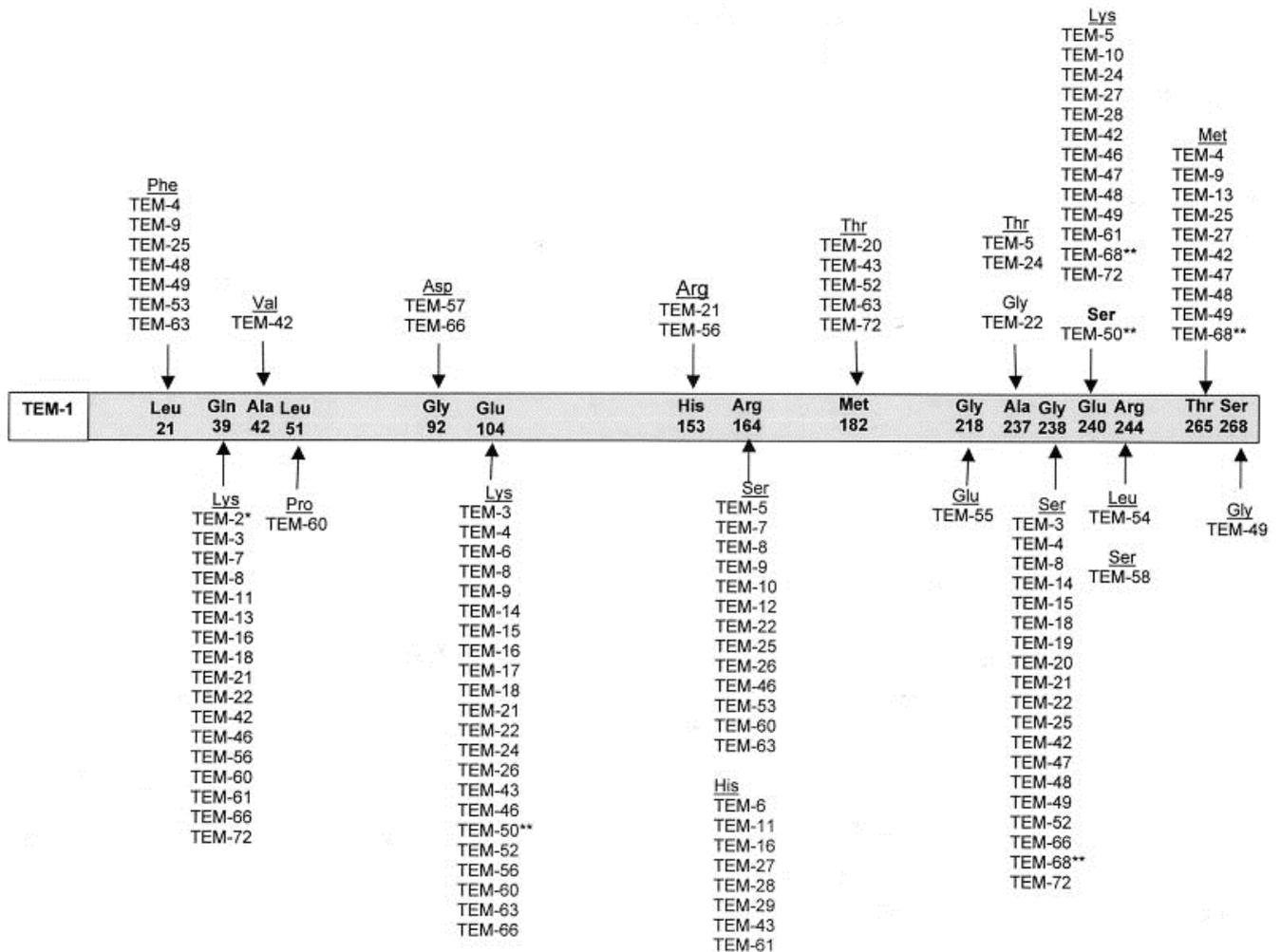
### 1.4.2 Genes Relacionados à ESBLs

Os genes relacionados à ESBL estão localizados em plasmídeos que podem ser facilmente transferidos entre as espécies bacterianas. Com o passar dos anos e o uso progressivo de antimicrobianos betalactâmicos, os genes responsáveis por atribuir esta característica enzimática sofreram mutações que levaram ao surgimento de diferentes “tipos” de beta-lactamases. As mais comuns são as codificadas pelos genes TEM (Temoniera, nome da paciente em que foi identificado pela primeira vez) e SHV (Sulfidril variável, característica química do gene) que possuem grande espectro de atividade, pois induzem resistência a importantes antimicrobianos de diferentes gerações, denominadas de beta-lactamases de Espectro Estendido - ESBLs – *extended spectrum beta-lactamases*.

Até o início do século XX, a maioria dos relatos da presença de beta-lactamases de espectro estendido eram decorrentes da mutação das enzimas relacionadas aos genes TEM e SHV e descritos como infecções cruzadas em pacientes hospitalares (LEISTNER et al., 2013). Nos últimos 15 anos, os genes TEM e SHV tem sido substituídos em predominância entre as enterobactérias pelos genes CTX-M e deixaram de ser exclusivamente hospitalar e passaram a ser encontrados também em infecções comunitárias (LIVERMORE et al., 2012; OVERDEVEST et al., 2011; PATTARACHAI et al., 2008).

As enzimas TEM e SHV compartilham em comum 68% das sequências de aminoácidos, são penicilinas e cefalosporinas usualmente encontradas em plasmídeos ou transposons porém, apresentam atividade insignificante contra os antimicrobianos cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona ou aztreonam. Alterações em resíduos de aminoácidos são especialmente importantes para a produção do fenótipo ESBL, estas incluem no gene TEM as substituições de glutamato para lisina na posição 104, a arginina, quer serina ou histidina na posição 164, de glicina para serina na posição 238, e glutamato para lisina na posição 240 (BRADFORD, 2001). As alterações de aminoácidos e as variações do gene TEM estão descritas na Figura 11.

Figura 11 – Gene TEM, variações de aminoácidos e variantes do gene.

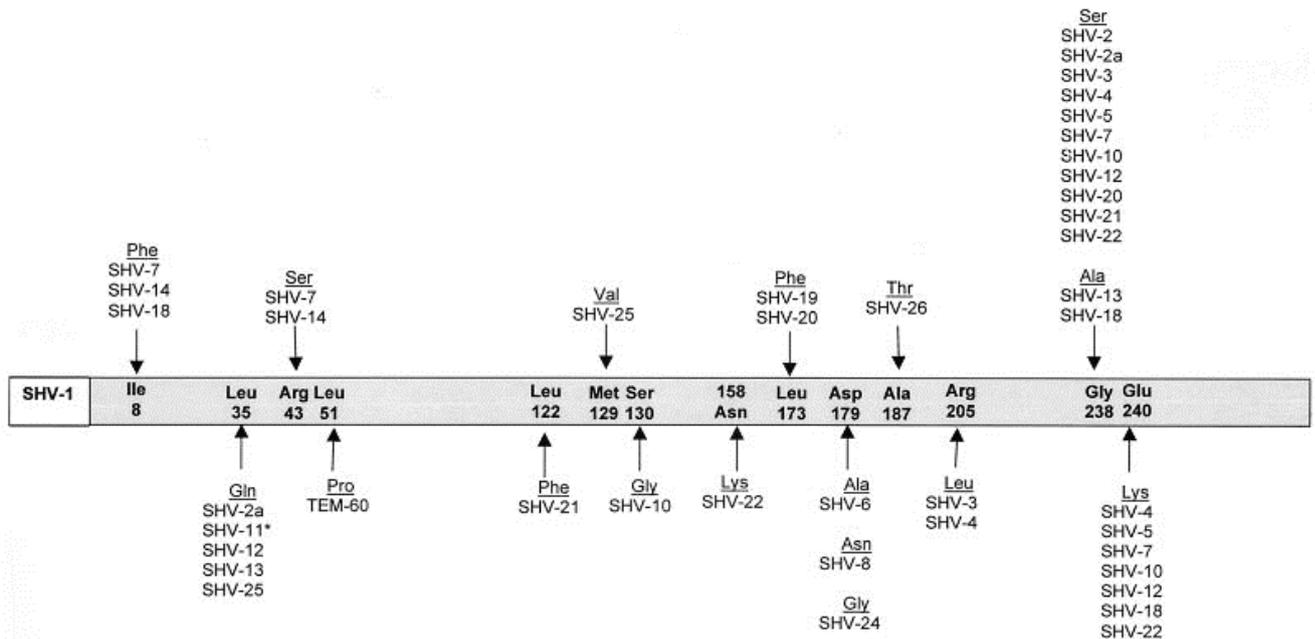


Fonte: Bradford (2001)

Legenda: A barra cinza compartilha as informações do gene estrutural TEM-1 e ao longo desta demonstra as substituições de aminoácidos e a conseqüente derivação do gene.

O gene SHV compartilha das mesmas alterações nas posições 238 e 240 do gene TEM, o resíduo de serina na posição 238 é crítico para a hidrólise eficiente de ceftazidima, e o resíduo de lisina para a hidrólise de cefotaxima (BRADFORD, 2001). As substituições de aminoácidos e a derivação dos genes de SHV estão demonstrados na Figura 12.

Figura 12 – Gene SHV, variações de aminoácidos e variantes do gene



Fonte: Bradford (2001).

Legenda: A barra cinza compartilha as informações do gene estrutural SHV-1 e ao longo desta demonstra as substituições de aminoácidos e as variantes de SHV.

O gene CTX-M surgiu em referência a capacidade hidrolítica ao antimicrobiano cefotaxima (sigla: CTX – cefotaxima) e o “M” é referência à Munique, local em que foi primeiramente descrito, a partir de um isolado de *E. coli* (SILVA et al., 2014). Análises filogenéticas sugerem que o gene CTX-M surgiu de forma independente dos outros tipos de ESBLs, a partir de genes cromossomais de *Kluyvera spp.* e posteriormente através da aquisição de elementos genéticos móveis passou a ser um gene plasmidial (CARMO et al., 2012; PARTRIDGE, 2015).

A enzima CTX-M, tendo sido descoberta no ano de 1989 quase que simultaneamente na Europa e América do Sul, atingiu proeminência sobre outras enzimas no ano de 2000. Atualmente existem mais de 130 enzimas. Diversas mutações pontuais foram intensificadas pelo uso indiscriminado de antimicrobianos, ocasionando o surgimento de cinco genótipos diferenciados entre si pelas suas sequências de aminoácidos, sendo estes, os subgrupos CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9, CTX-M-25 (FOURNIER et al., 2013; PARTRIDGE, 2015). As enzimas CTX apresentam a identidade de cerca de 40% com as enzimas TEM e SHV e em geral não hidrolisam a cefazidima, exceto a variante CTX-M-15 (CHAVES et al., 2001; RIVA et al., 2008).

A análise da epidemiologia de organismos produtores destas enzimas mostra-se bastante preocupante devido ao seu potencial infeccioso não estar limitado ao ambiente hospitalar, ultrapassando a barreira comunitária. Este fator torna a presença desta enzima e a consequente disseminação uma ameaça para a saúde pública (GUDIOL et al., 2010). Além disso, um estudo realizado com estirpes de Enterobacteriaceae que transportavam variantes dos genes CTX-M, SHV e TEM, mostraram que a co-resistência foi predominante em um número significativo de linhagens, apresentando altos valores de resistência para diferentes classes de antimicrobianos não-beta-lactâmicos como as quinolonas e aminoglicosídeos (FEGLO et al., 2013)

Outros importantes genes que produzem beta-lactamases já encontram-se descritos, como os do tipo VEB, PER, BEL-1, BES-1, SFO-1, TLA e IBC. Mas não possuem distribuição tão ampla quanto os citados anteriormente TEM, SHV e CTX (LIVERMORE et al., 2012).

## 1.5 EFLUENTES HOSPITALARES

Efluentes hospitalares caracterizam-se como possíveis veículos de disseminação de inúmeros microrganismos patogênicos, além de apresentarem grandes concentrações de antimicrobianos e medicamentos excretados pelas vias urinária e fecal de pacientes. Quando não tratados, estes efluentes são importantes contaminantes de mananciais de água, tanto superficial quanto subterrânea, e linhagens multirresistentes de antimicrobianos podem representar riscos à saúde pública se atingirem o sistema de abastecimento (SILVA et al., 2011; VECCHIA et al., 2009).

Com relação aos efluentes gerados nessa atividade, não há levantamento adequado sobre sua destinação, tampouco sobre tratamentos implementados nas instituições de saúde. Sabe-se, no entanto, que, via de regra, esses efluentes são lançados diretamente na rede pública coletora de esgoto, sem qualquer tipo de tratamento (ABREU et al., 2010).

De acordo com RDC nº 306, de 07 de dezembro de 2004 que dispõe sobre o regulamento técnico para o gerenciamento de resíduos de serviços de saúde:

[...] Os resíduos líquidos provenientes de esgoto e de águas servidas de estabelecimento de saúde devem ser tratados antes do lançamento no corpo receptor

ou na rede coletora de esgoto, sempre que não houver sistema de tratamento de esgoto coletivo atendendo a área onde está localizado o serviço [...] (BRASIL, 2004, p.11).

Diversas pesquisas indicam que os efluentes hospitalares conteriam concentrações maiores de bactérias resistentes aos antimicrobianos se comparados com efluentes provenientes de outras fontes, tais como os efluentes domésticos. Entretanto, ainda faltam resultados mais consistentes que confirmem esta hipótese (REINTHALER et al., 2010). Ao avaliar a resistência às drogas eliminadas nos efluentes, Abreu et al., (2010) citam que a eliminação destas nos hospitais ocorre de duas maneiras: a primeira por meio das excreções e dos líquidos biológicos, a segunda por meio de descartes de drogas não consumidas. Os fármacos que não foram utilizados ou que estejam fora do prazo de validade, em determinados casos, são eliminados pelos ralos dos estabelecimentos de saúde.

### **1.5.1 ESBL em efluentes hospitalares**

Os betalactâmicos são amplamente utilizados no tratamento de infecções bacterianas no mundo. No entanto, a maioria deles são eliminados durante os processos de tratamento de águas residuais e são muito raramente detectados em amostras ambientais. A presença de genes que codificam ESBL em bactérias que colonizam efluentes permanece pouco estudada, principalmente no Brasil. A maioria dos estudos se concentram em isolados clínicos (TACÃO et al., 2014).

Efluentes hospitalares compreendem normalmente menos do que 2% do efluente de esgoto bruto para as Estações de Tratamento de Esgoto (ETE). Sendo os hospitais a principal fonte de liberação de antimicrobianos do grupo das cefalosporinas em águas residuais. Diallo et al. (2013) detectaram cepas de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de ESBL em todas as amostras de efluentes hospitalar e lodo analisadas. Chagas et al. (2011) constataram que bactérias Gram- negativas isoladas de uma estação de tratamento de esgoto hospitalar no Rio de Janeiro – Brasil foram resistentes a cefotaxima e ceftazidima, nas frequências de 48 e 15%, respectivamente. Nesta mesma pesquisa, os autores determinaram a prevalência de bactérias ESBL positivas em mais de 40% das cepas provenientes do esgoto hospitalar. Korzeniewska e Harnisz (2013) observaram a presença de resistência a beta-lactâmicos em 78,9% das

Enterobacteriaceae isoladas de efluentes hospitalares. Quase 29,4% desses isolados foram relacionados a genes que codificam ESBL .

Cepas de *E. coli* produtoras de ESBL são encontradas com frequência no lodo de efluentes hospitalares, e representa um importante reservatório para estes patógenos no meio ambiente. Além disso, a propagação de patógenos pode ser esperada, especialmente em estações de tratamento que apenas conduzem o efluente sem tratamento prévio (REINTHALER et al., 2010).

A desinfecção preliminar do efluente hospitalar antes de sua entrada na estação de tratamento de esgoto poderia minimizar a propagação de bactérias resistentes aos antimicrobianos ao meio ambiente. As taxas de remoção de bactérias nas estações de tratamento, mesmo que cheguem próximo a 99%, não podem impedir a disseminação de microrganismos resistentes aos antimicrobianos das ETE para o meio ambiente. Essas bactérias podem ser deslocadas a partir do esgoto para seus arredores ou diretamente nos corpos d'água, que são receptores de ETE de efluentes. Isso representa um risco para a saúde pública. (GUSATTI et al., 2007; KORZENIEWSKA; HARNISZ, 2013).

## 1.6 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DE RESISTÊNCIA BACTERIANA

### 1.6.1 Disco difusão

O *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) recomenda que testes de triagem e confirmação sejam realizados rotineiramente para *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* e *E. coli*, consideradas produtoras clássicas de ESBL, além de *Proteus mirabilis* (CLSI, 2012).

Um dos principais testes fenotípicos é o de disco difusão. Realizado utilizando o ágar Mueller-Hinton em que discos preparados comercialmente, pré-impregnados com uma concentração padrão de um antibiótico particular, são uniformemente distribuídos sob a superfície do ágar. O antibiótico teste começa imediatamente a difundir para o exterior dos discos. Após uma incubação de 18 a 24 horas, o crescimento bacteriano em volta de cada disco é observado. Se o isolado teste é suscetível a um antibiótico particular, uma área clara de "não crescimento" será observada em torno deste disco (PATERSON; BONOMO, 2005).

O CLSI propôs que os laboratórios utilizem métodos de difusão em disco para testes de sensibilidade aos antimicrobianos para detecção específica da presença de ESBL. Para esta técnica, são utilizados discos de papel-filtro impregnados com concentrações de ceftriaxona, ceftazidima, aztreonam, cefepime e amoxicilina associado ao ácido clavulânico. Contudo, o uso de mais do que um destes agentes betalactâmicos para o rastreio, melhora a sensibilidade da detecção. Se qualquer um dos diâmetros das zonas indicar a suspeita para a produção de ESBL, configura como teste fenotípico confirmatório para a produção da enzima (DEVI; RAMACHANDER, 2016).

Os testes confirmatórios fenotípicos apresentam positividade presuntiva para a presença de ESBL, para a especificidade é necessário a confirmação genotípica. Há uma série de relatos em que os testes de confirmação fenotípicos podem ser falsamente positivos ou negativos, como exemplo, ao pesquisar um surto em uma enfermaria pediátrica, Wu et al. (2012) descrevem a identificação de uma cepa de *K. pneumoniae* sem genes para ESBLs que obteve teste de confirmação fenotípico positivo para a enzima. Oito pacientes com bacteremia foram tratados com sucesso com a terceira geração de cefalosporinas.

### **1.6.2E-TEST**

Teste comercialmente disponível que utiliza uma tira de teste de plástico impregnada com uma concentração gradualmente decrescente de um antibiótico particular. A tira também exibe uma escala numérica que corresponde à concentração do antibiótico nele contida. Este método proporciona um teste quantitativo conveniente de resistência a antimicrobianos de um isolado clínico. Uma tira separada é necessária para cada antibiótico, e, portanto, o custo deste método pode ser alto (MOHANTY et al., 2009).

### **1.6.3 Diagnóstico automatizado**

Vários sistemas comerciais foram desenvolvidos que fornecem leitura através da microdiluição de antimicrobianos em painéis. Esses métodos são destinados a reduzir erros técnicos e tempo de preparação longo que acarretam na demora dos resultados aos serviços de

saúde. A maioria dos sistemas automatizados de teste de susceptibilidade antimicrobiana fornecem inoculação, leitura e interpretação. Estes sistemas têm a vantagem na rapidez da geração de resultados (podem ser gerados dentro de horas) e convenientes, mas uma grande limitação para a maioria dos laboratórios é o custo implicado na compra dos insumos para as análises e manutenção dos equipamentos. A rápida identificação é importante para o tratamento do paciente, quanto para o controle de infecção hospitalar (BROLUND et al., 2013; JUSTIN et al., 2011).

#### **1.6.4 Diagnóstico molecular**

O método molecular utilizado para a detecção de ESBL é a amplificação por PCR (do inglês *Polimerase Chain Reaction*) que baseia-se na amplificação do DNA utilizando a enzima *Taq* DNA Polimerase com oligonucleotídicos específicos para os genes TEM, SHV e CTX que codificam as enzimas mais frequentes descritas como produtoras de beta-lactamases. Como método adicional, o sequenciamento de DNA, é essencial para discriminar entre as diferentes variantes dos genes (exemplo TEM3, SHV2, etc.) através da obtenção da sequência de nucleotídeos destes genes (SHAIKH et al., 2015). A técnica de sequenciamento mais utilizada é o método de Sanger et al. (1977) automatizado, que é baseado na incorporação de didesoxinucleotídeos - ddNTPs marcados com compostos fluorescentes à uma sequência de DNA alvo, com oligonucleotídeos iniciadores e a ação da DNA polimerase para alongação da cadeia.

### **1.7 TRATAMENTO E PREVENÇÃO DAS INFECÇÕES POR ESBL**

Pacientes com alto risco para o desenvolvimento de colonização ou infecção por organismos produtores de ESBL são frequentemente pacientes gravemente doentes com hospitalizações prolongadas nos quais dispositivos médicos invasivos estão presentes (cateteres urinários, tubo endotraqueal, cateteres venosos centrais entre outros).

Por isso, é necessário também manter a vigilância dos índices de resistência, principalmente nos hospitais de média e alta complexidade, especialmente, os que possuem unidade de terapia intensiva (UTI), centro cirúrgico, unidades de pediatria, berçário neonatal, clínica médica e/o cirúrgica, em que os pacientes são tratados com antimicrobianos, pois representam um “habitat” que alberga bactérias que podem tornar-se resistentes àquelas drogas (BALI et al., 2010; JUNIOR et al., 2004)

A higiene das mãos antes e após o contato com o paciente é considerada uma das melhores práticas para a redução de infecções associadas às bactérias produtoras de ESBL (SCHEITHAUER et al., 2010; ZAHAR et al., 2012).

A sensibilidade reduzida, a questão tolerância/toxicidade e o fato de a grande maioria ser bacteriostático ou bactericida lento, são os principais desafios relacionados aos antimicrobianos disponíveis atualmente, dessa forma, na tentativa de se superar esses problemas busca-se novas opções terapêuticas para o tratamento de infecções multirresistentes.

Durante anos, o paradigma de como tratar bactérias Gram-negativas produtoras de ESBL foi moldada pela ligação entre os resultados clínicos e os resultados de sensibilidade/resistência fornecidos pelos laboratórios. Por um lado, o aumento da mortalidade ocasionado por frequências elevadas de resistência à cefalosporinas, devido aos efeitos de ESBLs hidrolíticas, desqualifica o uso das cefalosporinas de amplo espectro. Os resultados favoráveis resultam do tratamento com carbapenêmicos, que são estáveis na presença de ESBLs. A utilização de antimicrobianos em associação como a Piperacilina/Tazobactam e Amoxicilina/Clavulanato também são estáveis contra ESBLs, porque estas enzimas são facilmente inativadas ou inibidas por tazobactam e clavulanato (DE ROSA et al., 2011; FOURNIER et al., 2013; GOULENOK et al., 2013; PEREZ; BONOMO, 2012).

Os carbapenêmicos foram considerados as últimas linhas de defesa contra infecções por microrganismos multirresistentes. Contrariando esta ideia, um isolado de *Klebsiella pneumoniae* produzindo uma carbapenemase surgiu na Carolina do Norte-Estados Unidos e se tornou endêmico (ARNOLD et al., 2011). Em avaliação de fármacos que reduzem a pressão seletiva exercida nos tratamentos relacionados aos carbapenêmicos, NG, et al em 2016, associam a piperacilina-tazobactam em conjunto ao cefepime como alternativa eficaz para tratamento.

A tigeciclina, opção de tratamento para infecções por ESBLs é um antibiótico que possui estrutura semelhante às tetraciclinas. Ela inibe a síntese de proteínas por ligação à subunidade 30S do ribossomo bacteriano. Em comparação com as tetraciclinas, a tigeciclina se liga a sítios ribossomais com maior afinidade, e independentemente da presença de mutações

que conferem resistência à tetraciclina. A tigeciclina demonstra uma maior atividade contra bactérias Gram-negativas multirresistentes, como *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia* e *Klebsiella pneumoniae* (RAO et al., 2014).

As polimixinas, são um grupo de antimicrobianos polipeptídeos que consiste em 5 compostos quimicamente diferentes (polimixinas A-E), que visam principalmente a membrana citoplasmática da célula bacteriana. As polimixinas (colistina-polimixina E e polimixina B) não foram usadas por muitos anos devido a sua nefrotoxicidade. As bactérias Gram-negativas que são resistentes aos aminoglicosídeos, betalactâmicos e fluoroquinolonas, são frequentemente susceptíveis às polimixinas. Embora uma vez considerado como um antibiótico tóxico, a colistina é descrita como um último recurso por não haver novos antimicrobianos para Gram negativos disponíveis para o tratamento em organismos multirresistentes. É amplamente utilizado no tratamento de *Pseudomonas aeruginosa* resistente a múltiplos fármacos e *Acinetobacter baumannii* carbapenem resistente (FICA et al., 2007). Entretanto, relatos recentes publicados por Falgenhauer et al. em janeiro de 2016, descrevem a identificação de um plasmídeo que contém o gene *mcr-1* responsável por resistência à colistina nos Estados Unidos e na Europa, e alertam para a possibilidade de disseminação mundial.

## 2 OBJETIVOS

Para desenvolver a referida pesquisa, serão propostos os seguintes objetivos:

### 2.1 GERAL

Caracterizar diversidade bacteriana em amostras clínicas e provenientes de efluente hospitalar do Hospital Geral de Roraima e realizar a detecção e identificação do perfil dos genes de resistência relacionados à produção de beta-lactamases de espectro estendido.

### 2.2 ESPECÍFICOS

- Identificar fenotipicamente a presença de cepas produtoras de ESBL em amostras clínicas e de efluente no Hospital Geral de Roraima;
- Pesquisar a presença de genes de resistência das famílias SHV, TEM e CTX-M;
- Através de sequenciamento, classificar os subtipos dentro dos genes SHV, TEM e CTX-M;
- Comparar os subtipos dos genes encontrados em amostras clínicas e no efluente hospitalar com estudos relacionados.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido em parceria com o Laboratório Central de Saúde Pública de Roraima e o Laboratório de Biologia Molecular do Centro de Estudos da Biodiversidade da Universidade Federal de Roraima.

Foram analisadas 71 amostras clínicas para a detecção dos genes relacionados à presença de ESBLs isoladas de culturas bacterianas realizadas pelo LACEN-RR (provenientes de pacientes atendidos no Hospital Geral de Roraima), durante o período de junho de 2014 a junho de 2016. As amostras clínicas foram: fragmento de tecido (sem especificação), líquidos estéreis (cefalorraquidiano e ascítico), ponta de cateter, sangue, secreção de ferida, secreção traqueal, cultura de swab (sem especificação de material coletado) e urina.

Em paralelo às amostras clínicas, foram realizadas coletas dos efluentes hospitalares de três tanques sépticos do mesmo hospital e comparadas com as cepas positivas para ESBL isoladas dos materiais clínicos. Devido a utilização de amostras clínicas, o projeto foi submetido para apreciação ao comitê de ética em pesquisa da Universidade Federal de Roraima, obtendo o registro de aprovação sob o número: CAEE 39610614.8.0000.5302. (Anexo 1)

#### 3.1 LOCAL DE ESTUDO: O HOSPITAL GERAL DE RORAIMA – HGR

O HGR (Figura 13), pertencente à rede pública estadual, é o único Hospital Geral de referência para todo o Estado de Roraima, cuja população é de aproximadamente 450.479 habitantes, sendo 65% destes, residentes no Município de Boa Vista. Possui 333 leitos, divididos em cinco blocos, três unidades de terapia intensiva, setor de trauma e uma unidade de urgência e emergência (pronto atendimento). A capacidade operacional do hospital é de aproximadamente 13.500 pacientes por mês (RORAIMA, 2013).

Figura 13 – Distribuição dos blocos e alas do Hospital Geral de Roraima



Legenda:	1 - Bloco A	9 - Lavanderia/Cozinha
	2 - Bloco B	10 - Manutenção
	3 - Bloco C	11 - Trauma
	4 - Bloco D	12 - Pronto Atendimento
	5 - Bloco E	13 - Administração
	6 - UTI 1	Pc1 - Ponto de Coleta 1 (UTI 1 e 2)
	7 - UTI 2	Pc2 - Ponto de Coleta 2 (UTI 3)
	8 - Centro cirúrgico	Pc3 - Ponto de Coleta 3 (Todos os blocos)

Os efluentes líquidos gerados pelo HGR, de acordo com o Plano de Gerenciamento de Resíduos deste hospital, são despejados em seis tanques sépticos que convergem para um grande tanque que destina os resíduos à estação de tratamento de esgoto do município de Boa Vista, onde são tratados pelo processo natural de estabilização (RORAIMA, 2013).

### 3.2 COLETA DO EFLUENTE HOSPITALAR

As amostras foram coletadas em março de 2016, período de estiagem de chuvas em Roraima. Para a coleta dos tanques sépticos, foram escolhidos 3 tanques (UTI 3, UTI 1 e 2 e tanque de acesso à todas as unidades do hospital). Os pontos amostrados, correspondem a

efluente bruto, sem tratamento e são os diretamente relacionados aos ambientes clínicos do hospital. As tampas de vedação que correspondem aos tanques coletores de efluentes das UTIs, encontravam-se danificadas. No trajeto tanques das UTIs ao de despejo dos blocos, foi constatado uma caixa de passagem aberta, onde os funcionários do hospital iriam realizar o esgotamento da mesma (Figura 14 A a D).

Figura 14 – Pontos das coletas dos efluentes no Hospital Geral de Roraima – HGR



A= Ponto de Coleta 1 (UTI1) B= Ponto de Coleta 2 (UTI2 e 3) C= Ponto de Coleta 3 (Todos os blocos) D= Caixa de passagem de efluentes necessitando de esgotamento.

Para a coleta, foram utilizados tubos cônicos esterilizados, de polipropileno, com sistema de fechamento e abertura que possibilitou, através de esforço manual, a abertura do frasco ao atingir a profundidade desejada (30 cm). Esta pesquisa ocasionou a criação e depósito de patente deste dispositivo, registrado no Instituto Nacional de propriedade Industrial com o número BR 20 2018 009448 9, Coautoria IFRR/UFRR, inventores Márcia Brazão, Derlano Capucho e Fabiana Granja.

Após a coleta, transferiu-se aproximadamente 15mL do efluente para um novo frasco estéril. As amostras foram transportadas em isopor com gelo para o LACEN-RR. Os procedimentos de coleta ocorreram de acordo com o protocolo estabelecido pela Associação Brasileira de Normas Técnicas- NBR 9898, que estabelece o planejamento de amostragem de efluentes líquidos e corpos receptores (Figura 15, A,B,C).

Figura 15 – Coleta dos efluentes nos tanques sépticos do Hospital Geral de Roraima



A e B= Coleta no tanque séptico, C = Transferência da amostra coletada para um novo tubo estéril.

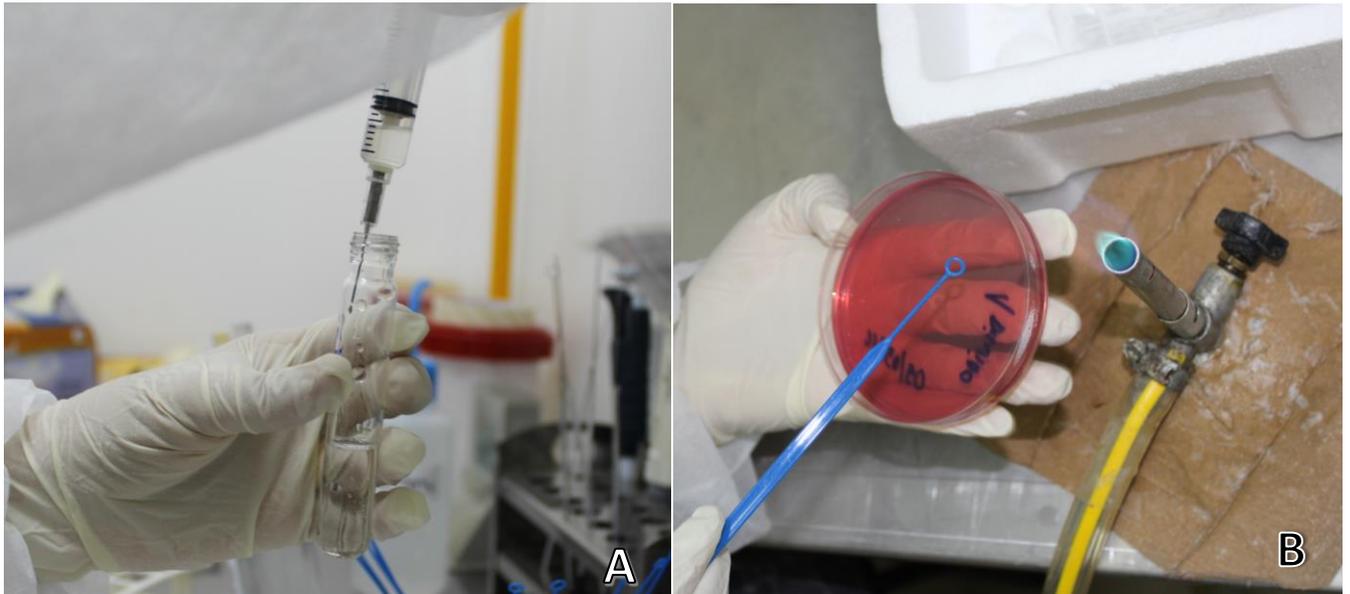
### 3.3 IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA E TESTE DE DISCO APROXIMAÇÃO PARA PESQUISA DE ESBL

Os procedimentos de identificação foram realizados em colaboração com o Laboratório Central de Saúde Pública de Roraima – LACEN-RR.

Para os efluentes, as amostras coletadas foram diluídas em solução salina na proporção 1:10 e em seguida semeados pela técnica de estriamento em Ágar McConkey (HIMEDIA), meio seletivo utilizado para o isolamento de cepas Gram-negativas e para a verificação da fermentação ou não da lactose (Figura 16 A e B). O cristal violeta presente na constituição do meio, inibe o crescimento de microrganismos Gram-positivos. Após esta etapa, disponibilizado aerobicamente à 36°C em estufa bacteriológica por 18 a 24 horas.

As amostras clínicas foram incubadas em meio BHI (Brain Heart Infusion - HIMEDIA) e incubadas aerobicamente à 36°C em estufa bacteriológica por 18 a 24 horas; posteriormente semeadas em ágar McConkey nas mesmas condições que as amostras de efluente.

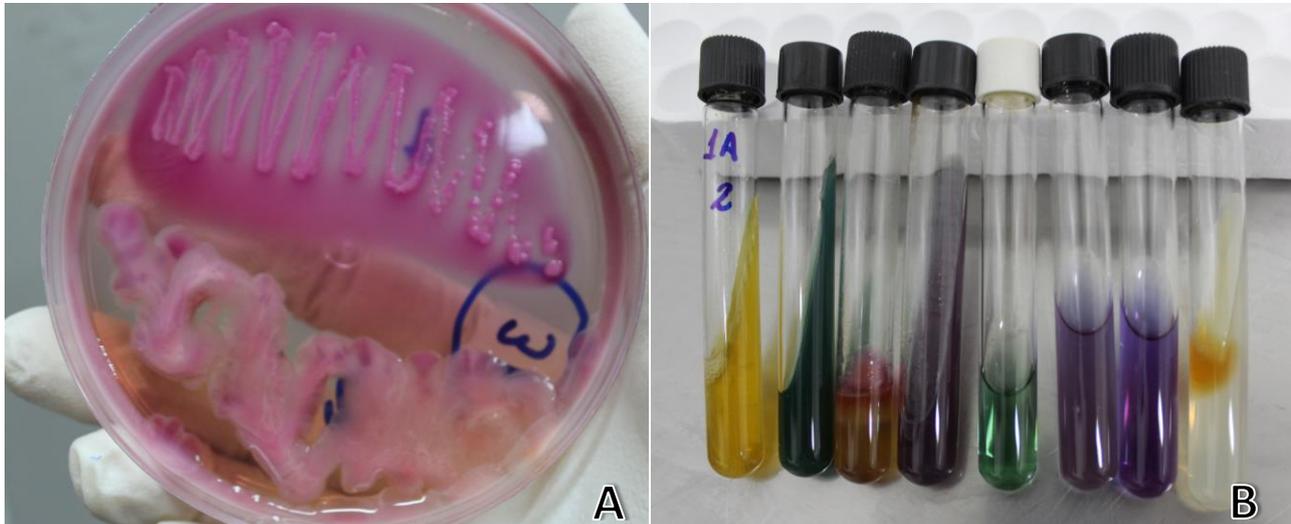
Figura 16– Diluição e semeio das amostras



A= diluição do efluente em solução salina B= semeio da amostra em ágar McConkey

Após o período de incubação, as cepas isoladas no Ágar McConkey, foram submetidas aos meios de cultura disponíveis comercialmente para identificação através de características bioquímicas inerentes a cada gênero/Espécie: Triple Sugar Iron Ágar, Citrato de Simmons, SIM (associação dos testes da presença de Indol + Teste de motilidade), Lisina Iron Ágar, Malonato, Descarboxilação dos aminoácidos Ornitina e Arginina e Teste da presença da enzima Fenilalanina Desaminase. Todos os meios de cultura utilizados são provenientes do fabricante HIMEDIA (Figura 17 A e B).

Figura 17 – Identificação fenotípica de gênero e espécie bacterianas.



A= colônias isoladas em ágar McConkey B= Provas bioquímicas de identificação

Na tabela 4 são demonstradas as interpretações das características bioquímicas inerentes ao gênero e espécies.

Tabela 5 – Meios de cultura e características de interpretação (continua)

MEIO DE CULTURA	CARACTERÍSTICAS DO MEIO	INTERPRETAÇÃO DA REAÇÃO
<b>TSI: Tríplex Açúcar e Ferro.</b>	Contém três açúcares: 0,1% glicose, 1,0% lactose, 1,0% sacarose, vermelho de fenol para detecção da fermentação de carboidratos e sulfato de ferro para detecção da produção de sulfato de hidrogênio (indicado pela cor preta na base do tubo)	Púrpura/amarelo = fermentação apenas da glicose (lactose e sacarose negativos).
		Amarelo/amarelo = fermentação da glicose + lactose e/ou sacarose (2 ou 3 açúcares)

Tabela 4 – Meios de cultura e características de interpretação (continuação)

MEIO DE CULTURA	CARACTERÍSTICAS DO MEIO	INTERPRETAÇÃO DA REAÇÃO
<b>LIA : lisina Iron Ágar</b>	Baseado na descarboxilação/ desaminação de lisina e produção de H <sub>2</sub> S.	Reação positiva: Cor Púrpura Reação negativa: Cor amarela
<b>Citrato de Simmons</b>	Verifica a capacidade da bactéria de utilizar o citrato de sódio como única fonte de carbono, juntamente com sais de amônia, alcalinizando o meio	Positivo: cor azul ou crescimento no local do inóculo. Negativo: não há crescimento e a cor permanece inalterada.
<b>SIM: Motilidade, Indol e sulfeto</b>	Utilizado para determinação da produção de indol através do metabolismo do aminoácido triptofano, presença de H <sub>2</sub> S e motilidade por flagelos.	Motilidade positiva: microrganismos móveis migram pela linha do inóculo e difundem-se no meio causando turbidez. -Motilidade negativa: bactéria tem um crescimento acentuado ao longo da linha do inóculo, em volta continua límpido. - H <sub>2</sub> S positivo: ao longo da linha de inoculação aparecerá a cor negra. - H <sub>2</sub> S negativo: linha ao longo da inoculação inalterada. -Indol positivo aparecerá um anel vermelho. - Indol for negativo aparecerá um anel amarelo. ‘

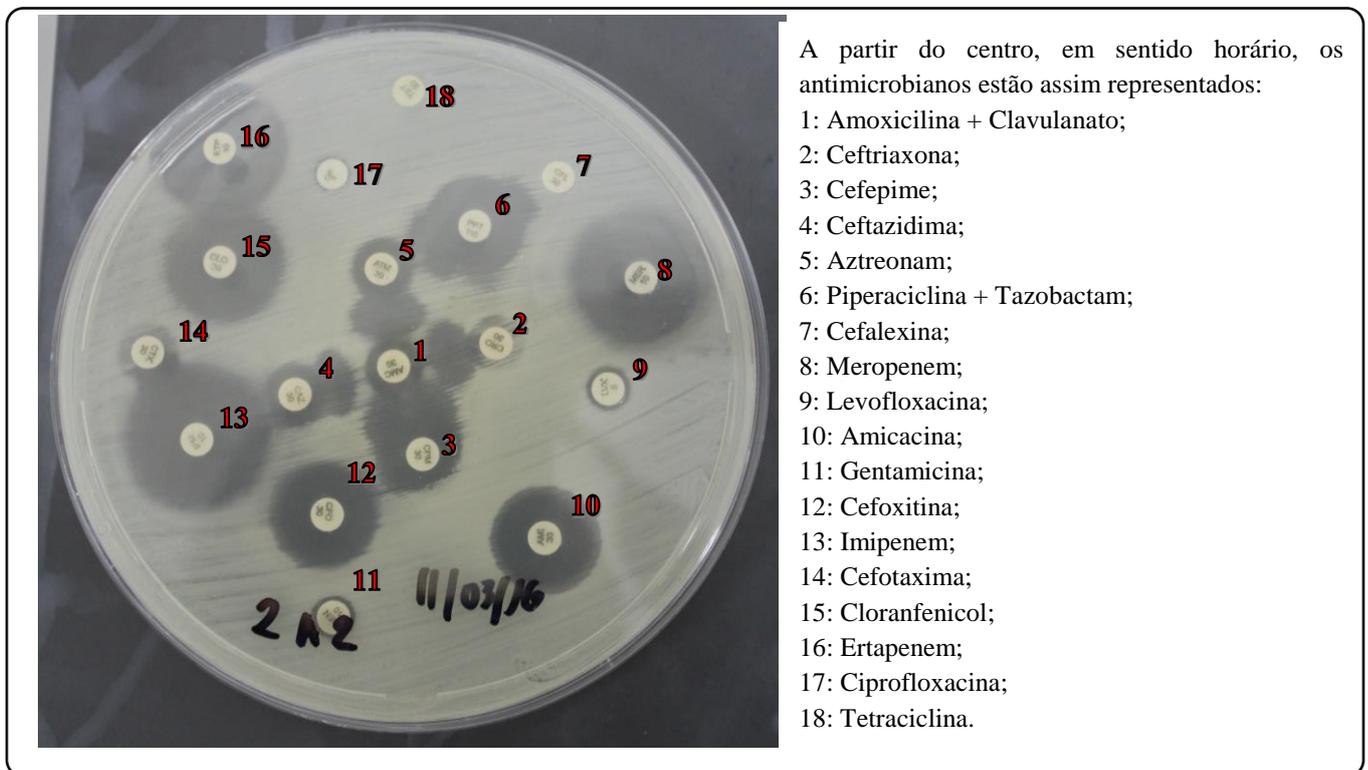
**Tabela 4 – Meios de cultura e características de interpretação (conclusão)**

<b>MEIO DE CULTURA</b>	<b>CARACTERÍSTICAS DO MEIO</b>	<b>INTERPRETAÇÃO DA REAÇÃO</b>
<b>Ornitina Descarboxilase</b>	As descarboxilases são um grupo de enzimas com substrato específico, capazes de reagir com o grupo carboxila dos aminoácidos para formarem aminas alcalinas. Essa reação, conhecida como descarboxilação, origina dióxido de carbono como produto secundário	Positivo: Tubo com aminoácido: púrpura e turvo-indica a formação de aminas a partir da reação de descarboxilação.  Negativo: Tubos controle e com aminoácido: amarelo.
<b>Arginina Descarboxilase</b>	Verifica a capacidade da bactéria de produzir ácido fenilpirúvico a partir da fenilalanina por ação enzimática	Positivo: formação de uma coloração esverdeada na superfície do meio após a adição do cloreto férrico.  Negativo: o meio permanece inalterado
<b>Fenilalanina</b>	Determina a habilidade do microrganismo de utilizar malonato de sódio como única fonte de carbono, resultando em alcalinização do meio	Positivo: azul.  Negativo: inalterado (verde).
<b>Malonato</b>	Determinar a habilidade do microrganismo de degradar a uréia em duas moléculas de amônia pela ação da enzima urease, resultando na alcalinização do meio.	Positivo: alteração do meio para cor de rosa, pink.  Negativo: sem alteração de cor do meio.
<b>Uréia</b>		

Em conjunto com a identificação de gênero/espécie, foi realizada a pesquisa de ESBL, utilizando-se a técnica de disco difusão em placa. Uma suspensão da bactéria em teste foi ajustada ao padrão de 0,5 na escala de McFarland sobre a superfície de placa de Agar Muller Hinton (Oxoid), com 4mm de espessura. Posteriormente, foi adicionado o disco de amoxicilina/ácido clavulânico (Oxoid) no centro da placa e, ao redor deste, os antimicrobianos marcadores posicionados estrategicamente a partir do disco central na distância de 20 mm de centro a centro.

Os antimicrobianos (fabricante Biobrás) foram: aztreonam, cefotaxima, ceftazidima e cefepime. Após incubação da placa por 18 a 20 horas à 35°C, observou-se a presença da distorção de halo (zona fantasma) entre o disco contendo ácido clavulânico e os discos posicionados ao redor. A presença desta zona caracterizou a cepa positivamente para ESBL. Também foram disponibilizados na placa os antimicrobianos amicacina, ampicilina+sulbactam, ampicilina, aztreonam, cefazolina, ceftazidima, ceftriaxona, cefotaxima, cefoxitima, cefepime, imipenem, levofloxacina, piperacilina+tazobactam, tetraciclina, sulfatrimetroprima, gentamicina, cloranfenicol e cefalotina (Figura 18).

Figura 18– Teste de sensibilidade e interpretação positiva de ESBL.



As técnicas descritas para cultura e identificação bioquímica foram desenvolvidas de acordo com o protocolo da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2007). Os testes de triagem e confirmação de ESBL seguiram metodologia proposta pelo CLSI no documento M100-S22 (CLSI, 2012).

### 3.4 EXTRAÇÃO DO DNA E AMPLIFICAÇÃO POR REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

Para controle de qualidade das amostras, foram utilizadas as cepas da American Type Culture Collections: *Escherichia Coli* ATCC 25922 (Não ESBL) e *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 (ESBL positiva).

Após a confirmação fenotípica para ESBL através do teste de antibiograma, para extração do DNA, utilizou-se a metodologia de choque térmico, desenvolvida por Chapman et al., (2001), apresentando algumas modificações.

Colônias previamente isoladas em ágar McConkey a partir das amostras coletadas, foram inoculadas em 5 ml de caldo Luria (oxid) à 35°C por 18/24 horas. Após este período, o caldo foi transferido para um tubo estéril de polipropileno de 2,5ml e centrifugado a 6.000 RPM por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em 400µl de água ultrapura e aquecido à temperatura de fervura por 10 minutos. Os tubos foram imediatamente congelados a -80°C e descongelados somente para o uso na técnica de PCR.

As amostras foram submetidas à quantificação do DNA por espectrofotometria, a leitura das amostras foi realizada ao comprimento de onda de 260 nm e 280 nm. A razão entre A260nm/A280nm foi calculada para determinação do grau de pureza do DNA extraído no espectrofotômetro Modelo FEMTO Cirrus 80MB.

A amplificação dos genes de resistência SHV, CTX-M, TEM por PCR foi realizada utilizando-se os iniciadores, condições térmicas e concentração de reagentes descritos por Ferreira et al. (2011). Um volume final de reação de 25µl contendo MgCl<sub>2</sub> (1,5µM), tampão 1x, dNTP (0,2mM), *Taq* DNA Polimerase (1U), Iniciadores (25pmol), 5µl de DNA molde e água ultrapura. Todos os reagentes foram provenientes da Ludwig Biotec. A técnica foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular do Centro de Estudos da Biodiversidade – CBio da Universidade Federal de Roraima com o Termociclador Peltier-Based Thermal Cycle. Os

oligonucleotídeos iniciadores com seus respectivos pesos moleculares utilizados na técnica de PCR para a detecção dos genes de resistência estão listados na Tabela 5.

Os produtos amplificados foram submetidos à reação de eletroforese em gel de agarose (SERVA) em concentração de 1,5% e acrescentados 0,7 µl do corante fluorescente de alta sensibilidade Blue Green Loading Dye (LGC biotecnologia), e carregados por 2 µl de solução de Azul de Bromofenol (0,25%) e Sacarose (10%) e 5 µl de cada amostra submetida à amplificação. Para a análise do produto dos fragmentos de PCR, foi utilizado um marcador de peso molecular de 100pb da Ludwig Biotecnologia. Após o término da reação, o gel foi visualizado no transiluminador (DNR MiniBis Pro) para a verificação da presença dos produtos de PCR obtidos e foto documentação das imagens.

Tabela 6 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a pesquisa de genes de resistência e seu peso molecular e condições do PCR para sua amplificação.

Gene	Iniciadores (5'-3')	Condições de Amplificação	Tamanho (pb)
CTX-M	F - ATGTGCAGYACCAGTAARGT	7min. a 94°C	593
	R - TGGGTRAARTARGTSACCAGA	35 ciclos de 50seg a 94°C; 40seg a 50°C; 1min a 72°C; 5min a 72°C	
TEM	F - ATGAGTATTCAACATTTCCG	5min. a 96°C	867
	R - CTGACAGTTACCAATGCTTA	35 ciclos de 1min a 96°C;	
SHV	F - GGTTATGCGTTATATTCGCC	1min a 60°C;	867
	R - TTAGCGTTGCCAGTGCTC	1min a 72°C; 10min a 72°C	

Fonte: FERREIRA et al., 2011

F= Foward R= Reverse.

### 3.4.1 Amplificação do gene ribossomal RNAr16S

Para a identificação de gênero/espécie, em adição aos testes fenotípicos por meios de cultura, será realizada a técnica de PCR para amplificação do gene RNAr 16S devido este possuir regiões altamente conservadas e variabilidade suficiente para discriminar as espécies bacterianas.

Semelhante aos genes CTX-M, TEM e SHV, as condições de amplificação serão as mesmas utilizadas por Ferreira et al. (2011). Os iniciadores para o gene ribossomal 16s estão descritos na Tabela 6.

Tabela 7 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a pesquisa de genes RNAr16s, seu peso molecular e condições do PCR para sua amplificação.

Gene	Iniciadores (5'-3')	Condições de Amplificação	Tamanho (pb)
		1 Ciclo de 7min. a 94°C	
27 F	F - GAGTTTGATCCTGGCTCAG	35 ciclos de 50seg a 94°C;	1500
1492 R	R - GGTTACCTTGTTACGACTT	40seg a 50°C;	
		1min a 72°C;	
		1 Ciclo de 5min a 72°C	

Fonte: FERREIRA et al., 2011

F= Foward R= Reverse.

### 3.5 SEQUENCIAMENTO DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS

Para as reações de sequenciamento foram utilizadas quantidades de produto amplificado de acordo com o protocolo do Kit de sequenciamento BigDye® Terminator versão 3.1 (Applied Biosystems™, USA), cada amostra submetida a duas reações de sequenciamento (sentidos senso e anti-senso).

Em cada reação de sequenciamento foi utilizado 1 µl de DNA amplificado, 0,3 µl de Tampão BigDye® Terminator versão 3.1 (Applied Biosystems™, USA), 1,85 µl de tampão de sequenciamento 5X (SaveMoney), 1 µl de iniciador e água ultrapura livre de nucleases suficiente para 10 µl. A reação de amplificação foi realizada em termociclador e o produto da

desta, purificado pela precipitação com Etanol (EtOH) e Ácido Etilenodiamino Tetra Acético (EDTA), seguindo as instruções do protocolo do kit BigDye<sup>®</sup> (ThermoFischer Scientific). Posteriormente os produtos foram analisados em corrida eletroforética capilar em sequenciador automático modelo ABI 3500 (Applied Biosystems<sup>™</sup>, USA).

As duas sequências senso e anti-senso de cada amostra foram combinadas para obter uma sequência consenso, usando o programa Geneious<sup>®</sup> versão 9.0.5. O mesmo programa foi utilizado para avaliar a qualidade das sequências obtidas, através da análise do cromatograma, onde é estabelecida uma probabilidade de erro e valor QV (do inglês *Quality Value*) igual a 20 que indica a qualidade das sequências obtidas.

Para a classificação das famílias ou obtenção dos subtipos entre os genes CTX-M, TEM e SHV, as sequências nucleotídicas foram submetidas ao Banco de Dados e Sequências Genéticas – GenBank que contém a ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) que localiza regiões de semelhança entre as sequências obtidas. O programa compara as sequências de nucleotídeos em sua base de dados genéticos. Os valores que compreenderem 98 a 100% de similaridade serão considerados ideais para a identificação das famílias dos genes codificantes de ESBL.

A análise da sequência amplificada da região do rRNA 16S com os mais altos níveis de similaridade foram consideradas consistentes para a identificação das espécies caracterizadas fenotipicamente pelos testes bioquímicos.

### 3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram submetidos ao teste estatístico de hipóteses Qui-Quadrado de independência utilizando-se o programa BioEstat versão 5.3 (AYRES et al., 2007). A utilização do presente teste objetivou verificar se as distribuições de duas ou mais amostras não relacionadas diferiam significativamente em relação à determinada variável. O nível de significância adotado foi  $p < 0.05$  (95% de confiança).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No período de junho de 2014 a junho de 2016, foram realizadas as coletas dos materiais clínicos e efluentes, após suas etapas analíticas, originaram os seguintes resultados:

### 4.1 CARACTERIZAÇÃO DE ESBL EM CEPAS ISOLADAS DE AMOSTRAS CLÍNICAS

Foram identificadas por análise fenotípica 71 cepas positivas para ESBL em diferentes materiais clínicos coletados no Hospital Geral de Roraima. A análise do material clínico mais frequente em relação à detecção de ESBL, foram provenientes de amostras de urina, ponta de cateter, secreção traqueal e sangue. Dados estes observados na Tabela 7:

Tabela 8 – Frequência dos diferentes materiais clínicos coletados no Hospital Geral de Roraima.

<b>Material Clínico</b>	<b>N</b>	<b>%</b>
Urina	17	23,9
Ponta de Cateter	14	19,7
Secreção Traqueal	13	18,3
Sangue	12	16,9
Secreção de ferida	8	11,3
Swab (sem especificação)	3	4,2
Líquido cefalorraquidiano	2	2,8
Líquido Ascítico	1	1,4
Fragmento de Tecido	1	1,4
<b>Total</b>	<b>71</b>	<b>100</b>

( $n = 71$ ,  $\chi^2 = 40,169$ ,  $p < 0.0001$ )

A maioria das cepas isoladas foi obtida a partir de urina. Em infecções relacionadas ao trato urinário, tem crescido a incidência de microrganismos produtores de ESBL, o que dificulta o tratamento da infecção e exige a utilização de antibióticos de amplo espectro (RORIZ-FILHO, et al 2010). O surgimento destas bactérias é mais frequente em pacientes que utilizam sonda

vesical (cateter). O uso de sonda vesical pode desempenhar um papel importante como fator de risco para o aparecimento de bactérias produtoras de ESBL. O risco para desenvolvimento de infecção do trato urinário relacionada ao uso de cateter aumenta 5% para cada dia de utilização (SFAIR et al., 2014).

Em relação à frequência encontrada em ponta de cateter, as infecções relacionadas a este tipo de material, são fator de grande preocupação, pois constituem complicação de grande morbimortalidade, com riscos e agravos adicionais em pacientes muitas vezes debilitados ou imunossuprimidos, como aqueles submetidos à quimioterapia. Das Neves Junior et al., (2010) relatam que 12% dos casos de bacteremia estão associados ao uso de cateter de longa duração. Nesses casos, o paciente deve ser investigado com a coleta de hemoculturas e pesquisa bacteriana por coleta sanguínea através do cateter.

Os autores supramencionados, preconizam a necessidade da coleta de hemocultura para inter-relacionar a bacteremia à ponta de cateter. Entretanto, Parveen et al., (2011) relatam que infecções da corrente sanguínea associadas à ESBL podem surgir não somente relacionadas ao cateter venoso, mas também como consequência de pneumonia (comunitária e/ou adquirida por uso de ventilador mecânico), infecções no trato urinário e/ou patologias intra-abdominais.

Os resultados observados nesta pesquisa demonstram valores similares nos achados ponta de cateter e sangue (hemocultura), o que evidencia o cateter como possível acesso de entrada para infecções na corrente sanguínea.

#### **4.1.1 Identificação fenotípica e genotípica das cepas isoladas produtoras de ESBL.**

A análise fenotípica para determinação de gênero/espécie, apresentou maiores frequências para cepas de *Klebsiella sp.*, seguido de *Pseudomonas sp.*, *Enterobacter sp.*, Bacilo Gram Negativo não Fermentador da Glicose e outras cepas com menor frequência, como demonstrado na Tabela 8.

Tabela 9 – Identificação fenotípica das cepas confirmadas como produtoras de ESBL

<b>Microrganismos</b>	<b>Cepas identificadas fenotipicamente</b>	<b>%</b>
<i>Klebsiella sp</i>	23	32.4
<i>Pseudomonas sp.</i>	16	22.5
<i>Enterobacter sp.</i>	12	16.9
Bacilo Gram negativo não fermentador	9	12.6
<i>Escherichia coli</i>	8	11.3
<i>Serratia sp.</i>	2	2,8
<i>Providencia stuartii</i>	1	1,4
<b>Total</b>	<b>71</b>	<b>100</b>

( $n = 71$ ,  $\chi^2 = 40,113$ ,  $p < 0.0001$ )

O sequenciamento do gene ribossomal 16S, proporcionou a correção de resultados que haviam sido obtidos a partir da identificação fenotípica. A tabela 9 mostra detalhadamente 18 espécies identificadas pela série bioquímica e que tiveram alteração de nomenclatura após o sequenciamento. A tabela 8 já está previamente corrigida com estes resultados.

Tabela 10 – Comparação dos resultados fenotípicos e genotípicos (sequenciamento do gene RNAr16S) para confirmação da identidade entre as cepas clínicas (somente resultados discordantes).

<b>Ordem</b>	<b>Identidade Fenotípica</b>	<b>Identidade Genotípica</b>	<b>Sítio de coleta</b>
<b>CP</b>	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Escherichia coli</i>	-
<b>CP</b>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-
<b>1</b>	Bacilo Gram-negativo não fermentador	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ST
<b>2</b>	Bacilo Gram-negativo não fermentador	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	SW
<b>3</b>	<i>Pseudomonas sp.</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ST
<b>4</b>	<i>Klebsiella sp.</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	SF
<b>5</b>	<i>Klebsiella sp.</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Sec. Geral
<b>6</b>	<i>Klebsiella sp.</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Urina
<b>7</b>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	Urina
<b>8</b>	<i>Klebsiella ozaenae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Urina
<b>9</b>	<i>Klebsiella ozaenae</i>	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	PC
<b>10</b>	<i>Klebsiella ozaenae</i>	<i>Enterobacter hormaechei</i>	ST
<b>11</b>	<i>Klebsiella ozaenae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	PC
<b>12</b>	<i>Klebsiella ozaenae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Sangue
<b>13</b>	<i>Klebsiella ozaenae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Sangue
<b>14</b>	<i>Klebsiella ozaenae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	SF
<b>15</b>	<i>Klebsiella rhinoscleromatis</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Urina
<b>16</b>	<i>Enterobacter sp.</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	PC
<b>17</b>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	PC
<b>18</b>	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Providencia stuartii</i>	PC

Legenda: **CP** = Controle Positivo; **ATCC** = American Type Culture Collection; **ST** = Secreção Traqueal; **SW** = Swab; **SF**: Secreção de ferida; **PC** = Ponta de Cateter.

As espécies *Escherichia coli* ATCC 25922 (ESBL negativa) e *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 (ESBL positiva) foram confirmadas no sequenciamento, validando os resultados desta pesquisa. A divergência entre os resultados da identificação fenotípica (n=71) e genotípica (n=18) foi de 25,4%. Esta diferença pode estar associada à limitação dos testes bioquímicos, estes dependem de vários fatores para garantir uma correta interpretação, como exemplo os itens de controle de qualidade na fabricação, a quantidade disponível para teste, acondicionamento e isolamento correto das cepas a serem identificadas (BAJPAI et al., 2017; OLIVEIRA et al. 2013).

A literatura descreve o gene RNAr 16S como referência para a identificação de bactérias. Bajpai et al. (2017) realizaram um estudo comparativo das técnicas convencional por testes bioquímicos, automatizado e o sequenciamento do gene RNAr 16S, onde a interpretação da série bioquímica definiu como bacilos não fermentadores, o sequenciamento foi capaz de identificar como as espécies *Citrobacter koseri* e *Providencia rettgeri*.

De acordo com os resultados desta pesquisa, apenas as cepas de *Pseudomonas sp.* e o Bacilo Gram negativo não fermentador da glicose não pertencem à família Enterobacteriaceae. Lago et al., (2010), em pesquisa de ESBL em um hospital em Passo Fundo-RS, relatam que além de cepas de *E. coli* e *Klebsiella sp.*, ocorre a ampla disseminação desse mecanismo de resistência na família Enterobacteriaceae.

Dentro desta família, o gênero *Klebsiella*, com maior frequência entre as cepas identificadas fenotipicamente, estão relacionadas às ocorrências de surtos hospitalares, como os descritos por Lima et al., (2014) e Haller, S. et al., (2015). Ambos relatam ocorrências relacionadas às unidades de terapias intensivas neonatais em Teresina-PI e na Alemanha respectivamente, o que evidencia a disseminação mundial deste gênero como produtor de ESBL.

A frequência das cepas de *Klebsiella* entre as cepas identificadas, pode estar relacionado aos seus vários fatores de virulência que possibilitam sua evasão às defesas imunológicas do organismo (MARQUES et al., 2016). Em pesquisa crítica e sistematizada sobre a hipervirulência e resistência à antimicrobianos destas cepas, Lee et al., (2017), relacionam a persistência e disseminação das cepas de *Klebsiella*, à presença de cápsula polissacáridica, responsável pela atividade de hiper mucoviscosidade que proporciona ação anti fagocítica.

A hiper mucoviscosidade em cepas de *Klebsiella*, foi detectada em isolados provenientes de dieta enteral administrada em dois hospitais públicos do Estado de Minas Gerais. Os autores Pereira; Vanetti (2015), obtiveram a frequência de 20% das cepas deste

gênero em 30 amostras analisadas, destas 6.7% apresentavam o fenótipo de hiper mucoviscosidade.

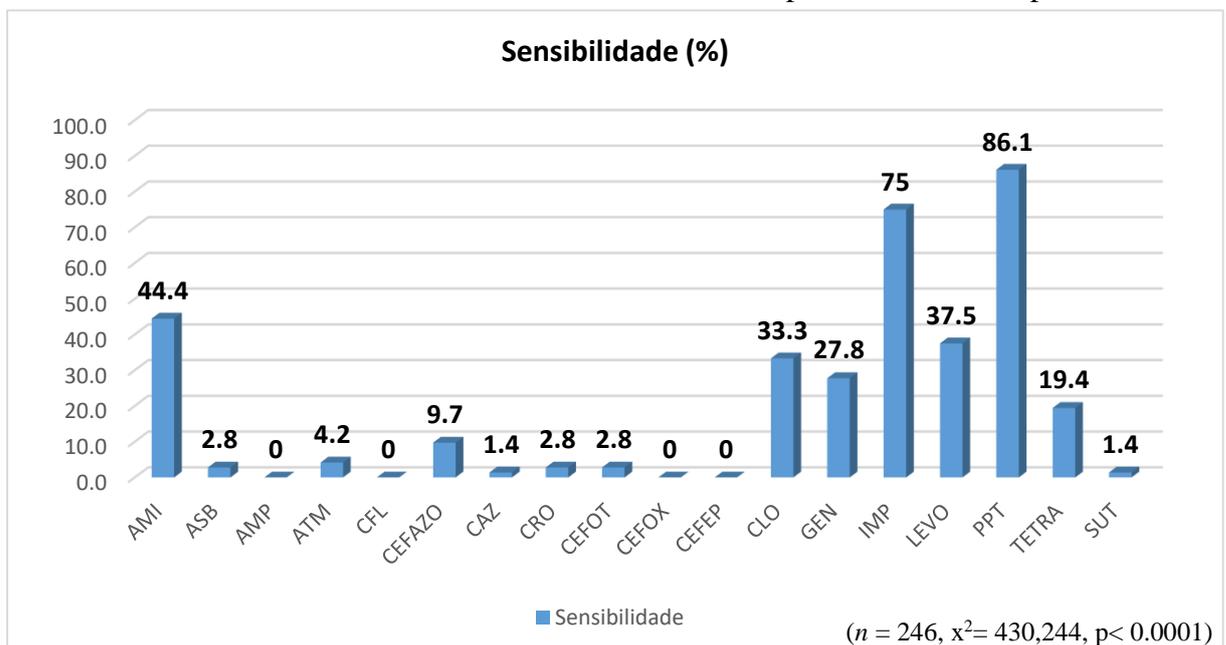
As cepas de *Klebsiella* identificadas nesta pesquisa, macroscopicamente, possuíam a presença de crescimento mucóide nas colônias isoladas, o que indica a presença do fenótipo de hiper mucoviscosidade. Para tal confirmação, seria necessário que as cepas fossem submetidas ao *String Test*.

*String test* é caracterizado pelo uso de alça calibrada de inoculação e presença de ligamento mucóide com no mínimo 5 mm de alongação. A confirmação genética deste fenótipo ocorre através da detecção dos genes *magA* e *rmpA*, responsáveis pela produção desta adesina (KUMABE; KENZAKA, 2014).

#### 4.1.2 Perfis de sensibilidade e resistência das cepas isoladas

A análise do teste de sensibilidade indicou os antimicrobianos piperacilina associado ao tazobactam, imipenem, amicacina, cloranfenicol, gentamicina e levofloxacino como fármacos mais sensíveis para as bactérias produtoras de ESBL, o perfil completo de sensibilidade está apresentado no Gráfico 1.

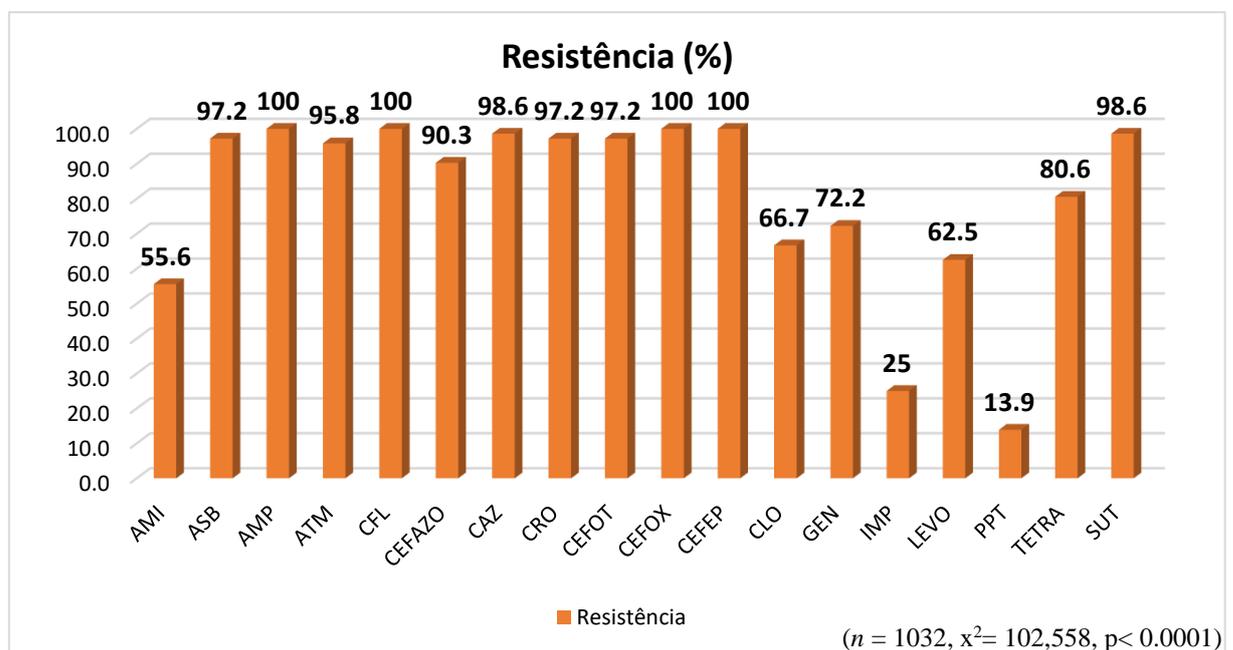
Gráfico 1 – Perfil de sensibilidade à antimicrobianos das cepas clínicas ESBL positivas



Legenda: AMI: Amicacina; ASB: Ampicilina/Sulbactam; AMP: Ampicilina; ATM: Aztreonam; CFL: Cefalexina; CEFAZO: Cefazolina; CAZ: Ceftadizima; CRO: Ceftriaxona; CEFT: Cefotaxima; CEFOX: Cefoxitina; CEFEP: Cefepime; CLO: Cloranfenicol; GEN: Gentamicina; IMP: Imipenem; LEVO: Levofloxacina; PPT: Piperacilina/Tazobactam; Tetra: Tetraciclina; SUT: Sulfatrimetoprima.

Em relação ao perfil de resistência, os antimicrobianos da classe das cefalosporinas apresentaram 100%, o que corresponde ao comportamento hidrolítico da enzima para esta classe de fármacos. A mesma frequência foi encontrada para ampicilina e sulfatrimetoprima. Os fármacos e os seus respectivos valores de resistência, encontram-se listados no Gráfico 2.

Gráfico 2 – Perfil de resistência à antimicrobianos das cepas clínicas ESBL positivas



Legenda: AMI: Amicacina; ASB: Ampicilina/Sulbactam; AMP: Ampicilina; ATM: Aztreonam; CFL: Cefalexina; CEFAZO: Cefazolina; CAZ: Ceftadizima; CRO: Ceftriaxona; CEFT: Cefotaxima; CEFOX: Cefoxitina; CEFEP: Cefepime; CLO: Cloranfenicol; GEN: Gentamicina; IMP: Imipenem; LEVO: Levofloxacina; PPT: Piperacilina/Tazobactam; Tetra: Tetraciclina; SUT: Sulfatrimetoprima.

Em relação à susceptibilidade de 44,4 % à amicacina observada em nossa pesquisa, Salvatore Resman-Targoff (2015), descrevem a evidência limitada de apoio à utilização deste em UTIs em infecções relacionadas por bactérias produtoras de ESBL. A monoterapia com amicacina é eficaz para o tratamento de cistite e pielonefrite bacteriana. Um benefício da amicacina é que altas concentrações urinárias são alcançadas disponibilizando entre 94-98% do fármaco inalterado sendo eliminado na urina em 24 horas.

Ao analisar a presença de cepas multirresistentes produtoras de ESBL em pacientes com câncer em um hospital de Barcelona, Gudiol et al., (2010) explanaram que as taxas de

resistência a antimicrobianos não betalactâmicos, foram as seguintes: quinolonas 65%, sulfatrimetoprima 59%, gentamicina 12%, e 12% de tobramicina. Todas as cepas permaneceram completamente sensíveis aos carbapenêmicos e amicacina, 53% das cepas resistentes à amoxicilina/ácido clavulânico e 18% a piperacilina/tazobactam. Estes resultados discordam dos encontrados neste trabalho, em que o carbapenêmico imipenem e a amicacina apresentaram 25 e 55,6% de resistência, respectivamente. O inibidor de beta-lactamase piperacilina associado ao tazobactam, demonstrou resultados similares com 13,9%, e em conjunto com imipenem apresentam-se como as melhores escolhas de tratamento, pois foram os únicos antimicrobianos com frequência de sensibilidade acima de 50%.

Em avaliação da eficácia da utilização da piperacilina associada a tazobactam como terapia isolada ou em combinação com outros antimicrobianos, Tamma et al. (2015), demonstraram equivalência entre piperacilina/tazobactam e carbapenêmicos para o tratamento de infecções por ESBL. Relatam que, os pacientes são prescritos com cefalosporinas e piperacilina/tazobactam empiricamente, e somente em 72-96 horas depois é conhecido que o microrganismo é um produtor de ESBL.

Os resultados dos autores supracitado, sugerem que os carbapenêmicos devem ser utilizados como terapia de escolha para pacientes com suspeita de ter infecções por cepas com ESBL. No entanto, o uso liberal de carbapenêmicos pode resultar no surgimento de resistência a este agente, limitando severamente futuras opções de tratamento. De acordo com os descritos por Perez e Bonomo (2012), piperacilina/tazobactam no tratamento de organismos produtores de ESBL em vez de carbapenêmicos, exerce grande pressão seletiva em cepas de *Pseudomonas aeruginosa* e que embora a adição de tazobactam pareça reduzir o efeito de hidrólise das enzimas, a atividade do tazobactam é diminuída quando uma concentração elevada de bactérias está presente ("efeito de inóculo").

O efeito de inóculo foi testado por Thomson e Moland (2001). Concentrações de inóculos foram aumentadas em até 100 vezes a densidade descrita como mínima pelo CLSI para os testes de sensibilidade e submetidas às concentrações de cefalosporinas, carbapenêmicos e piperacilina/tazobactam. O efeito inóculo foi menos comum em testes com os carbapenêmicos. Os dados encontrados nesta pesquisa, demonstram que apesar da estabilidade dos carbapenêmicos em relação à piperacilina/tazobactam, o imipenem evidenciou um perfil de resistência bacteriana superior.

#### 4.1.3 Detecção dos genes TEM, SHV e CTX-M das cepas isoladas

Entre as 71 cepas submetidas à PCR, 35 destas foram positivas para a presença dos Genes TEM, SHV e CTX-M que são codificadores de beta-lactamases. A Tabela 9 mostra a diversidade dos genes nas cepas analisadas. A Figura 19 mostra os fragmentos de 867 pb em gel de agarose correspondente à região amplificada do gene TEM e SHV. Para o gene CTX-M, a Figura 20 apresenta o fragmento de 593 pb nos isolados estudados.

Figura 19 – Gel de agarose a 1,5% com as amostras submetidas à amplificação dos genes TEM e SHV, a banda representa positividade para o gene amplificado.

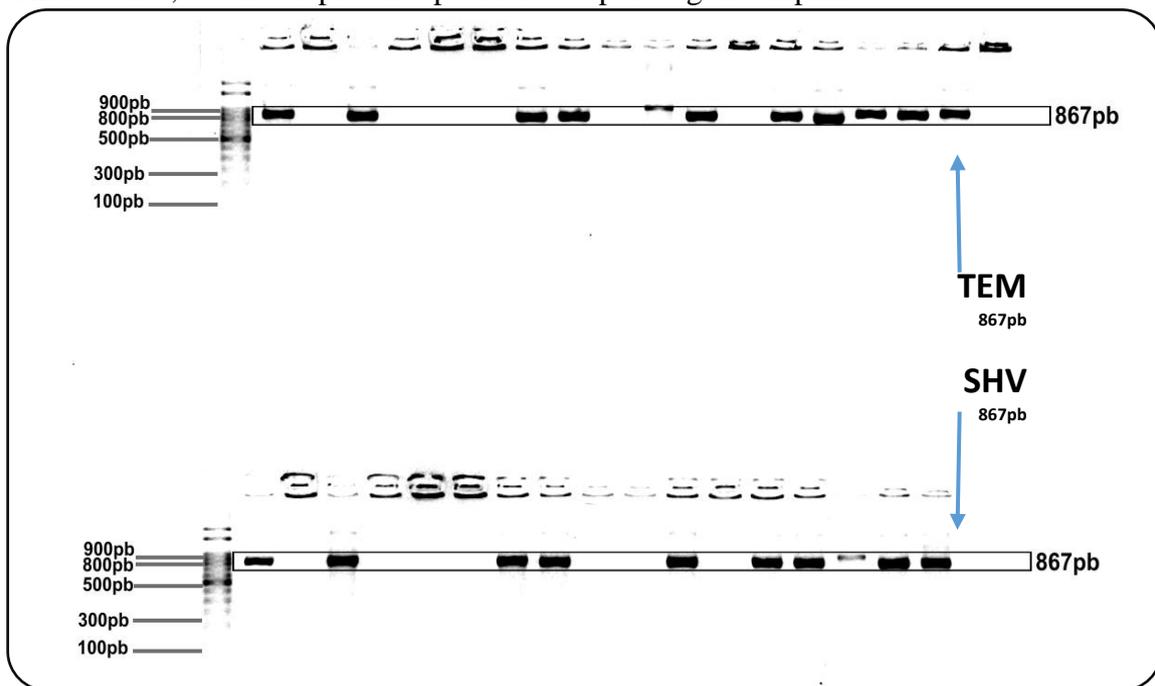
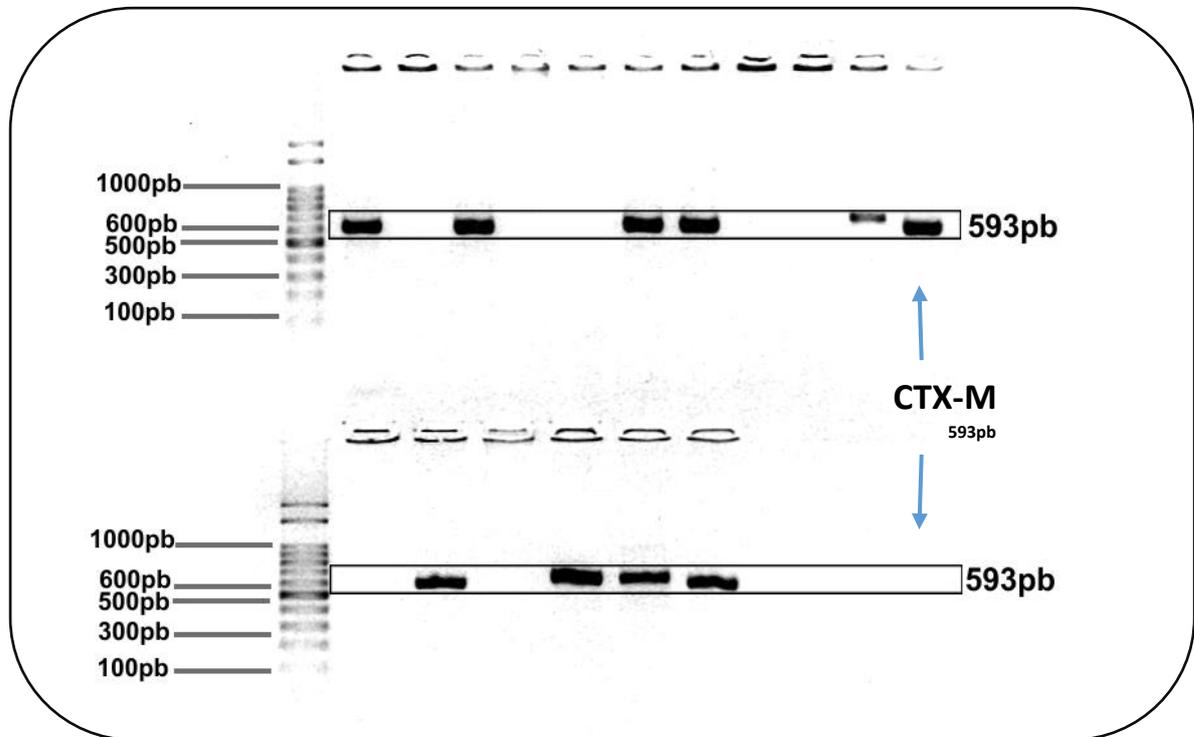


Figura 20 – Gel de agarose a 1,5% com as amostras submetidas à amplificação dos genes CTX-M, a banda representa positividade para o gene amplificado.



A análise das 35 cepas identificadas por PCR para presença de ESBL, mostrou que 11,4% destas apresentaram o gene TEM, 20% CTX e 11,4% o SHV, 5,7% cepas apresentaram simultaneamente os genes CTX + SHV, 20% TEM + SHV, 8,5% CTX + TEM e 23% cepas obtiveram amplificação para os 3 genes simultaneamente (Tabela 10)

Tabela 11 – Distribuição nas cepas clínicas dos Genes Codificantes de ESBL por gênero/espécie bacteriana

Microrganismos	Cepas identificadas		Genes encontrados						
			TEM	CTX	SHV	CTX	TEM	CTX	CTX
	+	+				+	+		
	SHV	SHV				TEM	+	+	+
N	%								
<i>Bacilo Gram negativo não fermentador</i>	2	5,7		1				1	
<i>Enterobacter sp.</i>	5	14,3		2			2		1
<i>Escherichia coli</i>	4	11,4	1	1	1				1
<i>Klebsiella sp.</i>	19	54,2		4	3	1	4	2	5
<i>Providencia stuartii</i>	1	2,9	1						
<i>Pseudomonas sp.</i>	3	8,6	2						1
<i>Serratia sp.</i>	1	2,9					1		
<b>Total</b>	<b>35</b>	<b>100</b>	<b>4</b>	<b>8</b>	<b>4</b>	<b>1</b>	<b>7</b>	<b>3</b>	<b>8</b>

Somando as ocorrências dos genes em isolado e em combinação, o gene TEM foi frequente em 22 amostras, com frequência de 35,5% e os genes CTX e SHV ambos com 20 detecções, com percentil de 32,25% das amostras analisadas ( $n=62$ ,  $X^2=0,031$ ,  $p<0,9845$ ).

O gene CTX-M, apresenta-se mundialmente como o mais frequente entre os codificadores de beta-lactamases, fato este observado por Leistner et al. (2013) em pesquisa de cepas multirresistentes ESBL positivas adquiridas em infecções provenientes de ambientes não hospitalar (comunidade), demonstrou a prevalência do gene CTX-M em 83% das amostras analisadas.

No Brasil, a avaliação de genes de resistência realizado em *E.coli* proveniente da comunidade realizado por Carmo et al. (2012), evidenciou a predominância de TEM em 42,7% dos isolados, e CTX com 18,8%. Apenas dois isolados apresentaram estes genes simultaneamente. O gene SHV foi detectado em três isolados simultaneamente com o gene TEM. Em concordância, Mohammed et al. (2016) em detecção de genes de ESBL relacionados

em cepas resistentes ao imipenem em um hospital do Egito, mencionam que 72,7% apresentaram positividade para o gene TEM, 36% CTX-M e 15% SHV.

Na detecção fenotípica ocorreu o isolamento de 26 cepas de *Klebsiella sp.*, destas 19 apresentaram positividade para os genes codificantes de ESBL. Estes dados corroboram com os estudos que demonstram a prevalência dos genes TEM, SHV e CTX-M na família Enterobacteriaceae especialmente em cepas de *K.pneumoniae* e *E.coli* que permanecem como os principais organismos isolados com detecção positiva dos genes de ESBL, mas estas enzimas também são identificadas em menor frequência em outros membros da família e em cepas que não fermentam a glicose (PITOUT; LAUPLAND, 2008).

Ao determinar a alta frequência de *Klebsiella* em ambientes hospitalares, Scarpate e Cossatis (2009), relatam a grande habilidade destas cepas, especialmente a espécie *K.pneumoniae* produtora de ESBL em escapar da atividade fagocítica dos neutrófilos polimorfonucleares, como responsável pelo grande potencial patogênico destas bactérias.

A epidemiologia de bactérias produtoras de ESBL está se tornando cada mais complexa, sendo detectadas em frequência cada vez maiores não só em ambientes hospitalares, mas também na comunidade. Pitout e Laupland (2008) caracterizam as cepas de Enterobactérias que contém os genes CTX-M, TEM e SHV como um problema para a saúde pública mundial devido à dificuldade no tratamento destas infecções.

#### **4.1.4 Sequenciamento dos genes amplificados por PCR das cepas isoladas em amostras clínicas.**

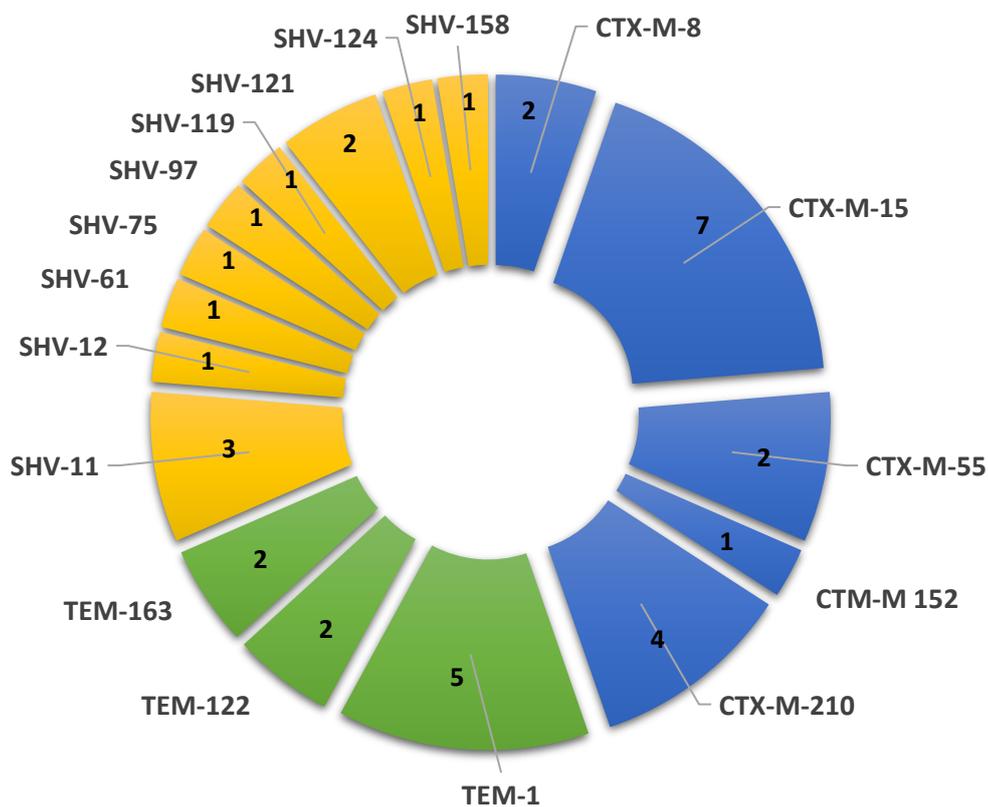
Em amostras clínicas, ocorreu o sequenciamento de 28 cepas (tabela 11) que atestaram a presença das variantes dos genes CTX-M, TEM e SHV. As cepas do gênero *Klebsiella* foram as mais frequentes e com maior diversidade de subtipos. Estas, conhecidamente caracterizadas como predominantes em relação ao perfil de multirresistência e presença de genes de virulência (BARRIOS, et al., 2017).

Tabela 12 – Subtipos de genes de ESBL de acordo com a cepa clínica isolada.

N	ESPÉCIE	VARIANTES PARA OS GENES		
		CTX-M	TEM	SHV
16	<i>Klebsiella sp.</i>	8,55,15,210,152	163,1,122	11,12,75,97,121
5	<i>Enterobacter sp.</i>	210	1	61,158,124
3	<i>Pseudomonas sp.</i>	15	1	
1	<i>BGN</i>	210		
1	<i>Escherichia coli</i>			121
1	<i>Providencia stuartii</i>		1	
1	<i>Serratia sp.</i>			119

O sequenciamento dos genes, demonstrou a ocorrência de 37 subtipos de ESBL, sendo evidenciados 3 variantes para o gene TEM, 9 para o SHV e 5 para o CTX-M. A apresentação dos subtipos do total de amostras clínicas sequenciadas estão apresentados no Gráfico 3.

Gráfico 3 – Distribuição dos subtipos dos genes relacionados a resistência (n) em amostras clínicas



O gene TEM, o primeiro descrito para a presença de ESBL, apresentou em sua maioria, o subtipo TEM-1, frequente em 5 amostras, seguido pelos subtipos TEM-122 e TEM-163, ambos com duas detecções cada. O gene TEM-1 tem sua frequência no Brasil publicado por diversos autores, como Kanafani et al., (2017) em detecção de pacientes hospitalizados com infecções causadas por microrganismos produtores de beta-lactamase de espectro estendido, identificaram 39% de prevalência deste subtipo entre as cepas isoladas. Os autores Cabral et al., (2017) ao pesquisar os mesmos genes deste estudo em cepas do gênero *Enterobacter* em pacientes de um hospital de Pernambuco, atestaram este mesmo subtipo em 90% das bactérias sequenciadas.

A disseminação de TEM-1 é explanada por Bradford (2001) e Ali et al. (2018) que detalham que após a descoberta do subtipo TEM-1 este rapidamente se espalhou pelo mundo e está presente em muitas espécies de diferentes membros da família Enterobacteriaceae e cepas de *Pseudomonas aeruginosa*. Estes dados corroboram com nosso estudo em que a referida família e as cepas supracitadas foram as mais frequentes.

O gene TEM-1 também é encontrado com frequência associado com outros genes de resistência, um exemplo é sua detecção conjunta com o *mcr-1*, que ocasiona a hidrólise de diversas classes de antimicrobianos, identificado por WU et al, (2018) em animais destinados ao consumo humano (frangos). Dos isolados deste estudo, 86,0% foram portadores de genes TEM na proporção 46,5%; entre estes, O TEM-1 foi responsável por 80,0%, uma prevalência notável em animais de produção, e os restantes foram os genes TEM-52 e TEM-116.

Anteriormente, neste documento, o gráfico 2, apresenta a frequência de 62,5% de resistência ao fármaco levofloxacina, uma quinolona de terceira geração, antimicrobiano não-betalactâmico e de amplo uso no ambiente hospitalar. Os autores Dalhoff; Schubert; Vente (2017) em análise da farmacodinâmica da finafloxacina, ciprofloxacina e levofloxacina no soro e na urina contra enterobactérias produtoras de beta-lactamase de espectro estendido tipos TEM e SHV em pacientes com infecções do trato urinário, explanaram que cepas de *E. coli* produtoras de TEM-1 apresentam resistência compartilhada à quinolona mediada por plasmídeo associada aos genes do tipo *qnr* - que reduzem as atividades da ciprofloxacina e da levofloxacina.

Os autores Castanheira et al., (2013), em estudo da prevalência de genes codificadores de beta-lactamase entre os isolados de bacteremia associados à família Enterobacteriaceae coletados em 26 hospitais dos EUA, mencionaram a presença conjunta dos subtipos TEM-1 e SHV-11. O gene SHV apresentou a maior variedade de subtipos (9) nesta pesquisa, o tipo SHV-11 obteve a maior frequência: 3 isolados em 12 cepas.

Em uma contextualização histórica, Ahamed; Kundu, (1999), realizaram a caracterização molecular da beta-lactamase de SHV-11 de *Shigella dysenteriae*. Os autores já consideravam que o gene codificante desta enzima, ao transportar a substituição de aminoácidos Leucina-Glicina na posição 35, tornou-se promotor de forte variante em relação à enzima original SHV-1. Esta mutação, ocasionou a hidrólise de oxacilina, cloxacilina e das oximiinocefalosporinas, como a cefotaxima.

Em concordância com os achados de SHV-11, Shahraki-Zahedani et al., (2016) em busca da identificação de novos subtipos de TEM e SHV em *Klebsiella pneumoniae* no Irã, mostraram que o gene SHV é altamente prevalente (92,7%) em cepas clínicas produtoras de ESBL, e os subtipos mais frequentes foram SHV-11, SHV-1 e SHV-12. e foram relatados como os ESBLs dominantes nas cepas resistentes de *K. Pneumoniae*. Dentre estes genes, apenas não foi identificado o subtipo SHV-1 em nossos resultados.

De acordo com Liakopoulos; Mevius; Ceccarelli, (2016), o SHV-11 representa a provável fonte de evolução para as variantes SHV em ESBL existentes. Os autores citam o SHV-11 identificado pela primeira vez codificado por plasmídeos em cepas de *K. pneumoniae* em amostras clínicas e desde então tem sido isolado em todo o mundo. Ressaltam também que uma das associações mais eficazes deste subtipo, junto com o SHV-12, ocorre entre cepas de Enterobacteriaceae e *Acinetobacter baumannii*, contribuindo para a disseminação preocupante de estirpes produtoras de ESBL especialmente em surtos clínicos.

Os outros subtipos de SHV identificados (dispostos no gráfico 3), não possuem a frequência de relatos como os 11 e 12, mas também são relacionados à casos clínicos. Vasaikar et al., (2017) no Hospital Nelson Mandela em Mthatha, África do Sul, discorrem que os tipos de SHV com menor detecção, são mutações do gene primeiramente descoberto e apresentam o perfil comum de hidrólise deste.

O gene CTX-M também é localizado em conjunto com o TEM e SHV, demonstrado anteriormente nesta pesquisa (Tabela 10). O sequenciamento deste gene, evidenciou o subtipo com maior número de detecções o CTX-M-15 (n=7), classificado como o mais frequente no Brasil e no mundo (NOGUEIRA, et al., 2015; TOKAJIAN, et al., 2018), consideram as cepas com este subtipo, pandêmicas no mundo.

Em adição, CTX-M-15 foi estabelecido por Ogbolu et al., (2018) como o mais frequente na maioria das Enterobacteriaceae e Pseudomonas uropatogênicas multirresistentes de hospitais da Nigéria.

Leistner et al., (2014) determinaram este gene como mais frequente em pesquisa de mortalidade e epidemiologia molecular associada à produção de beta-lactamase de espectro

estendido em *Escherichia coli* a partir de infecção da corrente sanguínea. Relacionaram à fatores que ocasionam mortalidade por cepas multirresistentes à betalactâmicos, a presença deste subtipo, como idade do paciente (idosos), tempo de internação na UTI, entre outros.

Relacionado também a surtos, como o descrito por Bousquet et al., (2017) na pesquisa de cepas de *Enterobacter cloacae* produtoras de CTX-M-15 associado a leitos terapêuticos em unidade de terapia intensiva, o esfregaço microbiano revelou contaminação bacteriana de alguns colchões entre os isolados ambientais, de triagem e clínicos (estetoscópios). Este surto resultou no fechamento temporário da UTI para o a desinfecção e assepsia do ambiente.

Em unidades de saúde em que não haviam dados sobre prevalência de genes ESBL, o CTX-M-15 ao ser detectado, apresentou-se como em maior número. Um exemplo desta afirmação é a detecção nunca antes realizada de CTX-M-15 em *Escherichia coli* uropatogênica isolada de cinco grandes hospitais em Trípoli, Líbia. Zorgani et al., (2017) em busca deste gene pela primeira vez, isolaram este subtipo em 89,7% de 346 amostras pesquisadas.

Em complemento à presença do CTX-M-15, foi identificado o subtipo CTX-M-152, percebido em relato científico dos autores Azam; Jan; Haq, (2016) que o determinou como uma nova variante do tipo CTX-M-25, em um estudo realizado sobre a prevalência de resistência a múltiplas drogas entre os habitantes naturais do rio Yamuna, na Índia. Esta alteração, com a presença de dois novos aminoácidos em duas posições (Serina 237 e Arginina 276) no CTX-M-152 ocasiona alta eficácia catalítica da enzima produzida.

#### 4.2 CARACTERIZAÇÃO DE ESBL EM CEPAS ISOLADAS NO EFLUENTE HOSPITALAR

Os resultados das amostras provenientes do efluente foram obtidos utilizando o dispositivo desenvolvido a partir desta pesquisa. O dispositivo foi registrado no Instituto Nacional de propriedade Industrial sob o número BR 20 2018 009448. O instrumento denominado Coletor de efluentes em profundidade, proporcionou a coleta em tanque séptico, ao atingir exatamente a profundidade necessária (30cm), com amostras isoladas pertencentes à classe das ESBLs. A amostragem ocorreu com a mínima interferência de detritos da superfície.

As principais vantagens do aparato identificadas e descritas no processo de registro de patente foram: portabilidade, fácil manuseio, baixo custo estimado para a produção e aquisição.

A aplicabilidade é variada, estendida para todos os tipos de efluentes: industriais, coleta de combustíveis, etc.

O instrumento será disponibilizado às empresas relacionadas a pesquisa e ao setor produtivo para comercialização.

#### 4.2.1 Identificação fenotípica e genotípica das cepas isoladas no efluente hospitalar.

Pela análise do perfil bacteriológico do efluente, nos três tanques sépticos coletados, foi possível identificar 10 cepas Gram-negativas, dentre estas 40% foram do gênero *Klebsiella*, 20% *Pseudomonas*; e as cepas de *Ochrobactrum pseudintermedium*, *E.coli* e *Citrobacter freundii* representaram cada uma 10% . As ocorrências de detecção por tanque, estão demonstradas na Tabela 12.

Tabela 13 – Distribuição das espécies identificadas de acordo com o ponto de coleta de efluente.

PONTO DE COLETA	GÊNERO/ESPÉCIE
<b>Pc1</b> (UTI 1 e 2)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
	<i>Escherichia coli</i>
	<i>Pseudomonas sp.</i>
<b>Pc2</b> (centro cirúrgico)	<i>Ochrobactrum pseudintermedium</i>
	<i>Klebsiella rhinoscleromatis.</i>
	<i>Pseudomonas sp.</i>
	<i>Citrobacter freundii</i>
<b>Pc3</b> (Todos os blocos)	<i>Klebsiella oxytoca</i>
	<i>Klebsiella oxytoca</i>
	<i>Enterobacter cloacae</i>

Legenda: Pc1= Ponto de coleta 1 Pc2= Ponto de Coleta 2 Pc3=Ponto de Coleta 3

Em relação à distribuição dos isolados por ponto de coleta/tanque séptico, o ponto 1 (UTI 1 e 2) e o ponto 2 (Centro cirúrgico) apresentaram 30% das detecções e o ponto 3 (corresponde a todos os blocos do hospital) de 40% das cepas.

A análise fenotipicamente previamente caracterizada pela disponibilização dos testes bioquímicos para a identificação de gênero/espécie, da mesma maneira que as cepas clínicas, apresentou alteração taxonômica após o sequenciamento do gene ribossomal 16s. Esta modificação ocorreu em 3 cepas, representando 30% das cepas isoladas no efluente. Foram utilizados os mesmos controles de qualidade do teste das cepas clínicas (ATCC 25922 e ATCC 700603). Os resultados da diferença encontrada entre os resultados fenotípicos e genotípicos está apresentando na tabela 13.

Tabela 14 – Comparação dos resultados fenotípicos e genotípicos (sequenciamento do gene RNAr16S) das amostras do efluente (apenas resultados discordantes)

<b>Ordem</b>	<b>Identidade Fenotípica</b>	<b>Identidade Genotípica</b>
<b>CP</b>	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Escherichia coli</i>
<b>CP</b>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<b>1</b>	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Enterobacter cloacae</i>
<b>2</b>	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Ochrobactrum pseudintermedium</i>
<b>3</b>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>

CP = Controle Positivo; ATCC = American Type Culture Collection

Os resultados por gênero/espécie no efluente condizem com os achados nas cepas clínicas que demonstram *Klebsiella* sp. como mais frequente entre os isolados. Prado et al. (2008), ao delinearem o perfil de cepas ESBL positivas em efluentes de fonte hospitalar, descrevem em seu estudo, que as cepas de *K. pneumoniae* foram detectadas em todas as amostras analisadas, representando 46,5% do total das estirpes isoladas.

Isolados de *K. pneumoniae* (96,4%) capazes de produzir cápsula polissacarídica, importante fator de virulência bacteriana, foram detectados por Barati, et al., (2016) em estuários na Malásia, os autores determinaram que a presença de cepas de *Klebsiella* potencialmente patogênicas no estuário está provavelmente ligada à contaminação antrópica.

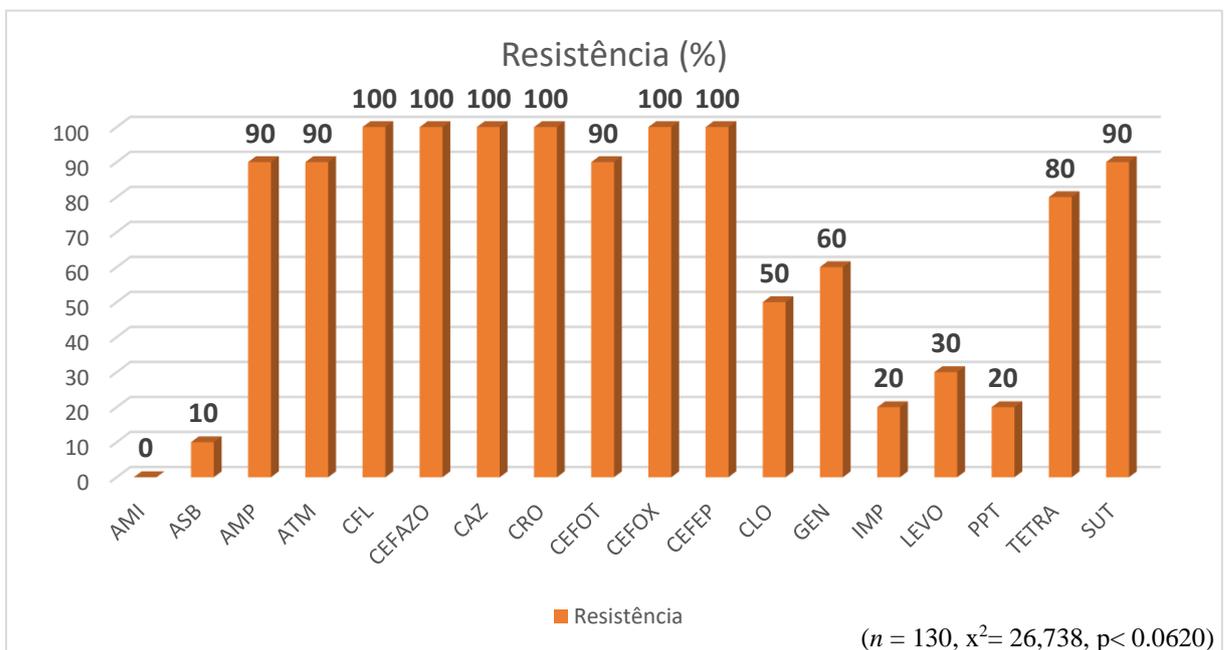
A presença da espécie *Ochrobactrum pseudintermedium* (antes identificada pela série bioquímica como *Pseudomonas* sp.), é citada por Teyssier et al. (2007), que a caracterizaram pelo metabolismo e pelo sequenciamento do gene RNAr 16S. A limitação dos testes fenotípicos e descrita por estes autores ao citar que a espécie pertencente à família Brucellaceae é uma

Gram-negativa não fermentadora da glicose, catalase e citocromo oxidase positiva, metabolismo semelhante à maioria das espécies do gênero *Pseudomonas*, porém diferem na descarboxilação do aminoácido arginina, pois *O.pseudintermedium* é arginina negativa.

#### 4.2.2 Perfis de sensibilidade e resistência das cepas isoladas

Em concordância com o perfil de resistência em cepas clínicas, a caracterização fenotípica de ESBL confirmou a hidrólise das cefalosporinas de primeira à quarta geração, a análise do perfil de resistência, apresentou resistência de 100% à todas as cefalosporinas testadas, e 90% ampicilina, sulfatrimetoprima e ao aztreonam. O Gráfico 4 representa o perfil completo de resistência aos antimicrobianos.

Gráfico 4 – Perfil de resistência a antimicrobianos das cepas do efluente ESBL positivas.



Legenda: AMI: Amicacina; ASB: Ampicilina/Sulbactam; AMP: Ampicilina; ATM: Aztreonam; CFL: Cefalexina; CEFAZO: Cefazolina; CAZ: Cefadizima; CRO: Ceftriaxona; CEFOT: Cefotaxima; CEFOX: Cefoxitina; CEFEP: Cefepime; CLO: Cloranfenicol; GEN: Gentamicina; IMP: Imipenem; LEVO: Levofloxacina; PPT: Piperacilina/Tazobactam; Tetra: Tetraciclina; SUT: Sulfatrimetoprima.

É importante observar a frequência de 30% na resistência à levofloxacina, pois a classe das quinolonas é descrita como antimicrobianos não betalactâmicos, mas que apresentam co-

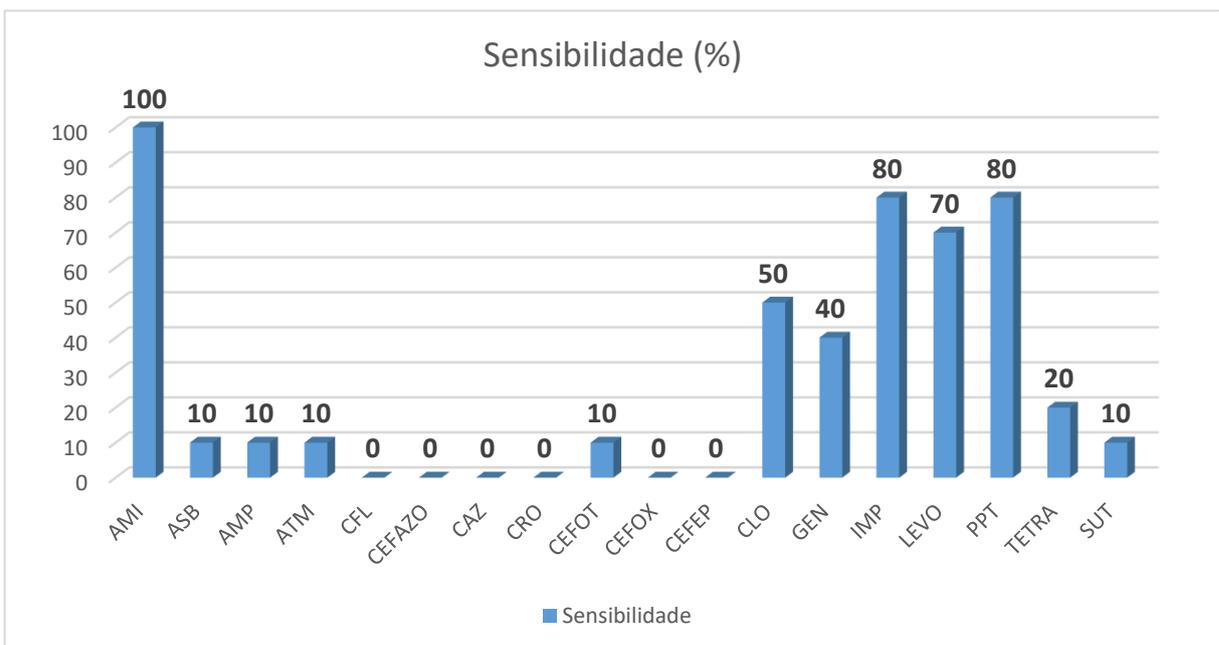
resistência em infecções ocasionadas por ESBLs, fato evidenciado em pesquisa realizada por Wani et al. (2010) em detecção de ESBL em diversas amostras clínicas coletadas de um hospital terciário na Índia, apresentaram a resistência de 100% à levofloxacina e moxifloxacina seguido de ofloxacina e ciprofloxacina 96,2% e 93,1%, respectivamente.

Ao ser realizada a distribuição da resistência aos antimicrobianos por microrganismo, detectou-se que as cepas de *Klebsiella sp.* foram as que apresentaram a maior frequência e resistência a um maior número de antibióticos (42%), seguidas por 30% de *Pseudomonas sp.*, 17% em *E.coli* e 11% em *Citrobacter freundii* ( $n = 132$ ,  $\chi^2 = 42,727$ ,  $p < 0.0001$ ).

Os três pontos de coleta, apresentaram elevados níveis de resistência. No entanto, o Ponto 3 foi o que apresentou maior ocorrência com 45%, a detecção no Ponto 2 foi 25% e no Ponto 1 de 30 % ( $n = 132$ ,  $\chi^2 = 8,227$ ,  $p < 0.0163$ ). O menor percentual encontrado no segundo ponto de coleta pode ser devido à reforma que estava sendo realizada no centro cirúrgico do Hospital Geral de Roraima, o que possivelmente ocasionou um menor número de microrganismos isolados.

A sensibilidade aos fármacos, apresentou a ocorrência de 100% à amicacina, 80% ao imipenem e piperaciclina associada ao tazobactam e 70% à levofloxacina. Estes são considerados de escolha para o tratamento de infecções relacionadas à ESBL. As frequências estão demonstradas no Gráfico 5.

Gráfico 5 – Perfil de sensibilidade à antimicrobianos das cepas do efluente ESBL positivas.



Legenda: AMI: Amicacina; ASB: Ampicilina/Sulbactam; AMP: Ampicilina; ATM: Aztreonam; CFL: Cefalexina; CEFAZO: Cefazolina; CAZ: Cefadizima; CRO: Ceftriaxona; CEFOT: Cefotaxima; CEFOX: Cefoxitina; CEFEP:

Cefepime; CLO: Cloranfenicol; GEN: Gentamicina; IMP: Imipenem; LEVO: Levofloxacina; PPT: Piperacilina/Tazobactam; Tetra: Tetraciclina; SUT: Sulfatrimetroprima.

A sensibilidade à antimicrobianos não Betalactâmicos em efluente, pode ser observada no estudo de avaliação da resistência a antibióticos em bactérias isoladas de efluente hospitalar em um hospital universitário de Maringá realizado por Abreu et al. (2010), em que foram isoladas e identificadas 39 cepas, e dentre estas, 18 espécies apresentaram resistência aos antibióticos sendo que 82,1% foram sensíveis à ciprofloxacina e 71,8% à amicacina e gentamicina. Os autores da pesquisa referida anteriormente, sugerem nas considerações finais a necessária implantação de um sistema eficiente de tratamento de seus efluentes.

Similar observação é encontrada no trabalho realizado por Cavalcanti et al. (2011), ao caracterizar microbiologicamente o efluente de um hospital em Natal-RN, afirmam que o tratamento deste tem finalidade de melhorar a qualidade de vida da população e a saúde pública local devido a diminuição do lançamento de cepas multirresistentes no recurso hídrico receptor. Em Diagnóstico sobre a situação do tratamento do esgoto hospitalar no Brasil, Vecchia et al. (2009) constataram que apenas três hospitais no Brasil possuem algum tipo de tratamento de esgoto hospitalar, unidades estas localizadas nas regiões Sul e Sudeste do Brasil.

#### **4.2.3 Detecção molecular dos genes TEM, SHV e CTX-M das cepas isoladas**

Entre as 10 cepas isoladas do efluente e identificadas fenotipicamente, 8 destas apresentaram amplificação positiva para a presença dos genes de beta-lactamase. O ponto de coleta 2 (Pc2) apresentou a menor frequência de detecção (3 achados fenotípicos e 1 cepa com identificação molecular). A amplificação dos genes codificantes entre as cepas ESBL positivas por PCR, mostrou que 37,5% destas apresentaram o gene TEM, 12,5% o SHV, 12,5% simultaneamente os genes TEM+SHV, 12,5% CTX+TEM e 25% obtiveram detecção positiva para os 3 genes simultaneamente. O gene CTX-M foi encontrado apenas em associação (tabela 14).

Tabela 15 – Distribuição nas cepas do efluente hospitalar dos genes codificantes de ESBL por gênero/espécie bacteriana

Pontos	N° de Cepas Identificadas	Genes de resistência encontrados						
		TEM	CTX	SHV	CTX + SHV	TEM + SHV	CTX + TEM	CTX + TEM + SHV
<b>1</b> UTI 1 e 2	3	1	-	1	-	1	-	-
<b>2</b> UTI 3	1	-	-	-	-	-	-	1
<b>3</b> Todos os Blocos	4	2	-	-	-	-	1	1
<b>TOTAL</b>	<b>8</b>	<b>3</b>	<b>-</b>	<b>1</b>	<b>-</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>2</b>

Os resultados obtidos na amplificação dos genes de efluente, foram análogos aos descritos em cepas clínicas e similares à pesquisa de investigação de cepas presentes em efluente e Infecções urinárias realizadas por Zarfel et al., (2013), que identificou em quatro dos isolados de *E.coli* ESBL positivas (Três de lodo de esgoto e um da UTI), três destes abrigavam o gene TEM, sendo considerado o mais prevalente em amostras de efluente.

Chagas et al., (2011), ao investigar a diversidade bacteriana, padrões de resistência antimicrobiana e tipos de genes de beta-lactamase em bactérias Gram-negativas isoladas de efluente hospitalar no Rio de Janeiro, reportaram que os isolados mais comuns produtores de ESBL foram cepas de *K.pneumoniae*, *E.cloacae* e *E.coli*. O gene TEM, SHV e CTX-M foram detectados em 82, 48 e 67% de isolados bacterianos, respectivamente.

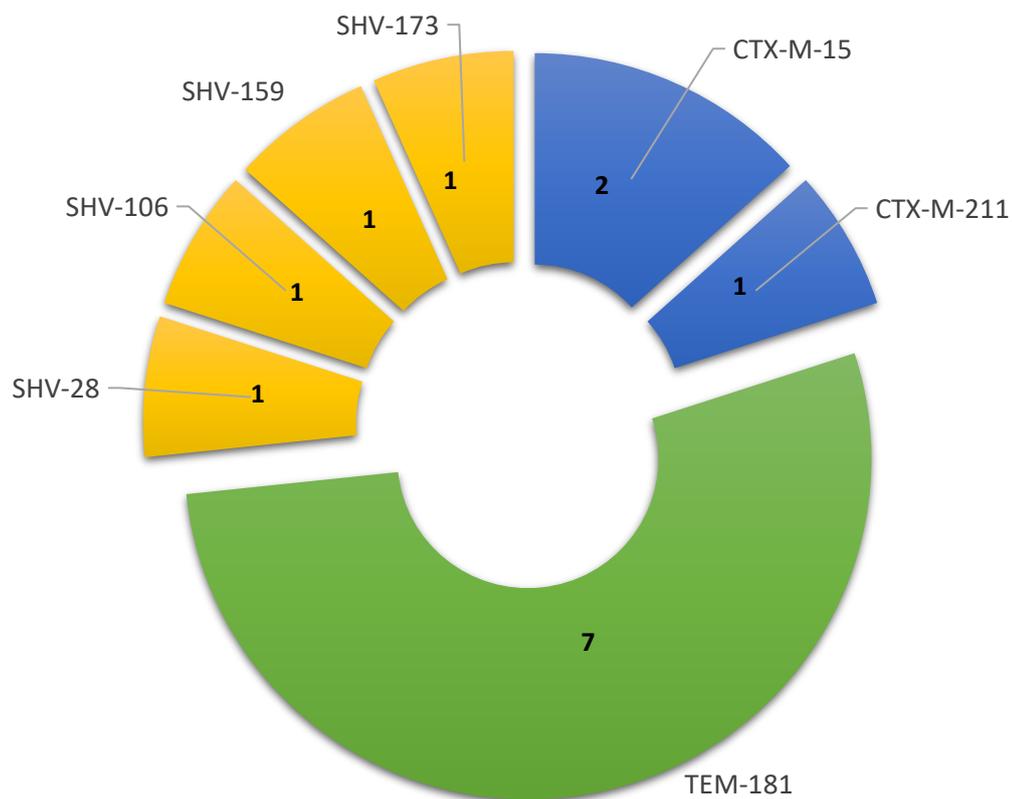
Em avaliação quantitativa de *E. coli* produtora de beta-lactamase de espectro estendido em águas residuais de um hospital universitário francês em comparação às cepas encontradas em pacientes internados na mesma unidade hospitalar, Drieux et al. (2016) através do processo de genotipagem, ao relacionar os subtipos do gene CTX, o mais prevalente na pesquisa, constataram que a presença bactérias produtoras de ESBL em pacientes pode levar a uma difusão desta enzima através do efluente hospitalar e finaliza ao concluir que os serviços de saúde desempenham um papel importante na disseminação de cepas produtoras de ESBL, através do não tratamento de seus resíduos.

#### 4.2.4 Sequenciamento dos genes amplificados por PCR das cepas isoladas

#### 4.2.5 Comparação entre os subtipos

Para as cepas provenientes do efluente do HGR, foram obtidas 14 sequências de bactérias ESBL positivas através da técnica de PCR: 7 para o gene TEM, 4 para SHV e 3 para CTX-M. O sequenciamento comprovou a presença de diversos subtipos. Sendo evidenciados 1 para o gene TEM, 4 para o SHV e 2 para o CTX-M. A apresentação dos subtipos e total de amostras sequenciadas dos efluentes estão representados no Gráfico 6.

Gráfico 6 - Distribuição dos subtipos dos genes relacionados a resistência (n) nos efluentes hospitalares



Na comparação entre as espécies identificadas e a presença dos subtipos de ESBL, o gênero *Klebsiella*, que já corresponde como o mais frequente nesta pesquisa tanto em cepas clínicas e no efluente, apresentou o maior número de variantes entre os genes identificados (tabela 15).

Tabela 16 – Subtipos de genes de ESBL provenientes de cepas isoladas do efluente de acordo com o gênero/espécie.

ORDEM	Ponto de Coleta	Amostr a	Espécie	GENE/SUBTIPO		
				CTX-M	TEM	SHV
1	P1	1A1	<i>Klebsiella oxytoca</i>		181	106
2	P1	1A2	<i>Escherichia coli</i>		181	
3	P1	1A3	<i>Pseudomonas spp.</i>			159
4	P2	2A2	<i>Klebsiella rhinoscleromatis</i>	15	181	28
5	P3	3A1	<i>Citrobacter freundii</i>	15	181	
6	P3	3A2	<i>Klebsiella oxytoca</i>	211	181	173
7	P3	3A3	<i>Klebsiella oxytoca</i>		181	
8	P3	3A4	<i>Pseudomonas sp.</i>		181	

A análise do resultado para o gene TEM apresentou apenas 1 subtipo identificado em 7 amostras sequenciadas: TEM-181. Este, difere dos achados para amostras clínicas, em que o gene TEM-1, mais prevalente no Brasil, obteve maior frequência.

A primeira publicação deste subtipo foi realizada por Zeil et al., (2016) e o caracterizou como uma das 474 variantes do gene TEM. Classificou o TEM-181 como mutação direta de outro subtipo: TEM-116. Os autores relatam que mutações únicas podem resultar em enzimas funcionais que possuem perfil de hidrólise diferente do gene original.

O gene TEM-181 foi descrito também por Sakellariou et al., (2018) em pesquisa de sepse causada por *K. pneumoniae* e *E. coli* positivas para beta-lactamase (ESBL) de espectro estendido. Este subtipo, foi encontrado em menor frequência no trabalho dos referidos autores. No entanto, assim como neste estudo (Tabela 11), os autores identificaram em associação com os genes SHV e CTX-M.

Este subtipo do gene TEM é pouco descrito na literatura científica, contudo, mesmo em poucas citações, sempre está associado a investigação de mortalidade relacionada às infecções ocasionadas por ESBL, como explanado por Leistner et al., (2014) em isolamento de cepas provenientes de hemoculturas. O que gera grande atenção por ter sido isolado em efluente hospitalar e passível de disseminação no meio ambiente.

O sequenciamento do gene SHV, semelhante aos resultados do TEM para efluente, apresentou resultado diverso às amostras clínicas, com subtipos diferentes. A ocorrência foi de 4 amostras e 4 subtipos (SHV-28, 106, 159 e 173).

De acordo com Nogueira et al., (2015) O SHV é o segundo gene pertencente ao grupo de ESBL que é mais comum no Brasil. Cepas ESBL positivas isoladas de efluentes, apresentam

ampla resistência à tetraciclina, ampicilina/ácido clavulânico e sulfametoxazol/trimetoprima. Os tipos CTX-M-15 e os genes TEM estão entre os mais comumente detectados em Enterobactérias recuperadas de redes de esgoto.

Alguns dos subtipos encontrados em nossa pesquisa, apresentam relação direta com cepas identificadas em infecções nosocomiais. O SHV-28, foi localizado também por Kwon et al., (2016) através de sequenciamento no genoma de *K. pneumoniae*, em conjunto com 19 genes de resistência a antibióticos, incluindo os genes TEM e SHV.

Algumas variantes parecem ser restritas geograficamente. O gene SHV-106, identificado em nosso estudo, anteriormente havia sido descrito apenas em isolados portugueses de *K. pneumoniae* juntamente com TEM-1 e/ou CTX-M-32 (LIAKOPOULOS; MEVIUS; CECCARELLI, 2016).

Para o gene CTX-M, genótipo ESBL mais prevalente em estudos de efluentes na maioria das regiões do mundo, incluindo as Américas, Europa e Oriente Médio, foram identificados 3 amostras e 2 subtipos (CTX-M-15 (n=2) e CTX-M-211 (n=1)). Neste trabalho o CTX-M foi o gene de menor frequência nas pesquisas dos tanques sépticos. No entanto, é importante ressaltar a presença do CTX-M-15, já explanado nos dados referentes às amostras clínicas, como o mais disseminado em todo o mundo.

Tokajian, et al., (2018) em pesquisa realizada em um campo de refugiados no Líbano, isolou este subtipo em Enterobactérias recuperadas da água do mar, rios, efluentes de águas residuárias, estações de tratamento de esgoto e hospitais, e foi associado com os subtipos TEM-1 e OXA-1. Os autores detectaram os genes CTX-M, TEM e SHV em porcentagens maiores (CTX-M, TEM) ou similares (SHV) entre os isolados dos efluentes do rio comparados aos do campo de refugiados.

Nogueira, et al., (2015), chamam atenção para a emergência e constante presença destes genes (CTX-M) ao dizer que as ESBLs estão aumentando em frequência entre várias espécies de enterobactérias. Os autores explanam que o conhecimento dos subtipos e as variantes que proporcionam alteração na hidrólise de enzimas, é de suma importância para o controle da infecção nosocomial.

O sequenciamento dos genes de ESBL realizado neste estudo, possibilita a composição de um novo mapa de resistência bacteriana no Brasil, cenário até então desconhecido em relação ao estado de Roraima (Figura 21).



Tabela 17 – Subtipos identificados no efluente hospitalar e amostras clínicas. Relação gene/subtipo.

<b>Local de amostragem</b>	<b>N</b>	<b>GENE/SUBTIPO</b>		
		<b>CTX-M</b>	<b>TEM</b>	<b>SHV</b>
<b>Efluente</b>	14	3	7	4
<b>Amostras clínicas</b>	37	16	9	12
<b>TOTAL</b>	51	19	16	16

( $n = 51$ ,  $\chi^2 = 14,294$ ,  $p = 0.0138$ )

A análise da tabela 16, possibilita observar que não houve a mesma predominância entre os subtipos/genes de ESBL nas cepas clínicas e do efluente. Os subtipos CTX-M apresentaram maior frequência nas amostras do material clínico e para as cepas provenientes dos tanques sépticos, os subtipos do gene TEM.

A maior frequência em cepas clínicas dos subtipos relacionado ao gene CTX-M, deve-se à emergência deste como mais prevalente em infecções nosocomiais, Nogueira et al., (2015), chamam atenção para a constante presença destes genes (CTX-M) em infecções multirresistentes e que as ESBLs estão aumentando em frequência entre várias espécies de enterobactérias. Os autores explanam que o conhecimento dos subtipos e as variantes que proporcionam alteração na hidrólise de enzimas, é de suma importância para o controle da infecção nosocomial.

O gene TEM, com subtipo mais frequente entre as cepas do efluente, foi analisado por YI, et. al, (2015), em estudo do destino e comportamento de genes produtores de  $\beta$ -lactamase de espectro estendido em estações municipais de tratamento de esgoto. Os resultados mostraram que os tipos CTX-M, SHV e OXA diminuíram significativamente no processo de tratamento biológico (lodo ativado e digestão anaeróbia) entretanto, o tipo TEM não foi efetivamente eliminado.

Os autores concluíram que, possivelmente, micróbios hospedeiros de TEM poderiam ser mais resistentes em genes-alvo ou, até certo ponto, na transferência de genes em processos de tratamento de águas residuais. Dado este que serviria como hipótese para a persistência destes genes/subtipos como mais frequentes nas amostras do efluente do Hospital Geral de Roraima e implica na necessidade de estudos futuros.

## 5 CONCLUSÃO

Através dos resultados e análises percebidas nesta pesquisa, relacionadas aos genes de ESBL em amostras clínicas e efluente no Hospital geral de Roraima, pode-se concluir:

- O material clínico mais prevalente foi a urina e as espécies com maior frequência foram as pertencentes ao gênero *Klebsiella*, geralmente associada à grande número de infecções em pacientes de unidade de saúde;
- No perfil dos fármacos concernentes às amostras clínicas, prevaleceu a resistência característica das cepas com perfil ESBL, aos fármacos beta-lactâmicos. Esta se estendeu à outras classes de antimicrobianos, o que indicou a hipótese de resistência intrínseca;
- Nas mesmas amostras, a amplificação dos genes indicou o gene TEM, como mais frequente, com detecção de SHV e CTX-M;
- O sequenciamento dos genes de ESBL, apresentou vários subtipos, com destaque para os subtipos TEM-1, SHV-11 e CTX-M-15. Todos relacionados a pesquisas de morbimortalidades relacionadas aos perfis de beta-lactamases;
- Foram isoladas cepas ESBL positivas em todas as amostras de efluente;
- O resultado para as amostras coletadas a partir do efluente, foi similar ao de amostras clínicas em relação ao gênero mais frequente (*Klebsiella sp.*) e ao perfil de sensibilidade/resistência para as cepas identificadas (hidrólise dos beta-lactâmicos);
- Idêntico aos achados em cepas clínicas, a amplificação dos genes do efluente, obteve a presença dos genes TEM, CTX e SHV;
- O sequenciamento dos genes amplificados em efluentes, apresentou a frequência de 100% do subtipo TEM-181 entre os isolados para o gene TEM. O que gerou grande atenção por ser descrito na literatura como relacionado à sepse e investigação de mortalidade por ESBL;
- O sequenciamento do gene SHV, apresentou resultado diverso às amostras clínicas, tal como o gene TEM, com subtipos diferentes aos identificados nos pacientes da UTI. As variantes SHV-106, nunca havia sido descritas no Brasil;
- O gene CTX-M-15 foi o subtipo associado ao gene CTX com maior número de identificações. Descrito como o mais disseminado em todo o mundo;
- Os resultados apresentados nesta pesquisa demonstram a ampla disseminação dos genes ESBL no HGR.

- Este trabalho, indica a possibilidade de pesquisas futuras em relação à disseminação destes genes e seus subtipos para além dos efluentes hospitalares e a presença desse tipo de resistência em infecções comunitárias.

## REFERÊNCIAS

- ABREU, E.T. et al. Avaliação da resistência a Antimicrobianos de bactérias isoladas de efluente hospitalar. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 32, n. 1, p. 1-5, 2010.
- AHAMED, J.; KUNDU, M. Molecular characterization of the SHV-11 beta-lactamase of *Shigella dysenteriae*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 43, n. 8, p. 2081-2083, 1999.
- AHMED, O.I. et al. Detection of bla SHV and bla CTX-M genes in ESBL producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from Egyptian patients with suspected nosocomial infections. **The Egyptian Journal of Medical Human Genetics**, v. 14, p.277–283, 2013.
- ALI, T. et al. The Growing Genetic and Functional Diversity of Extended Spectrum Beta-Lactamases. **BioMed Research International**, v. 2018, 2018.
- AMINOV, R. I. A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. **Frontiers in microbiology**, v. 1, p. 134, 2010.
- ARAÚJO, J.G. et al., Perfil de DNA plasmidial em bactérias resistentes a Antimicrobianos isoladas do Ribeirão Paciência – Pará de Minas-MG. **SynThesis Revista Digital FAPAM**, Pará de Minas, n.1, 2009.
- ARNOLD, R. S. et al. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing bacteria. **Southern medical journal**, v. 104, n. 1, p. 40, 2011
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 9898**: Preservação e técnicas de amostragem de efluentes líquidos e corpos receptores. Rio de Janeiro, 1987.
- AYRES, M. et al. BioEstat 5.0. **Imprensa Oficial do Estado do Pará**, v. 323, 2007.
- AZAM, M.; JAN, A. T.; HAQ, Q. M.R. blaCTX-M-152, a novel variant of CTX-M-group-25, identified in a study performed on the prevalence of multidrug resistance among natural inhabitants of River Yamuna, India. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 176, 2016.
- BAJPAI, T. *et al.* Accurate identification of urinary isolates: Integration of conventional, automated, and molecular methods. **International Journal of Health & Allied Sciences**, v. 6, n. 2, p. 82-87, 2017.
- BALI, E.B et al., Phenotypic and molecular characterization of SHV, TEM, CTX-M and extended-spectrum-beta-lactamase produced by *Escherichia coli*, *Acinobacter baumannii* and *Klebsiella* isolates in a Turkish hospital. **African Journal of Microbiology Research**, v. 4, n., p. 650-654, April, 2010.
- BARATI, A. et al. Isolation and characterization of aquatic-borne *Klebsiella pneumoniae* from tropical estuaries in Malaysia. **International journal of environmental research and public health**, v. 13, n. 4, p. 426, 2016.

BARRIOS, H. et al. ESBL-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: The most prevalent clinical isolates obtained between 2005 and 2012 in Mexico. **Journal of global antimicrobial resistance**, v. 10, p. 243-246, 2017

BENNETT, P. M. Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. **British journal of pharmacology**, v. 153, n. S1, p. S347-S357, 2008.

BEVERIDGE, T. J. Estruturas de paredes celulares Gram-negativas e suas vesículas de membrana derivados. **Journal of bacteriology**, v. 181, n. 16, p. 4725-4733, 1999.

BOUSQUET, A. et al. Outbreak of CTX-M-15–producing *Enterobacter cloacae* associated with therapeutic beds and syphons in an intensive care unit. **American journal of infection control**, v. 45, n. 10, p. 1160-1164, 2017.

BRADFORD, P. A. Extended spectrum beta-lactamase in the 21 century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistant threat. **Clinical Microbiol Rev**, v. 14, p. 933-51, 2001.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Gerência de Investigação e Prevenção das Infecções e dos Eventos Adversos (Gipea) e Gerência Geral de Tecnologia em Serviços de Saúde (GGTES). **Investigação e Controle de bactérias Multirresistentes**. Brasília: ANVISA, 2007. 21 p. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controlereiss/manual%20controle\\_bacterias.pdf](http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controlereiss/manual%20controle_bacterias.pdf)>. Acesso em: 15 maio 2015.

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

BROLUND, A. Overview of ESBL-producing Enterobacteriaceae from a Nordic perspective. **Infection ecology & epidemiology**, v. 4, 2014.

\_\_\_\_\_, A. et al. Plasmidome-analysis of ESBL-producing *Escherichia coli* using conventional typing and high-throughput sequencing. **PLoS One**, v. 8, n. 6, p. e65793, 2013.

BUSH, K.; JACOBY, G. A. Updated functional classification of  $\beta$ -lactamases. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 54, n. 3, p. 969-976, 2010.

CABRAL, A.B. et al. Clonal spread and accumulation of  $\beta$ -lactam resistance determinants in *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae* complex isolates from infection and colonization in patients at a public hospital in Recife, Pernambuco, Brazil. **Journal of medical microbiology**, v. 66, n. 1, p. 70-77, 2017.

CARMO, S.D. et al. Detecção de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) em isolados de *escherichia coli* uropatogênicas (UPECS) oriundos de pacientes da comunidade. **Revista de Patologia Tropical**, v.41, n.4, p.419-426, out.-dez. 2012.

CASTANHEIRA, M. et al. Prevalence of beta-lactamase encoding genes among Enterobacteriaceae bacteremia isolates collected in 26 USA hospitals: Report from the

SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2010). **Antimicrobial agents and chemotherapy**, p. AAC. 02252-12, 2013.

CAVALCANTI, Dany Geraldo Kramer et al. Caracterização físico-química e microbiológica de efluente hospitalar na Região Metropolitana do Natal-RN-Brasil. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 11, n. 1, p. 205-210, 2011.

CHAGAS T.P.G. et al. Multiresistance, beta-lactamase-encoding genes and bacterial diversity in hospital wastewater in Rio de Janeiro, Brazil. **J. Appl. Microbiol.**, v. 111 p. 572–581, 2011.

CHANDRAMOHAN, L; REVELL, A.P. Prevalence and Molecular Characterization of Extended-Spectrum- $\beta$ -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae in a Pediatric Patient Population. **Antimicrob. Agents Chemother**, v.56, n.9, p. 4765–4770, September 2012.

CHAPMAN, P. A. et al. Comparison of culture, PCR and immunoassays for detecting *Escherichia coli* O157 following enrichment culture and immunomagnetic separation performed on naturally contaminated raw meat products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 68, n. 1, p. 11-20, ago. 2001.

CHAVES, J. et al. SHV-1  $\beta$ -Lactamase Is Mainly a Chromosomally Encoded Species-Specific Enzyme in *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrob. Agents Chemother**, v.45, n.10, p.2856–2861, Oct 2001.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing- Twenty Second Information Supplement. M100-S22. **Clinical Laboratory and Standard Institute**, v.32, n.3, Jan 2012.

DALHOFF, A.; SCHUBERT, S.; VENTE, A. Pharmacodynamics of fleroxacin, ciprofloxacin, and levofloxacin in serum and urine against TEM-and SHV-type extended-spectrum-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae isolates from patients with urinary tract infections. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 61, n. 5, p. e02446-16, 2017.

DAS NEVES JUNIOR, M. A. et al. Infecções em cateteres venosos centrais de longa permanência: revisão da literatura. **Jornal vascular brasileiro**, v. 9, n. 1, p. 46-50, 2010.

DAVIES, J.; DAVIES, D. Origins and evolution of antibiotic resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 74, n. 3, p. 417-433, 2010

DE QUEIROZ, G. M. et al. Multirresistência microbiana e opções terapêuticas disponíveis. **Rev Bras Clin Med. São Paulo**, v. 10, n. 2, p. 132-8, 2012.

DEVI, D. Anusuya; RAMACHANDER, Rajesh. Detection of Extended-spectrum beta-lactamases in AMPC Co-producing Bacteria by Disc Diffusion Method in Clinical Isolates of Enterobacteriaceae. **Indian Journal of Public Health Research & Development**, v. 7, n. 2, p. 236-242, 2016.

DE ROSA, F.G. et al. The effect of inappropriate therapy on bacteremia by ESBL-producing bacteria. **Infection**, v. 39, p. 555–561, 2011.

DHILLON, R. H.P.; CLARK, J. ESBLs: a clear and present danger? **Critical care research and practice**, v. 2012, 2011.

DIALLO, A.A. et al. Persistence and prevalence of pathogenic and extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in municipal wastewater treatment plant receiving slaughterhouse wastewater. **Water research**, v. 47, p. 4719-4729, Sep. 2013.

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

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

ESSACK, S. Y. The development of  $\beta$ -lactam antibiotics in response to the evolution of  $\beta$ -lactamases. **Pharmaceutical research**, v. 18, n. 10, p. 1391-1399, 2001.

FALGENHAUER, L. et al. Colistin resistance gene *mcr-1* in extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing and carbapenemase-producing Gram-negative bacteria in Germany. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 3, p. 282-283, 2016.

FARIÑAS, M. C.; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L. Multiresistant Gram-negative bacterial infections: Enterobacteria, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* and other non-fermenting Gram-negative bacilli. **Enfermedades infecciosas y microbiología clínica**, v. 31, n. 6, p. 402-409, 2012.

FEGLO, P. et al, Emergence of a Novel Extended-Spectrum--Lactamase (ESBL)-Producing, Fluoroquinolone-Resistant Clone of Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* in Kumasi, Ghana. **Journal of clinical microbiology**, v. 51, n, 2, p- 728-730, 2013.

FERREIRA, C. M. et al. Extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria isolated from hematologic patients in Manaus, State of Amazonas, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 1076-1084, 2011.

FICA, A. et al. Colistín en infecciones nosocomiales por bacilos Gram negativos pan-resistentes. **Revista chilena de infectología**, v. 24, n. 5, p. 360-367, 2007.

FOURNIER, D. et al. Alternatives to carbapenems in ESBL-producing *Escherichia coli* infections. **Médecine et maladies infectieuses**, v. 43, p 62–66, 2013.

GOULENOK, T. et al. Risk factors for developing ESBL *E. coli*: can clinicians predict infection in patients with prior colonization? **Journal of Hospital Infection**, v. 84, p.294-299, 2013.

GUDIOL, C. et al. Bacteraemia due to extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* (ESBL-EC) in cancer patients: clinical features, risk factors, molecular epidemiology and outcome. **Journal of Antimicrob Chemother**, v.65, p.333– 341, 2010.

GUSATTI C. et al. Resistência a  $\beta$ -lactâmicos em *Acinetobacter* spp isolados de efluente hospitalar no sul do Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v.42, n.2 Mar./Apr. 2009.

HARRIS, A.D. et al. Risk Factors for Colonization with Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing Bacteria and Intensive Care Unit Admission. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, n.8, p.1144-1149, August 2007.

HELLINGER, W. C.; BREWER, N. S. Carbapenems and monobactams: imipenem, meropenem, and aztreonam. In: **Mayo Clinic Proceedings**. Elsevier, 1999. p. 420-434.

HALLER, S. et al. What caused the outbreak of ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal intensive care unit, Germany 2009 to 2012? Reconstructing transmission with epidemiological analysis and whole-genome sequencing. **BMJ open**, v. 5, n. 5, p. e007397, 2015.

JEON, J. H. et al. Structural basis for carbapenem-hydrolyzing mechanisms of carbapenemases conferring antibiotic resistance. **International journal of molecular sciences**, v. 16, n. 5, p. 9654-9692, 2015.

JUNIOR, M.A.D.S et al. Beta-lactamases de Espectro Ampliado (ESBL):Um Importante Mecanismo de Resistência Bacteriana e sua Detecção no Laboratório Clínico. **NewsLab** – v. 63, p.152-174, 2004.

JUSTIN, E. et al. Efficient Direct Extended-Spectrum-Lactamase Detection by Multiplex Real-Time PCR: Accurate Assignment of Phenotype by Use of a Limited Set of Genetic Markers. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n.8, p-3074-3077, Aug. 2011.

KANAFANI, Zeina A. et al. Sites of colonization in hospitalized patients with infections caused by extended-spectrum beta-lactamase organisms: a prospective cohort study. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, v. 6, n. 1, p. 46, 2017

KOCSIS, B.; SZABÓ, D. Antibiotic resistance mechanisms in Enterobacteriaceae. **Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education**, v. 1, 2013.

KORZENIEWSKA, E.; HARNISZ, M. Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-positive Enterobacteriaceae in municipal sewage and their emission to the environment. **Journal of environmental management**, v. 128, p. 904-911, 2013.

KUMABE, A.; KENZAKA, T. String test of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. **QJM: An International Journal of Medicine**, v. 107, n. 12, p. 1053-1053, 2014.

KWON, T. et al. Comparative genomic analysis of *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* KP617 and PittNDM01, NUHL24835, and ATCC BAA-2146 reveals unique evolutionary history of this strain. **Gut pathogens**, v. 8, n. 1, p. 34, 2016.

LAGO, A. et al. Enterobactérias produtoras de ESBL em Passo Fundo, Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 43, n. 4, p. 430-434, 2010.

LAUDANO, J.B. Ceftaroline fosamil: a new broad-spectrum cephalosporin. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 66, n. suppl 3, p. iii11-iii18, 2011.

LEE, C.R. et al. Antimicrobial Resistance of Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, Hypervirulence-Associated Determinants, and Resistance Mechanisms. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 7, p. 483, 2017.

LEISTNER, R. et al. Risk Factors Associated with the Community-Acquired Colonization of Extended-Spectrum Beta-Lactamase (ESBL) Positive *Escherichia Coli*. An Exploratory Case Control Study. **PLOS ONE**, v. 8, n. 9, sept 2013.

\_\_\_\_\_, R et al. Mortality and molecular epidemiology associated with extended-spectrum beta-lactamase production in *Escherichia coli* from bloodstream infection. **Infection and drug resistance**, v. 7, p. 57, 2014.

LIAKOPOULOS, A.; MEVIUS, D.; CECCARELLI, D. A review of SHV extended-spectrum beta-lactamases: neglected yet ubiquitous. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 1374, 2016.

LIMA, M. R. S. et al. Intervenção em surto de *Klebsiella pneumoniae* produtora de beta-lactamase de espectro expandido (ESBL) em unidade de terapia intensiva neonatal em Teresina, Piauí, 2010-2011. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 23, n. 1, p. 177-182, 2014.

LIVERMORE, D.M. et, al. Are susceptibility tests enough, or should laboratories still seek ESBLs and carbapenemases directly? **Antimicrob. Agents Chemother.** Advanced Acess. March 2012.

MARQUES, P. B. et al. **Caracterização molecular de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de  $\beta$ -lactamases de espectro ampliado e Carbapenemase tipo KPC isoladas de pacientes hospitalizados em Belém, estado do Pará.** Tese de Doutorado. Universidade Federal do Pará, 2016.

MEYER, G., PICOLI, S.U, Fenótipos de beta-lactamases em *Klebsiella pneumoniae* de hospital de emergência de Porto Alegre. **J Bras Patol Med Lab**, v. 47, n. 1, p. 25-31, feb 2011.

MOHAMMED, H. et al. Spread of TEM, VIM, SHV, and CTX-M  $\beta$ -Lactamases in Imipenem-Resistant Gram-Negative Bacilli Isolated from Egyptian Hospitals. **International journal of microbiology**, v. 2016, 2016.

MOHANTY, S. et al. Use of the cefepime-clavulanate ESBL Etest for detection of extended-spectrum beta-lactamases in AmpC co-producing bacteria. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 4, n. 01, p. 024-029, 2009.

MUNIER, G. K. et al. Positive extended-spectrum-beta-lactamase (ESBL) screening results may be due to AmpC beta-lactamases more often than to ESBLs. **Journal of clinical microbiology**, v. 48, n. 2, p. 673-674, 2010.

NG, T. M. et al. Empiric Piperacillin-Tazobactam versus Carbapenems in the Treatment of Bacteraemia Due to Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae. **PloS one**, v. 11, n. 4, p. e0153696, 2016.

NOGUEIRA, K. da S. et al. Distribution of extended-spectrum beta-lactamase types in a Brazilian tertiary hospital. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 2, p. 162-169, 2015.

NORDBERG, V. et al, High Proportion of Intestinal Colonization with Successful Epidemic Clones of ESBL-Producing Enterobacteriaceae in a Neonatal Intensive Care Unit in Ecuador. **PLOS ONE**, v. 8, n. 10, Oct 2013.

NORMAN, A.; HANSEN, L. H.; SØRENSEN, S. J. Conjugative plasmids: vessels of the communal gene pool. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 364, n. 1527, p. 2275-2289, 2009

OCHMAN, H.; LAWRENCE, J. G.; GROISMAN, E. A. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. **Nature**, v. 405, n. 6784, p. 299-304, 2000.

OGBOLU, D. O. et al. CTX-M-15 is established in most multidrug-resistant uropathogenic Enterobacteriaceae and Pseudomonaceae from hospitals in Nigeria. **European Journal of Microbiology and Immunology**, v. 8, n. 1, p. 20-24, 2018.

OLIVEIRA, M. G. M. et al. Accurate identification of fastidious Gram-negative rods: integration of both conventional phenotypic methods and 16S rRNA gene analysis. **BMC microbiology**, v. 13, n. 1, p. 162, 2013.

OVERDEVEST, I. Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase Genes of *Escherichia coli* in Chicken Meat and Humans, the Netherlands. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n.7, p.1216-1222, July 2011.

PAPP-WALLACE, K. M. et al. Carbapenems: past, present, and future. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 55, n. 11, p. 4943-4960, 2011.

PARVEEN, R. M. et al. Extended-spectrum beta-lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* from blood cultures in Puducherry, India. **The Indian journal of medical research**, v. 134, n. 3, p. 392, 2011

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

PARTRIDGE, S. R. Resistance mechanisms in Enterobacteriaceae. **Pathology-Journal of the RCPA**, v. 47, n. 3, p. 276-284, 2015.

PATTARACHAI et al. Molecular Characterization and Epidemiology of Extended-Spectrum-Lactamase-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Isolates Causing Health Care-Associated Infection in Thailand, Where the CTX-M Family Is Endemic. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 5, n.8, p-2818-2824, 2008.

PEREIRA, S. C. L.; VANETTI, M. C. D. Potential virulence of *Klebsiella sp.* isolates from enteral diets. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 48, n. 9, p. 782-789, 2015.

PEREZ, Federico; BONOMO, Robert A. Can We Really Use  $\beta$ -Lactam/ $\beta$ -Lactam Inhibitor Combinations for the Treatment of Infections Caused by Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing Bacteria?. **Clinical Infectious Diseases**, v. 54, n. 2, p. 175-177, 2012.

PITOUT, Johann DD; LAUPLAND, Kevin B. Extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. **The Lancet infectious diseases**, v. 8, n. 3, p. 159-166, 2008.

PRADO, T. et al. Detection of extended-spectrum b-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in effluents and sludge of a hospital sewage treatment plant. **Letters in Applied Microbiology**, v 46, p 136-141, 2008.

RAO, Ratna et al. Colistin, polymyxin B and tigecycline susceptibility to metallo beta-lactamase producing *Acinetobacter baumannii* isolated from tertiary health care hospital. **American Journal of Microbiological Research**, v. 2, n. 2, p. 60-62, 2014.

RORAIMA. **Plano de Gerenciamento de Resíduos de Serviços de Saúde – PGRSS**. Secretaria de Estado da Saúde. Hospital Geral de Roraima, 48p, Roraima, 2013.

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

RIVA, K.B. Disco-Aproximação e E-test na Pesquisa de Enterobactérias Produtoras de beta-lactamase de Espectro Estendido (ESBL)\*. **RBAC**, v. 40, n. 4, p. 305-308, 2008.

RORIZ-FILHO, J. S. et al. Infecção do trato urinário. **Medicina (Ribeirao Preto. Online)**, v. 43, n. 2, p. 118-125, 2010.

SAKELLARIOU, C. et al. Sepsis caused by extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-positive *K. pneumoniae* and *E. coli*: comparison of severity of sepsis, delay of anti-infective therapy and ESBL genotype. **PloS one**, v. 11, n. 7, p. e0158039, 2016.

SALVATORE, D. J.; RESMAN-TARGOFF, B. H. Treatment Options for Urinary Tract Infections Caused by Extended-Spectrum B-Lactamase-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. **J. Academic Hospital Medicine**, v. 7, n. 1, 2015.

SANGER, F. et al. Nucleotide sequence of bacteriophage X174 DNA. **Nature**, v. 265, p. 687-695, fev. 1977.

SANTOS, L. L. dos. **Caracterização de bactérias gram-negativas multirresistentes produtoras de beta-lactamase-de-espectro-estendido (ESBL) em cavalos saudáveis e doentes**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 2016.

SCARPATE, E.C.B.; COSSATIS, J.J. A Presença da *klebsiella pneumoniae* produtora de  $\beta$ -lactamase de espectro estendido no ambiente hospitalar. **Saúde & Amb. Rev.**, Duque de Caxias, v.4, n.1, p.1-11, jan-jun 2009.

SCHEITHAUER, S. et al, Compliance with hand hygiene in patients with meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* and extended-spectrum b-lactamase-producing enterobacteria. **Journal of Hospital Infection**, v. 76, p. 320-323, 2010.

SFAIR, S. et al. Fatores de risco associados à infecção do trato urinário nosocomial por beta-lactamases de espectro estendido. **Journal of Infection Control**, v. 3, n. 2, 2014.

SHAHRAKI-ZAHEDANI, S. et al. First report of TEM-104-, SHV-99-, SHV-108-, and SHV-110-producing *Klebsiella pneumoniae* from Iran. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49, n. 4, p. 441-445, 2016.

SHAIKH, S. et al. Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment. **Saudi journal of biological sciences**, v. 22, n. 1, p. 90-101, 2015.

SILHAVY, T. J.; KAHNE, D.; WALKER, S. The bacterial cell envelope. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 2, n. 5, p. a000414, 2010.

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

SILVA, K.C.; LINCOPAN, N., Epidemiologia das beta-lactamases de espectro estendido no Brasil: impacto clínico e implicações para o agronegócio. **J Bras Patol Med Lab**, v. 48, n. 2, p. 91-99, abril 2012.

SILVA, R. C. G.; SILVA, A. C. O.; OLIVEIRA, S. R. Microbial resistance and frequency of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) in isolated from blood cultures. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 50, n. 6, p. 421-427, Rio de Janeiro, dez. 2014.

SILVER, L. L. Challenges of antibacterial discovery. **Clinical microbiology reviews**, v. 24, n. 1, p. 71-109, 2011.

TACÃO, M. et al. Co-resistance to different classes of antibiotics among ESBL-producers from aquatic systems, **Water Research**, v. 48, p.100-107, 2014.

TAMMA, P. D. et al. Carbapenem therapy is associated with improved survival compared with piperacillin-tazobactam for patients with extended-spectrum  $\beta$ -lactamase bacteremia. **Clinical Infectious Diseases**, v. 60, n. 9, p. 1319-1325, 2015.

TEYSSIER, C. et al. *Ochrobactrum pseudintermedium* sp. nov., a novel member of the family Brucellaceae, isolated from human clinical samples. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 57, n. 5, p. 1007-1013, 2007.

THENMOZHI, S. et al. Antibiotic resistance mechanism of ESBL producing Enterobacteriaceae in clinical field: A review. **Int J Pure Appl Biosci**, v. 2, p. 207-226, 2014.

THOMSON, K. S.; MOLAND, E. S. Cefepime, piperacillin-tazobactam, and the inoculum effect in tests with extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 45, n. 12, p. 3548-3554, 2001.

TOKAJIAN, S. et al. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in wastewaters and refugee camp in Lebanon. **Future microbiology**, v. 13, n. 1, p. 81-95, 2018.

VAIDYA, V. K. et al. Horizontal transfer of antimicrobial resistance by extended-spectrum  $\beta$  lactamase-producing enterobacteriaceae. **Journal of laboratory physicians**, v. 3, n. 1, p. 37, 2011

VASAIKAR, S. et al. Molecular Characteristics and Antibiotic Resistance Profiles of *Klebsiella* Isolates in Mthatha, Eastern Cape Province, South Africa. **International journal of microbiology**, v. 2017, 2017.

VECCHIA, A.D. et al. Diagnóstico sobre a situação do tratamento do esgoto hospitalar no Brasil. **Revista Saúde e Ambiente / Health and Environment Journal**, v. 10, n. 2, dez. 2009.

VOLLMER, W.; BLANOT, D.; DE PEDRO, Miguel A. Peptidoglycan structure and architecture. **FEMS microbiology reviews**, v. 32, n. 2, p. 149-167, 2008.

WANI, K. A. et al. Extended Spectrum-Lactamase Mediated Resistance in *Escherichia Coli* in a Tertiary Care. **International journal of health sciences**, v. 3, n. 2, 2010.

WU, T. et al. Outer membrane protein change combined with co-existing TEM-1 and SHV-1 beta-lactamases lead to false identification of ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 47, n. 6, p. 755-761, 2001.

YI, T.; KIM, T. G.; CHO, K.S. Fate and behavior of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing genes in municipal sewage treatment plants. **Journal of Environmental Science and Health, Part A**, v. 50, n. 11, p. 1160-1168, 2015.

ZAHAR, J.R., et al, Is hand-rub consumption correlated with hand hygiene and rate of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae (ESBL-PE)-acquired infections? **Journal of Hospital Infection**, v. 80, p.348- 350, Feb 2012.

ZARFEL G. et al, Comparison of extended-spectrum-beta-lactamase (ESBL) carrying *Escherichia coli* from sewage sludge and human urinary tract infection. **Environmental Pollution**, v. 137, p; 192-199, Feb 2013.

ZEIL, C. et al. Network analysis of sequence-function relationships and exploration of sequence space of TEM beta-lactamases. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 60, n. 5, p. 2709-2717, 2016.

ZORGANI, A. et al. Detection of CTX-M-15 among uropathogenic *Escherichia coli* isolated from five major hospitals in Tripoli, Libya. **Oman medical journal**, v. 32, n. 4, p. 322, 2017

## ANEXO 1: Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DA EMENDA

**Título da Pesquisa:** BIODIVERSIDADE DE CEPAS PRODUTORAS DE BETALACTAMASE DE ESPECTRO ESTENDIDO EM CEPAS CLÍNICAS E EFLUENTES HOSPITALARES

**Pesquisador:** MARCIA BRAZAO E SILVA BRANDAO

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 39610614.8.0000.5302

**Instituição Proponente:** Universidade Federal de Roraima - UFRR

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.476.541

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

BOA VISTA, 04 de Abril de 2016

---

**Assinado por:**  
**Ivete Souza da Silva**  
 (Coordenador)

**Endereço:** Av. Cap. Ene Garcez, nº 2413, UFRR, Campus Paricarana, Bloco PRPPG/UFRR, Sala CEPI/UFRR.  
**Bairro:** Aeroporto **CEP:** 69.304-000  
**UF:** RR **Município:** BOA VISTA  
**Telefone:** (95)3621-3112 **Fax:** (95)3621-3112 **E-mail:** coep@ufr.br

**APÊNDICE A: Patente: Coletor de efluentes em profundidade**

12/06/2018

INPI

BRASIL	Acesso à informação	Participe	Serviços	Legislação	Canais
--------	---------------------	-----------	----------	------------	--------

Instituto Nacional da  
Propriedade Industrial  
Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio  
Exterior

**Consulta à Base de Dados do INPI**

[ Início | Ajuda? ]

» Consultar por: [Base Patentes](#) | [Finalizar Sessão](#) 1/1

---

**Depósito de pedido nacional de Patente**

(21) Nº do Pedido: BR 20 2018 009448 9  
(22) Data do Depósito: 10/05/2018  
(43) Data da Publicação: -  
(47) Data da Concessão: -

(71) Nome do Depositante: RORAIMA (BR/RR)INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE RORAIMA (BR/RR) / UNIVERSIDADE FEDERAL DE

**Anuidades** ?

---

**Petições** ?

Serviço	Pgo	Protocolo	Data	Imagens	Cliente	Delivery	Data
---------	-----	-----------	------	---------	---------	----------	------

**Serviços**

200	✓	870180038559	10/05/2018	- - -	INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE RORAIMA		-
-----	---	--------------	------------	-------	--	--	---

**Anuidade**

**Outros**

**Publicações** ?

RPI	Data RPI	Despacho	Img	Complemento do Despacho
2472	<b>22/05/2018</b>	2.10	--	Número de Protocolo '870180038559' em 10/05/2018 00:44 (WB)

Dados atualizados até **12/06/2018** - Nº da Revista: **2475**  
**Documentos Publicados**



Rua Mayrink Veiga, 9 - Centro - RJ - CEP: 20090-910 | Rua São Bento, 1 - Centro - RJ - CEP: 20090-010

<https://gru.inpi.gov.br/pePI/servlet/PatenteServletController?Action=detail&CodPedido=1475673&SearchParameter=BR2020180094489%20%20...> 1/1

**APÊNDICE B: Artigo científico publicado**

## Isolation of extended-spectrum beta-lactamases producing strains on effluent of state hospital from Boa Vista-RR

Marcia Brazão e Silva Brandão<sup>1</sup>, Derlano Bentes Capucho<sup>2</sup>, Edimilla Carneiro da Cunha Aguiar<sup>3</sup>,  
Rafael Nascimento de Assis<sup>4</sup> e Fabiana Granja<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Master, Professor at Federal Institute of Education, Science and Technology of Roraima, Boa Vista, RR, Brazil

<sup>2</sup>Master, Federal University of Roraima, Boa Vista, RR, Brazil. <sup>3</sup>Graduate, Federal University of Roraima, Boa Vista, RR, Brazil

<sup>4</sup>Graduate, Federal University, Boa Vista, RR, Brazil

<sup>5</sup>Doctor, Professor at Federal University of Roraima, Boa Vista, RR, Brazil

*marcia.brazao@ifrr.edu.br; dcapucho@hotmail.com; edimilla\_tour@hotmail.com; rafael2013assis@gmail.com; fabi.granja@yahoo.com.br*

### Resumo

As bactérias produtoras de betalactamase de espectro estendido (ESBL) estão amplamente disseminadas nos ambientes hospitalares. Os dejetos clínicos de efluentes hospitalares apresentam elevadas concentrações de bactérias com perfis de resistência a antimicrobianos e seu descarte incorreto representa risco ambiental na medida em que possibilita a disseminação. Esta pesquisa abrange a caracterização da presença de bactérias multirresistentes à antimicrobianos em cepas isoladas em efluentes hospitalares, cujos riscos associados, incluem a disseminação de microrganismos patogênicos no ambiente. Para a resolução desta pesquisa, os objetivos propostos foram: caracterização das cepas do efluente hospitalar gerado pelo Hospital Geral de Roraima (HGR) e pesquisa de genes de resistência responsáveis pela codificação de ESBL e hidrólise aos antimicrobianos da classe das cefalosporinas, penicilinas e monobactams. Foram coletadas amostras do tanque séptico do hospital no período de junho de 2014 a junho de 2016, submetidos à identificação molecular para a detecção dos genes através da reação em cadeia da polimerase (PCR). Os resultados demonstraram a presença de ESBL em todos os tanques coletados e perfil de multirresistência. Os genes de ESBL foram identificados em frequências isoladas e em combinação. Os resultados indicaram a ampla disseminação dos genes de ESBL no efluente do HGR. **Palavras-chave:** Antimicrobianos; resistência; ESBL; ambiente

### Abstract

The extended spectrum beta-lactamase (ESBL) producing bacteria are widespread in hospital environments. The incorrect disposal of clinical waste in hospital effluents, allows them to present high concentrations of bacteria with antimicrobial resistance profiles that present an environmental risk to the extent that they allow the dissemination. This research covers the characterization of the presence of multi-resistant antimicrobial bacteria in strains isolated from hospital effluents, whose associated risks include the spread of pathogenic microorganisms in the environment. To complete this research, the proposed objectives were: characterization of the hospital effluent strains generated by the General Hospital of Roraima (GHR) and research of the resistance genes responsible for ESBL coding and hydrolysis to the antimicrobials of the class of cephalosporins, penicillins and monobactams. Samples were collected from the hospital septic tank from June 2014 to June 2016, submitted to molecular identification for the detection of genes through the polymerase chain reaction (PCR). The results showed the presence of ESBL in all of the collected tanks and a multi-resistance profile. ESBL genes were identified on isolated frequencies and they were combined. The results indicated the widespread dissemination of the ESBL genes in the GHR effluent. **Keywords:** Antimicrobial; resistance; ESBL; environment

Recebido em: 15.06.17 Aceito em: 11.10.17

## **INTRODUCTION**

Hospital effluents are characterized as possible vehicles for the dissemination of numerous pathogenic microorganisms, as well as large concentrations of antibiotics and drugs excreted through the urinary and fecal tracts of the patients. When they are not treated, these effluents are important contaminants of drinking water sources, both superficial and underground, and multidrug resistant strains of antibiotics can pose risks to public health if they reach the supply system (SILVA et al., 2011; VECCHIA et al. 2009).

It is a well-known fact, however, that, as a rule, these effluents are released directly into the public sewage collection system, without any type of treatment (ABREU et al., 2010).

According to the RDC No. 306, dated December 7, 2004, which addresses the technical regulation for the management of health service waste: "Liquid waste from sewage and wastewater from a health facility must be treated before they are launch in the receiving body or in the sewage collection network, whenever there is no collective sewage treatment system serving the area where the service is located "(ANVISA, 2004).

Several sources indicate that hospital effluents could contain higher concentrations of antibiotic-resistant bacteria compared to effluents from other sources, such as domestic ones. However, there is the need for more consistent results to confirm this hypothesis (REINTHALER et al, 2010). When evaluating the bacterial resistance to the drugs disposed in the effluents, ABREU et al. (2010) report that the elimination of drugs in hospitals occurs in two ways. The first by means of excretions and biological fluids, and the second by discarding the drugs consumed. Drugs that have not been used or are out of the expiration date are eliminated through the facilities' drains.

Beta-lactam antibiotics (penicillins, cephalosporins and monobactams, except carbapenems) are widely used in the treatment of bacterial infections in human medicine in the world, most of which have decreased concentration during wastewater treatment processes, but still detected in environmental samples in lower rates. Several authors, when investigating the presence of antibiotics in effluents discarded in rivers after the sewage treatment plant, detected significantly reduced concentrations of antibiotics (WATKINSON, A. et al., 2007, GULKOWSKA, A. et al., 2008, HENDRICKS, R.; POOL, E.J., 2012). Prolonged sludge retention time and hydraulic retention time during wastewater treatment will facilitate antibiotic removal by adsorption and biodegradation (NNADOZIE, C. F.; KUMARI, S.; BUX, F., 2017). The presence of ESBL-encoding genes in bacteria that colonize effluents remains poorly studied, especially in Brazil. Most of the studies are concentrated in clinical isolates (TACÃO et al, 2014)

Despite the fact that hospital effluents normally comprise less than 2% of the raw sewage effluent for treatment plants, hospitals are the main source of antibiotics in the cephalosporin group in wastewater. Preliminary disinfection of the hospital effluent to entering the sewage treatment system could minimize the spread of antibiotic-resistant bacteria to the environment. These bacteria can be displaced from the sewage to their surroundings or directly into bodies of water, which are receptors of the sewage treatment system of the effluents. This represents a risk to public health, which requires evaluation and future control (KORZENIEWSKA and HARNISZ, 2013, GUSATTI et al, 2009).

Among the several mechanisms of resistance to antibiotics, one of the most important is the production of enzymes that have the property of inactivating antimicrobials (CARMO et al., 2012).

The main one is called extended spectrum betalactamase (ESBLs), which degrade beta-lactam antibiotics. To date, more than 430 ESBLs have been characterized, many of them with descriptions in Brazil (MUNIER et al, 2010; SILVA; LINCOPAN, 2012).

Over the years and with the progressive use of beta-lactam antimicrobials, the genes responsible for assigning this enzymatic characteristic have undergone mutations that have led to the emergence of different "types" of Betalactamases, the most common being those encoded by TEM genes (Temoniera, name of the patient in which was identified for the first time) and SHV (variable Sulfhydryl, chemical characteristic of the gene) that have a broad spectrum of activity, since they induce resistance to important antibiotics of different generations, therefore called Extended Spectrum Betalactamases - ESBLs. Until the early 20th century, most reports of the

presence of extended-spectrum betalactamases were due to the mutation of the TEM and SHV enzymes and were described as cross-infections in hospital patients (LEISTNER et al, 2013).

In the last 15 years, TEM and SHV genes have been replaced predominantly in the enterobacteria by the CTX-M genes and are no longer exclusively medical and have also been found in community infections (LIVERMORE et al., 2012; OVERDEVEST et al, 2011, PATTANI et al., 2008). The CTX-M type are the most prevalent ESBL worldwide, this success is due of the combination of various factors including efficient capture and dispersal of gene by mobile genetic elements (CANTÓN, R.; COQUE, T. M, 2006; D'ANDREA, M. M. et al., 2013).

Currently, other important gens that produce beta-lactamase have been already outlined and described, such as VEB, PER, BEL-1, BES-1, SFO-1, TLA and IBC types. But they don't have a broad distribution such as the previously mentioned types TEM, SHV and CTX (LIVERMORE et al, 2012).

Studies to elucidate the biodiversity and prevalence of ESBL-producing bacteria in hospital effluents in the North of Brazil are scarce. If concentrations of these strains are high, the hospital effluents, municipal sewage, and sewage treatment plants can become reservoirs for the selection of resistant bacteria. The monitoring of this occurrence contributes substantially to delineate the magnitude of the problem and to suggest appropriate containment measures (CARMO et al., 2012; PRADO et al., 2008; SILVA; LINCOPAN, 2012).

The objective of this study is the detection and identification of the resistance genes profile related to the production of ESBLs in the General Hospital of Roraima effluent.

## MATERIALS AND METHODS

### Study Area: General Hospital of Roraima – GHR

The General Hospital of Roraima (Figure 1), which is part of the state public health network, is the only General Hospital reference for the entire State of Roraima, in which the population is approximately of 450,479 habitants, with 65% living in the capital, Boa Vista city. It has 333 beds, divided in five blocks, three intensive care units, a trauma sector and an emergency room unit (first aid service). The operational capacity of the hospital is approximately 13,500 patients per month (RORAIMA, 2013).

The liquid effluents generated by the GHR, according to the Waste Management Plan of this hospital, are discharged into six septic tanks that converge to a big tank and the waste is sent to the sewage treatment plant of the municipality of Boa Vista, where they are treated by the natural stabilization process (RORAIMA, 2013).

Figure 1 – Distribution of the Blocks and Wards in the General Hospital of Roraima



## Collect from the Medical Effluent

The samples were collected in March 2016, during a raining season in Roraima. For the collection of septic tanks, 3 tanks (ICU 3, ICU 1 and 2 and an access tank to the hospital blocks) were chosen. The points sampled correspond to a raw effluent without treatment. The sealing covers that correspond to the wastewater collection tanks of the ICUs were damaged. On the way to the dump tank of the blocks, an open tank was found, where the hospital employees would perform an exhaustion of the tank (Figure 2 A to D).

Figure 2 – Points of effluent collection at the General Hospital of Roraima – GHR A= Collect Point 1 (ICU 1) B= Collect



Point 2 (ICU 2 and 3) Collect Point 3 (All Blocks) D= Effluent passageway requiring depletion.

For the collection, sterilized polypropylene conical tubes were used in a depth of 30cm and take 15ml of the effluent. The collection procedures occurred according to the protocol established by the Brazilian Association of Technical Norms - NBR 9897, which establishes the sampling planning of liquid effluents and receptor bodies.

## Sample processing

The collected samples were diluted in a saline solution with a 1:10 ratio and inoculated on McConkey Agar striation technique (HIMEDIA) and incubated aerobically at 36°C in a bacteriological incubator for 18 to 24 hours. Posterior phenotypic identification with the following means: Triple Sugar Iron Agar, Simmons Citrate, SIM (association of tests of the presence of Indol + Motility test), Lysine Iron Agar, Malonate, Decarboxylation of the amino acids Ornithine and Arginine and Test of the presence of the enzyme Phenylalanine Deaminase. ESBL Sensitivity and Research Test Together with the gender/species identification, the ESBL research was performed, using the plate diffusion technique. A suspension of the bacterium under test was adjusted to the standard of 0.5 on the McFarland scale on the plate surface of Agar Muller Hinton (Oxoid), with a thickness of 4mm. Subsequently, the amoxicillin/clavulanic acid (Oxoid) disc was added to the center of the plaque and, around the surface, the antimicrobial markers were strategically positioned from the central disc at 20 mm from center to center.

The antimicrobials were: aztreonam, cefotaxime, ceftazidime and cefepime. After the incubation of the plate for 18 to 20 hours at 35°C, the presence of a halo distortion (phantom zone) was observed between the disc containing the clavulanic acid and the discs positioned around it.

The presence of this zone positively characterized the strain for ESBL. Amikacin, ampicillin + sulbactam, ampicillin, aztreonam, cephalothin, ceftazidime, ceftriaxone, cefotaxime, cefoxitin, cefepime, chloramphenicol, gentamicin, imipenem, levofloxacin, piperacillin + tazobactam, sulfamethoxazole-trimethoprim, and tetracycline were also available on the plate.

The techniques described for cultivation and biochemical identification were developed according to the protocol of the National Agency of Sanitary Surveillance (BRASIL, 2007). The ESBL screening and confirmation tests followed the methodology proposed by CLSI in document M100-S22 (CLSI, 2012).

### Extraction of the bacterial DNA

The DNA extraction was performed using the thermal shock methodology developed by Chapman et al. (2001). The technique consists in the inoculation of previously isolated Colonies in a McConkey agar in 5 ml of Luria broth (Oxoid) at 35°C for 18/24 hours. After this period the broth was transferred to a sterile 1.5 ml polypropylene tube and centrifuged at 6.000 RPM for 10 minutes, the supernatant discarded and the pellet resuspended in 400 µl of ultrapure water and heated to boiling temperature for 10 minutes. The tubes were immediately frozen at -80 ° C and thawed only for use in the PCR technique.

### Amplification of encoding ESBL genes

For the quality control of the samples, were used strains of the American Type Culture Collections: *Escherichia Coli* ATCC 25922 (Non ESBL) and *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 (positive ESBL).

Amplification of the SHV, CTX-M, AND TEM resistance genes by PCR was performed using the initiators, thermal conditions and reagent concentration described by Ferreira et al. (2011) as shown on table 1. A final reaction volume of 25µl containing MgCl<sub>2</sub> (1.5µM), 1x buffer, dNTP (0.2mM), Taq DNA Polymerase (1U), Initiators (25pmol), 5µl of DNA mold and ultrapure water. All reagents used came from Ludwig Biotec. The technique was performed at the Laboratory of Molecular Biology of the Center for Biodiversity Studies - CBio of the Federal University of Roraima with the Peltier-Based Thermal Cycler.

Table 1 - Oligonucleotide initiators used for the research of resistance genes and their molecular weight and PCR conditions for their amplification.

Gene	Initiators (5'-3')	Amplification Conditions	Size (pb)
CTX-M	F ATGTGCAGYACCAGTAARGT R CTGACAGTTACCAATGCTTA	1 Cycle of 7min. at 94°C 35 cycles of 50sec at 94°C; 40sec at 50°C; 1min at 72°C; 1 Cycle of 5min at 72°C	593
TEM	F ATGAGTATTCAACATTTCCG R CTGACAGTTACCAATGCTTA	1 Cycle of 5min. at 96°C 35 cycles of 1min at 96°C; 1min at 60°C; 1min at 72°C;	867
SHV	F GGTTATGCGTTATATTCGCC R TTAGCGTTGCCAGTGCTC	1 Cycle of 10min at 72°C	867

Source: FERREIRA et al., 2011 F= Foward R= Reverse.

The amplified products were submitted to a agarose gel electrophoresis reaction with a concentration of 1,5% and added 0.7 µl of the Blue Green Loading Dye fluorescent of high sensitivity (LGC biotechnology) and loaded with 2µl of Bromophenol Blue (0.25%), sucrose (10%) and 5µl of each sample submitted to the amplification.

## RESULTS AND DISCUSSION

Through an analysis of the bacteriological profile of the effluent in the three septic tanks collected, it was possible to identify 10 negative Gram strains, of which 40% (4) were *Klebsiella* sp., 40% (4) *Pseudomonas* sp., and *E. coli* and *Citrobacter freundii* presented 10% (1). The detection events per tank are shown in Table 2.

Table 2 - Distribution of the species identified according to the effluent collection point.

Collection Point	Gender/Species
Cp1	<i>Klebsiella oxytoca</i>
	<i>Escherichia coli</i>
	<i>Pseudomonas</i> spp.
Cp2	<i>Pseudomonas</i> spp.
	<i>Klebsiella</i> spp.
	<i>Pseudomonas</i> spp.
Cp3	<i>Citrobacter freundii</i>
	<i>Klebsiella oxytoca</i>
	<i>Klebsiella oxytoca</i>
	<i>Pseudomonas</i> spp.

Cp1= Collection Point 1 Cp2= Collection Point 2 Cp3=Collection Point 3

Regarding the distribution of the isolates per collection point/septic tank, point 1 (ICU 1 and 2) and point 2 presented 30% of the detections and point 3 (correspondent to all hospital blocks) 40% of the strains.

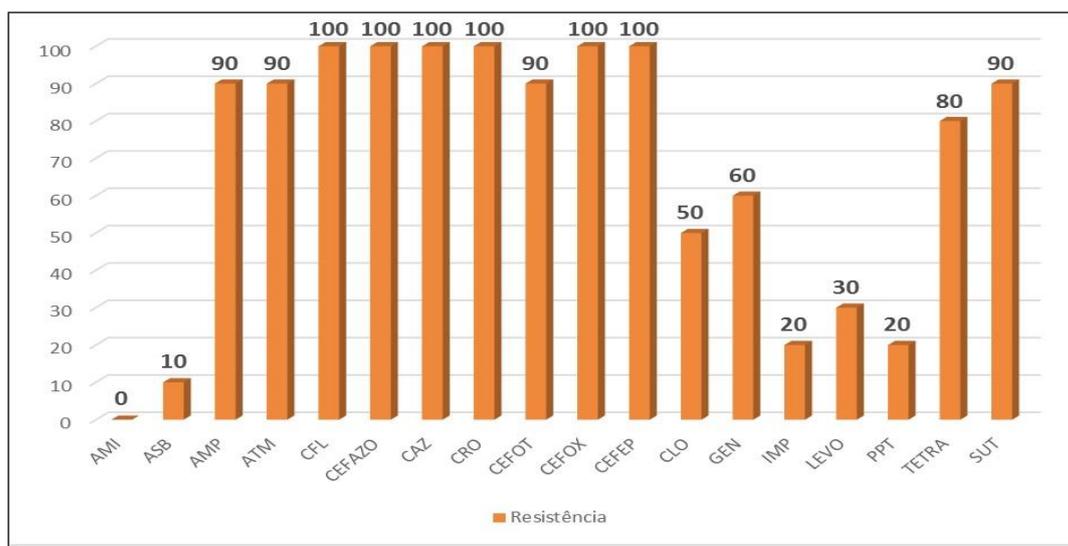
When delineating the profile of positive ESBL strains in effluents from a hospital source, Prado et al. (2008) describe in their study that *K. pneumoniae* strains were detected in all samples analyzed, representing 46.5% of the total isolated strains.

The phenotypic characterization of ESBL confirmed the hydrolysis of cephalosporins from the first to the fourth generation, and the resistance profile analysis presented a 100% resistance measure to all cephalosporins tested, and 90% to ampicillin + sulbactam, ampicillin, sulfatrimethoprim and aztreonam. Graph 1 represents the complete antimicrobial resistance profile.

It is important to observe the 30% resistance frequency ratio to levofloxacin, since the class of quinolones is described as non-beta-lactam antimicrobials, but they are co-resistant in infections caused by ESBLs, a fact evidenced by a study performed by Wani et al. (2010) in the detection of ESBL in a tertiary hospital where strains showed 100% resistance to levofloxacin and moxifloxacin followed by figures of 96,2% and 93,1% to ofloxacin and ciprofloxacin, respectively.

When we performed the classification of antimicrobial resistance through isolated microorganism, it was detected that strains of *Klebsiella* sp. were the ones who presented the highest resistance rate (42%), followed by 30% of *Pseudomonas* sp., 17% in *E. coli* and 11% in *Citrobacter freundii*.

Graph 1- Antimicrobial resistance profile of ESBL positive effluent strains



Legend - AMI: Amikacin ASB: Ampicillin/Sulbactam AMP: Ampicillin ATM: Aztreonam CFL: Cephalexin CEFAZO: Cefazoline CAZ: Ceftazidime CRO: Ceftriaxone CEFOT: Cefotaxime CEFOX: Cefoxitin CEFEP: Cefepime CLO: Chloramphenicol GEN: Gentamicin IMP: Imipenem LEVO: Levofloxacin PPT : Piperacillin / Tazobactam Tetra: Tetracycline SUT: sulfatrimethopim

The three collection points presented high levels of resistance. However, Point 3 presented the highest occurrence with 45%; Point 2 detection was 25% and Point 1 was 30%. The lower percentage found in the second collection point may be due to the renovation that was being carried out in the second ICU of the General Hospital of Roraima, which possibly caused a smaller number of isolated microorganisms.

The sensitivity to non-Beta-lactamic antimicrobials in effluent can be observed in the evaluation study of the resistance to antibiotics in bacteria isolated from hospital effluent in a university hospital of Maringá conducted by Abreu et al. (2009), in which 39 strains were isolated and identified, and among them 18 species showed resistance to antibiotics, with 82.1% being sensitive to ciprofloxacin and 71.8% to amikacin and gentamicin.

The authors of the previously mentioned research suggest in the final considerations the urgency of the implantation of an efficient treatment system of their effluents. Similar observation is found in the work carried out by Cavalcanti et al. (2011), which claims that by microbiologically characterizing the effluent of a hospital in Natal-RN, the treatment has the purpose of improving the life quality of the population and local public health due to the reduction of the launching of multi-resistant strains in the receiving water resources. In a diagnosis regarding hospital sewage treatment in Brazil, Vecchia et al. (2009) found that only three hospitals in Brazil have some type of hospital sewage treatment, with these units located in the South and Southeast regions of Brazil.

#### Molecular detection of TEM, SHV and CTX-M genes

Among the 10 strains isolated from the effluent and identified phenotypically, 8 showed positive amplification for the presence of beta-lactamase genes. Collection point 2 (Pc2) presented the lowest detection frequency (3 phenotypic findings and 1 strain with molecular identification). The amplification of the encoding genes among the ESBL-positive strains by PCR showed that 37.5% (3) had the TEM gene, 12.5% (1) SHV, 12.5% (1) 12.5% simultaneously TEM+SHV (1) 12.5% CTX + TEM and 25% (2) obtained positive detection for the 3 genes simultaneously. The CTX-M gene was found only in association, and among them there was no detection of CTX + SHV (Table 3).

Table 3 – Distribution in the strains of the encoding genes effluent of ESBL. By bacterial gender/species

Collect Points	N° of Identified Strains	Resistance genes found						
		TEM	CTX	SHV	CTX + SHV	TEM + SHV	CTX + TEM	CTX + TEM + SHV
1 ICU 1 and 2	3	1	-	1	-	1	-	-
2 ICU 3	1	-	-	-	-	-	-	1
3 All the Blocks	4	2	-	-	-	-	1	1
TOTAL	8	3	-	1	-	1	1	2

The obtained results in the amplification of the effluent genes were similar to the investigation of strains present in effluent and urinary infections carried out by Zarfel et al. (2013), which identified in four of the *E. coli* isolates positive ESBL (Three of sewage sludge and one of the ICU), three of them harbored the TEM gene, being considered the most prevalent in effluent samples.

When investigating bacterial diversity, antimicrobial resistance patterns and types of beta-lactamase genes in Gram-negative bacteria isolated from hospital effluent in Rio de Janeiro, Chagas et al. (2011) reported that the most common ESBL-producing isolates were strains of *K. pneumoniae*, *E. cloacae* and *E. coli*. TEM, SHV and CTX-M genes were detected in 82, 48 and 67% of bacterial isolates, respectively.

In a quantitative evaluation of the *Escherichia coli* that produces  $\beta$ -lactamase of extended-spectrum in wastewater from a French university hospital compared to strains found in patients hospitalized in the same hospital unit, Drieux et al. (2016), through the genotyping process, by relating the subtypes of the CTX gene, the most prevalent in the research, found that the presence of ESBL-producing bacteria in patients can lead to a diffusion of this enzyme through the hospital effluent and ends up concluding that the health services play an important role in the dissemination of ESBL-producing strains by not treating their waste.

## CONCLUSIONS

This study concluded that all septic tanks collected were positive for ESBL detection, and these detected bacteria were found to be resistant to almost all drugs tested, including the latest generation of drugs. The genes encoding the ESBL were found isolated and in association at all points analyzed

with strains detected that presented similar profile to those identified in patients from hospital environments, suggesting their migration to the effluents, so the results indicated the wide dissemination of the genes of ESBL in the GHR effluent.

## REFERENCES

- ABREU, E.T. et al., Avaliação da resistência a antibióticos de bactérias isoladas de efluente hospitalar. *Acta Scientiarum. Technology*, v. 32, n. 1, p. 1-5, 2010.
- ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC nº. 306/2004. Dispõe sobre o regulamento técnico para o gerenciamento de resíduos de serviço de saúde. *Diário Oficial da União* 10/12/2004.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 9898: Preservação e técnicas de amostragem de efluentes líquidos e corpos receptores. Rio de Janeiro, 1987.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Gerência de Investigação e Prevenção das Infecções e dos Eventos Adversos (Gipea) e Gerência Geral de Tecnologia em Serviços de Saúde (GGTES). *Investigação e Controle de bactérias Multirresistentes*. Brasília: ANVISA, 2007. 21 p. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/reniss/manual%20controle\\_bacterias.pdf](http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/reniss/manual%20controle_bacterias.pdf)>. Acesso em: 15 maio 2015.
- CANTÓN, R.; COQUE, T. M. The CTX-M  $\beta$ -lactamase pandemic. *Current opinion in microbiology*, v. 9, n. 5, p. 466-475, 2006.
- CARMO, S.D et al, Detecção de Betalactamases de espectro estendido (ESBL) em isolados de *Escherichia coli* uropatogênicas (UPECS) oriundos de pacientes da comunidade. *Revista de Patologia Tropical*, v.41, n.4, p.419-426, out.-dez. 2012.
- CAVALCANTI, D. G. K. et al. Caracterização físico-química e microbiológica de efluente hospitalar na Região Metropolitana do Natal-RN-Brasil. *Revista de Biologia e Ciências da Terra*, v. 11, n. 1, p. 205-210, 2011.
- CHAGAS T.P.G. et al, Multiresistance, beta-lactamase-encoding genes and bacterial diversity in hospital wastewater in Rio de Janeiro, Brazil. *J. Appl. Microbiol.*, v. 111 p. 572–581, 2011.
- CHAPMAN, P. A. et al. Comparison of culture, PCR and immunoassays for detecting *Escherichia coli* O157 following enrichment culture and immunomagnetic separation performed on naturally contaminated raw meat products. *International Journal of Food Microbiology*, v. 68, n. 1, p. 11-20, ago. 2001.
- CHATTERJEE, J.; RAI, N.; K SAR, S. A Study on the Wastewater Treatment from Antibiotic Production. *Current World Environment*, v. 9, n. 1, p. 223-226, 2014.
- CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing- Twenty Second Information Supplement. M100-S22. Clinical Laboratory and Standard Institute, v.32, n.3, Jan 2012.
- D'ANDREA, M. M. et al. CTX-M-type  $\beta$ -lactamases: a successful story of antibiotic resistance. *International Journal of Medical Microbiology*, v. 303, n. 6, p. 305-317, 2013.
- DRIEUX, L. et al. Quantitative evaluation of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* strains in the wastewater of a French teaching hospital and relation to patient strain. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, v. 5, n. 1, p. 1, 2016.
- FERREIRA, C.M. et al. Extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria isolated from hematologic patients in Manaus, State of Amazonas, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 42, n. 3, p. 1076-1084, 2011.

GULKOWSKA, A. et al. Removal of antibiotics from wastewater by sewage treatment facilities in Hong Kong and Shenzhen, China. *Water research*, v. 42, n. 1, p. 395-403, 2008.

GUSATTI C., et al, Resistência a  $\beta$ -lactâmicos em *Acinetobacter* spp isolados de efluente hospitalar no sul do Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* v.42, n.2 Mar./Apr. 2009.

HENDRICKS, R.; POOL, E.J. The effectiveness of sewage treatment processes to remove faecal pathogens and antibiotic residues. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, v. 47, n. 2, p. 289-297, 2012.

KORZENIWESKA E., HARNISZ. Beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in hospital effluents.. *Journal of environmental management*, v. 123, p 1–7, july 2013.

LEISTNER, R. et al, Risk Factors Associated with the Community-Acquired Colonization of Extended-Spectrum Beta-Lactamase (ESBL) Positive *Escherichia Coli*. An Exploratory Case Control Study. *PLOS ONE*, v, 8, n. 9, sept 2013.

LIVERMORE, D.M. et, al. Are susceptibility tests enough, or should laboratories still seek ESBLs and carbapenemases directly? *Antimicrob. Agents Chemother. Advanced Access*. March 2012. .

MUNIER, G.K, Positive Extended-Spectrum--Lactamase (ESBL) Screening Results May Be Due to AmpC-Lactamases More Often than to ESBL. *Journal of Clinical Microbiology*, v.48, n.2, p. 673-674, feb 2010.

NNADOZIE, C. F.; KUMARI, S.; BUX, F. Status of pathogens, antibiotic resistance genes and antibiotic residues in wastewater treatment systems. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, v. 16, n. 3, p. 491-515, 2017.

OVERDEVEST, I. Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase Genes of *Escherichia coli* in Chicken Meat and Humans, the Netherlands. *Emerging Infectious Diseases*, v. 17, n.7, p.1216-1222, July 2011.

PATTARACHAI et al. Molecular Characterization and Epidemiology of Extended-Spectrum--Lactamase-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumonia* Isolates Causing Health Care-Associated Infection in Thailand, Where the CTX-M Family Is Endemic. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 5, n.8, p-28182824, 2008.

PRADO, T., et al., Detection of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in effluents and sludge of a hospital sewage treatment plant. *Letters in Applied Microbiology*, v 46, p 136-141, 2008.

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

RORAIMA. Plano de Gerenciamento de Resíduos de Serviços de Saúde – PGRSS. Secretaria de Estado da Saúde. Hospital Geral de Roraima, 48p, Roraima, 2013.

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

SILVA, K. C.; LINCOPAN, N. Epidemiologia das betalactamases de espectro estendido no Brasil: impacto clínico e implicações para o agronegócio. *J. bras. patol. med. lab*, v. 48, p. 91-99, 2012. TACÃO, M. et al. Co-resistance to different classes of antibiotics among ESBL-producers from aquatic systems, *Water Research*, v. 48, p-100-107, 2014.

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

WANI, K. A. et al. Extended Spectrum-Lactamase Mediated Resistance in Escherichia Coli in a Tertiary Care. International journal of health sciences, v. 3, n. 2, 2010.

WATKINSON, A. J.; MURBY, E. J.; COSTANZO, S. D. Removal of antibiotics in conventional and advanced wastewater treatment: implications for environmental discharge and wastewater recycling. Water research, v. 41, n. 18, p. 4164-4176, 2007.

ZARFEL G. et al, Comparison of extended-spectrum- $\beta$ -lactamase (ESBL) carrying Escherichia coli from sewage sludge and human urinary tract infection. Environmental Pollution, v. 137