

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA (FAMED)
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E DESENVOLVIMENTO NA
REGIÃO CENTRO-OESTE**

DENISE LEME DI RAIMO GONÇALVES

**CARACTERIZAÇÃO DE ENTEROBACTÉRIAS MULTIDROGA RESISTENTE
ISOLADAS DE EFLUENTE HOSPITALAR E NÃO HOSPITALAR, EM CAMPO
GRANDE – MS**

**CAMPO GRANDE
2023**

DENISE LEME DI RAIMO GONÇALVES

**CARACTERIZAÇÃO DE ENTEROBACTÉRIAS MULTIDROGA RESISTENTE
ISOLADAS DE EFLUENTE HOSPITALAR E NÃO HOSPITALAR, EM CAMPO
GRANDE – MS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste. Linha de pesquisa: Saúde e Sociedade.

Orientadora: Dra. Marilene Rodrigues Chang

**CAMPO GRANDE
2023**

DENISE LEME DI RAIMO GONÇALVES

**CARACTERIZAÇÃO DE ENTEROBACTÉRIAS MULTIDROGA RESISTENTE
ISOLADAS DE EFLUENTE HOSPITALAR E NÃO HOSPITALAR, EM CAMPO
GRANDE – MS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste. Linha de pesquisa: Saúde e Sociedade.

Orientadora: Dra. Marilene Rodrigues Chang

Banca examinadora:

Nota/conceito

Danielle Bogo – UFMS

Luciana Miyagusku - UFMS

Ana Claudia Souza Rodrigues - UNIDERP

AVALIAÇÃO FINAL: () Aprovada

() Reprovada

A Deus.

A minha família por todo apoio e
companheirismo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e minha família que sempre estiveram ao meu lado, me dando todo suporte para que pudesse chegar até aqui.

Meu esposo e minha filha pela paciência nos momentos de ausência. Meu esposo por estar sempre ao lado, inclusive na força braçal necessária a esse trabalho.

Meus pais, irmãos por serem sempre meus exemplos e me ensinarem a valorizar os caminhos do conhecimento. Meus pais e meus sogros pela grande ajuda com minha amada filha Maria Isabel, dedicando seu tempo a ela para que eu pudesse me dedicar aos meus estudos.

A minha orientadora, Dra. Marilene Rodrigues Chang pela brilhante orientação e conhecimento compartilhado. Obrigada Dra. Marilene Rodrigues Chang por ter acreditado em mim, pela paciência e por ter dividido comigo suas experiências.

Aos amigos e colegas do laboratório de Pesquisas Microbiológicas da UFMS, Nayara Moreno Martins, Amanda Borges Colman, Claudia Liz Rodrigues Silva e Camila de Oliveira Gutierrez pela convivência e momentos de descontração. Em especial a mestre Nayara que me ajudou durante esse trabalho, que além de amizade e apoio, me ensinou muito, tornando tudo possível.

Ao colega Wellington Santos Fava, Biólogo e Doutor em Ecologia, pelos ensinamentos e paciência com os testes moleculares no Laboratório da FAMED. À colega Francielli Gelatti Bortoly Carvalho, Farmacêutica, pelos ensinamentos com o teste fenotípico realizado.

Aos meus colegas e amigos de trabalho, Celso França de Lemos e Michele Scardine Corrêa de Lemos, pela compreensão nos meus momentos de ausência, pela paciência, pelos ensinamentos e encorajamento nos momentos de dificuldade.

Agradeço imensamente a colaboração dada a este trabalho pela professora Danielle Bogo, pelo seu zelo, paciência e conhecimentos a mim transmitidos. Aos locais externos que abriram as portas para que as coletas fossem realizadas, obrigada pela compreensão e cooperação com este trabalho.

À Comissão de Controle de Infecção Hospitalar e a equipe de infra-estrutura do hospital por permitirem esta pesquisa em prol do combate a infecções hospitalares.

“Se eu entender a beleza do esperar, não terei pressa em adiantar os planos de Deus.” (São João Paulo II)

RESUMO

O conceito de *One Health* reconhece que a saúde das pessoas está claramente ligada à saúde dos animais e do meio ambiente, e a importância dessa relação na transmissão, persistência e disseminação de bactérias resistentes aos antibióticos. A disseminação de bactérias resistentes aos antibióticos preocupa a comunidade científica devido às limitadas opções terapêuticas e tem como consequências, aumento da morbimortalidade e aumento dos custos. Ainda pouco estudados, os efluentes hospitalares podem ser veículos de disseminação de inúmeros microrganismos patogênicos. Neste estudo foi investigada a presença de enterobactérias produtoras de carbapenemases em efluentes hospitalar e não hospitalar de Campo Grande – MS, de Setembro de 2021 a Fevereiro de 2022. Do hospital, foram coletadas amostras de efluentes da Unidade coronariana; Enfermaria de clínica médica, pediátrica e Unidade de Terapia Intensiva; Pronto Atendimento Médico; Clínica Cirúrgica; Central de Esterilização de Materiais; Enfermaria de ginecologia e obstetrícia e Saída do efluente do hospital. Dos ambientes não hospitalares, foram coletados da Odontologia; Laboratório de Análises Clínicas; córrego Anhanduí; centro da cidade; bairro Moreninha; uma indústria e reitoria da Universidade. Para o isolamento das bactérias, foram semeadas 1 µL das amostras de efluente em meios de cultivos seletivos. Os microrganismos produtores de carbapenemase foram identificados e seu perfil de resistência determinado pelo sistema automatizado VITEK-2. De 145 bactérias Gram-negativas isoladas 32% apresentaram resistência aos antibióticos carbapenêmicos testados. Em 16 enterobactérias com perfil fenotípico de produtor de carbapenemase fez-se a identificação do gene *blaKPC* por PCR. Em 100% das amostras testadas confirmou-se a presença do gene pesquisado, todas provenientes de ambiente hospitalar. As bactérias identificadas foram: *Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae*; *Enterobacter cloacae complex*; *Klebsiella pneumoniae ssp ozaenae*; *Klebsiella oxytoca*; *Citrobacter farmeri* e *Kluyvera intermedia*. Os resultados mostram bactérias classificadas como prioridade crítica/alta pela Lista de Patógenos Prioritários da OMS (*Enterobacteriaceae* resistentes aos carbapenêmicos) em efluentes hospitalares e são inéditos em nosso estado. A identificação de bactérias multidrogas resistentes apresentam grande importância e desempenham um relevante papel no elo de transferência de genes de resistência aos antimicrobianos

entre homem, animais e meio ambiente. Informação fundamental para o estabelecimento de medidas de controle que possam ser adotadas pela instituição hospitalar e serviço de saneamento municipal.

Descritores: efluentes; *Enterobacteriaceae*; Resistência Bacteriana a Antibióticos; Enterobactérias Resistentes a Carbapenêmicos.

ABSTRACT

The One Health concept recognizes that people's health is clearly linked to the health of animals and the environment and the importance of this relationship in the transmission, persistence and dissemination of antibiotic-resistant bacteria. The spread of antibiotic-resistant bacteria worries the scientific community due to limited therapeutic options and has the consequences, increased morbidity and mortality and increased costs. Still little studied, hospital effluents can be vehicles for the dissemination of numerous pathogenic microorganisms. In this study, the presence of Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in hospital and non-hospital effluents in Campo Grande - MS, from September 2021 to February 2022 was investigated. From the hospital, samples of effluents from the Coronary Unit were collected; Medical, pediatric and Intensive Care Unit wards; Emergency Medical Care; Clinical Surgery; Material Sterilization Center; Gynecology and obstetrics ward and Hospital output. From non-hospital environments, they were collected from Dentistry; Clinical Laboratory; Anhanduí stream; city center; Moreninha neighborhood; an industry and university rectory. For the isolation of bacteria, 1 µL of effluent samples were seeded in selective culture media. Carbapenemase-producing microorganisms were identified and their resistance profile determined by the VITEK-2 automated system. Of 145 Gram-negative bacteria isolated, 32% showed resistance to the carbapenem antibiotics tested. In 16 *Enterobacteriaceae* with a carbapenemase producer phenotypic profile, the *blaKPC* gene was identified by PCR. In 100% of the samples tested confirmed the presence of the researched gene, all from the hospital environment. The bacteria identified were: *Klebsiella pneumoniae* ssp *pneumoniae*; *Enterobacter cloacae* complex; *Klebsiella pneumoniae* ssp *ozaenae*; *Klebsiella oxytoca*; *Citrobacter farmeri* and *Kluyvera intermedia*. The results show bacteria classified as critical/high priority by the WHO Priority Pathogen List (carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*) in hospital effluents and are unprecedented in our state. The identification of multidrug-resistant bacteria is of

great importance and plays an important role in the transfer of antimicrobial resistance genes between humans, animals and the environment. Fundamental information for establishing control measures that can be adopted by the hospital institution and municipal sanitation service.

Descriptors: effluents; *Enterobacteriaceae*; Drug Resistance, Bacterial; *Enterobacteriaceae* Resistant to Carbapenems.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Classificação e representantes das enzimas beta-lactamase de espectro estendido.....	24
Tabela 2 -	Pontos de corte clínicos para triagem de <i>Enterobacteriaceae</i> produtoras de carbapenemases (de acordo com a metodologia do BrCAST).....	32
Tabela 3 -	Número de UFC/mL de bactérias Gram-negativas isolados de efluentes em diferentes locais de coleta. Campo Grande- MS, 2021-2022.....	53
Tabela 4 -	Resultados do Teste de Dunn para comparação múltipla após o Teste de Kruskal-Wallis demonstrando diferenças no número de UFC/ml de BGN por unidade de coleta. Campo Grande- MS, 2021-2022.....	55
Tabela 5 -	Distribuição e frequência de Bactérias Gram-negativas com resistência a carbapenêmicos (ágar cromogênico KPC, Probac) de acordo com local de coleta. Campo Grande-MS, 2021-2022....	56
Tabela 6 -	Distribuição e frequência de amostras positivas para o teste de inativação de carbapenêmico modificado (mCIM). Campo Grande-MS, 2021- 2022.....	59
Tabela 7 -	Perfil de resistência antimicrobiana de 16 bacilos Gram-negativos isoladas de efluentes hospitalares de acordo com a detecção de carbapenemase e do gene blaKPC. Campo Grande-MS, 2021-2022.....	62
Tabela 8 -	Perfil de resistência antimicrobiana de 16 bacilos Gram-negativos de acordo com a detecção de carbapenemase e do gene blaKPC. Campo Grande MS, 2021-2022.....	63

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Ilustração dos principais mecanismos de resistência bacteriana em BGN.....	19
Figura 2 -	Linha do tempo representando a introdução de carbapenêmicos e o aparecimento de carbapenemases em todo o mundo.....	22
Figura 3 -	Classificação de carbapenemases/ β -lactamases dependendo do seu domínio catalítico central.....	25
Figura 4 -	Distribuição global de carbapenemase em <i>Enterobacteriaceae</i> , por país e região.....	27
Figura 5 -	Ilustração da interpretação do teste fenotípico mCIM e eCIM.....	34
Figura 6 -	Ilustração da interpretação do teste Carba NP (ensaio bioquímico que detecta a hidrólise de um carbapenem).....	35
Figura 7 -	Ilustração do teste imunocromatográfico NG-Teste Carba 5 (NG Biotech).....	35
Figura 8 -	Ecologia dos antibióticos e resistência a antibióticos.....	37
Figura 9 -	Ilustração dos mecanismos de transferência e aquisição de genes de resistência por bactérias em efluentes.....	39
Figura 10 -	Distribuição de estudos com identificação de bactérias em efluente hospitalar em diferentes estados brasileiros.....	40
Figura 11 -	Desenho esquemático ilustrando os locais de coleta de amostra..	43
Figura 12 -	Foto ilustrando a coleta das amostras.....	44
Figura 13 -	Foto ilustrando placa de Ágar MacConkey com diferentes colônias bactérias Gramnegativas.....	45
Figura 14 -	Interpretação e classificação do ágar cromogênico KPC – Probac.....	45
Figura 15 -	Figura demonstrando interpretação do teste mCIM e eCIM.....	49
Figura 16 -	Foto ilustrando resultado e interpretação da detecção fenotípica de carbapenemase.....	49
Figura 17 -	Esquema ilustrando resumo do processamento das amostras.....	50
Figura 18 -	Identificação fenotípica e frequência relativa dos isolados, segundo local de coleta. Campo Grande-MS, 2021-2022.....	57
Figura 19 -	Suscetibilidade de bactérias Gram-negativas aos antibióticos	58

carbapenêmicos (meropenem e/ou ertapenem) isoladas de efluentes hospitalar e não hospitalar, segundo local de coleta. Campo Grande, 2021- 2022.....

Figura 20 - Foto ilustrando a extração do DNA das bactérias positivas no teste fenotípico..... 60

Figura 21 - Foto ilustrando o resultado da técnica de PCR simples utilizada para detectar o gene de resistência blaKPC. Campo Grande-MS, 2021-2022..... 60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BKC	<i>Brazilian Klebsiella carbapenemase</i>
BGN	Bactéria Gram-negativa
BRA	Bactérias resistentes aos antibióticos
BrCAST	Do inglês <i>Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
CDC	Do inglês <i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CEM	Central de esterilização de materiais
CLSI	Do inglês <i>Clinical Laboratory Standards Institute</i>
CIM	Concentração inibitória mínima
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EAS	Estabelecimentos assistenciais de saúde
ECC	complexo <i>Enterobacter cloacae</i>
ECOFF	cut off epidemiológico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EPC	Enterobactérias produtoras de carbapenemase
ERC	Enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos
ESBL	Do inglês <i>β-lactamases de espectro estendido</i>
EUCAST	Do inglês <i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Carbapenemase
PAN	Pan-resistência
MALDI-TOF	Do inglês <i>Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Light</i>
mCIM	Método de inativação do carbapenêmico
MDR	Multi-drogas resistentes
MH	Müller-Hinton
MRA	Microrganismos resistentes aos antibióticos
MBL	Metallo- β -lactamase
SPICE	<i>Serratia, Pseudomonas</i> , Indol-positivo <i>Proteus, Citrobacter</i> , e <i>Enterobacter</i>
SHV	variável reagente de sulfidríla
NDM	<i>New Delhi</i> Metallo-beta-lactamase

NH₄HCO₃	Bicarbonato de amônio
OMS	Organização Mundial da Saúde
OXA	Oxacilinase
PAM	Pronto Atendimento Médico
PAN	Pan resistência
PCR	Do inglês <i>Reação em Cadeia da Polimerase</i>
pH	Potencial de hidrogênio
RAM	Resistência antimicrobiana
THM	Teste Hodge modificado
TSA	Testes de suscetibilidade antimicrobiana
UCO	Unidade coronariana
UFC	Unidade formadora de colônia
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
EU	União Europeia
XDR	Resistência-extensa

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1	<i>Enterobacterales</i>	18
2.2	Resistência bacteriana – Gram-negativos.....	18
2.3	<i>Enterobacterales</i> resistentes aos carbapenêmicos (ERC).....	21
2.3.1	<u>Classificação das beta-lactamases</u>	23
2.4	Testes de suscetibilidade antimicrobiana e testes para detecção de carbapenemases.....	31
2.5	Disseminação ambiental de bactérias resistentes a antibióticos.....	36
3	OBJETIVOS.....	41
3.1	Objetivo geral.....	41
3.2	Objetivos específicos.....	41
4	METODOLOGIA.....	42
4.1	Tipo, local e período da pesquisa.....	42
4.2	Sítio de coleta de amostras.....	42
4.2.1	<u>Coleta de amostra</u>	42
4.2.2	<u>Isolamento e triagem de bactérias resistente aos carbapenêmicos (Ágar KPC)</u>	44
4.2.3	<u>Teste de suscetibilidade frente aos carbapenêmicos</u>	46
4.2.4	<u>Teste fenotípico para detecção de carbapenemase</u>	47
4.2.5	<u>Teste genotípico para detecção do gene blaKPC</u>	50
4.2.6	<u>Identificação bacteriana e teste de suscetibilidade aos antimicrobianos</u>	51
4.3	Organização e análise dos dados.....	52

4.4	Aspectos éticos	52
5	RESULTADOS	52
6	DISCUSSÃO	64
7	CONCLUSÃO	73
	REFERÊNCIAS	74
	APÊNDICE A – Formulário de dados de coleta de amostras e teste de laboratório.....	105
	APÊNDICE B – Relação de bactérias identificadas e resultados.....	106
	ANEXO 1 – Autorização do Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian - UFMS.....	107
	ANEXO 2 – Autorização para coleta da concessionária responsável pelos serviços de água, coleta e tratamento de efluente de Campo Grande, MS.....	108
	ANEXO 3 - Procedimento para extração de DNA <i>in house</i>	109

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento e disseminação de bactérias resistentes aos antibióticos preocupa a comunidade científica e profissional da saúde devido às limitadas opções terapêutica para o tratamento (QUADRI *et al.*, 2015). Infecções por bactérias multidrogas resistentes (MDR) estão associadas ao aumento no período de internação do paciente e ao aumento na taxa de mortalidade (CHANDY *et al.*, 2014).

Em 2019, infecções com bactérias resistentes aos antibióticos foram responsáveis pela morte de 1,27 milhões de pessoas, com um total de 4,95 milhões de mortes associadas a complicações de infecções causadas por bactérias MDR (MURRAY *et al.*, 2022).

As consequências do desenvolvimento e disseminação contínua de microrganismos resistentes aos antibióticos (MRA) podem ser catastróficas. É necessária uma ação imediata ou até 2050 podem causar até 10 milhões de mortes globalmente por ano, gerando também um impacto econômico significativo (UNEP, 2022).

O ambiente hospitalar com o uso em larga escala de fármaco antibacteriano contribui com a resistência aos antibióticos pelas bactérias. A disseminação de bactérias resistentes pelo sistema de efluentes hospitalares e não hospitalares tem sido pouco estudada (CAHILL *et al.*, 2019; CHAVEZ; CAICEDO; CASTILLO, 2019; CONTE *et al.*, 2022; SANTORO *et al.*, 2015; THAMLIKITKUL *et al.*, 2019).

O resíduo hospitalar que é produzido em grande escala geralmente é diluído em estações de tratamento de águas residuais municipais. No entanto, esse resíduo pode conter até dez vezes mais bactérias resistentes a antibióticos do que águas residuais de fontes comunitárias (HASSOUN-KHEIR *et al.*, 2020). Entre essas citam-se bactérias Gram-negativas produtoras de β -lactamases de espectro estendido (ESBL) e carbapenemases (HASSOUN-KHEIR *et al.*, 2020).

No Hospital do estudo são atendidos muitos pacientes com doenças crônicas e com doenças infecto-parasitárias. É considerado referência no diagnóstico e tratamento de doenças infecciosas para todo o estado de Mato Grosso do Sul. Pesquisas anteriores demonstraram elevado índice de enterobactérias multidrogas resistentes causadoras de infecção hospitalar em hospitais de Campo Grande – MS (CHANG *et al.*, 2013; PATRIAL *et al.*, 2019; RODRIGUES *et al.*, 2019).

Há evidências de que os efluentes hospitalares podem ser veículos de disseminação de inúmeros microrganismos patogênicos e que se não tratados, podem contaminar e apresentarem relevância nos nichos selecionados por desempenharem um importante papel no elo de transferência de genes de resistência aos antimicrobianos entre homem, animais e meio ambiente (CAHILL *et al.*, 2019; KARKMAN *et al.*, 2018).

O conceito de One Health reconhece que a saúde das pessoas está claramente ligada à saúde dos animais e do meio ambiente e incentiva a colaboração multi e interdisciplinar para alcançar uma saúde melhor (COLLIGNON; MCEWEN, 2019).

Apesar da relevância, pouco se sabe sobre a disseminação de enterobactérias MDR em efluente hospitalar e não hospitalar.

Neste estudo investigou-se a dispersão de enterobactérias produtoras de carbapenemases em efluentes hospitalares e não hospitalares em fluxo de águas residuais em Campo Grande – MS para assim agregar conhecimentos, informações mediante a ausência de estudos sobre o tema na região Centro-Oeste do Brasil.

Os resultados encontrados neste estudo podem contribuir com a Comissão com a Comissão de Controle de Infecção Hospitalar e Setor de Infraestrutura Hospitalar gerando informações técnicas e científicas úteis na condução de estratégias e controle de contaminação ambiental por enterobactérias multidroga resistentes, minimizando assim, os riscos de disseminação dessas bactérias. Dessa forma, o hospital poderá instituir medidas de prevenção de dispersão dessas bactérias. Os resultados obtidos poderão contribuir ainda com o avanço do conhecimento, formação de recursos humanos para o aprimoramento da atenção à saúde e vigilância em saúde.

Acredita-se que a identificação de *Enterobacterales* MDR e os seus principais mecanismos de resistência propostos neste estudo poderão melhorar a compreensão das rotas de transmissão de bactérias Gram-negativas multirresistentes para que medidas de controle sejam adotadas pela instituição hospitalar e serviço de saneamento municipal.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Enterobacterales*

Enterobacterales compõem a ordem de bactérias de bacilos Gram-negativos, anaeróbios facultativos, não formadores de esporos. Membros desta ordem, principalmente da família *Enterobacteriaceae*, são amplamente conhecidos como patógenos para humanos e animais. Exemplos são as espécies *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* spp., *Salmonella* entérica e *Yersinia pestis* (ADEOLU *et al.*, 2016).

Essas bactérias fazem parte da microbiota intestinal humana e estão frequentemente associados com infecções adquiridas no ambiente hospitalar, que têm origem nos tratos respiratório, gastrointestinal e urinário, assim como na corrente sanguínea (WEINSTEIN; GAYNES; EDWARDS, 2005). Patógenos Gram-negativos MDR causam um número crescente de infecções, incluindo infecções complicadas do trato urinário, pneumonia nosocomial e sepse (DIEKEMA *et al.*, 2019; GOLAN, 2015; JEAN *et al.*, 2020).

Infecções causadas por patógenos MDR tornam-se cada vez mais frequentes no ambiente hospitalar e a emergência de resistência aos carbapenêmicos (antimicrobianos utilizados para o tratamento de infecções graves) preocupa a comunidade científica mundial. A resistência aos antibióticos é causada por diversos mecanismos, dentre eles citam-se a produção de carbapenemases que conferem resistência aos potentes antibióticos carbapenêmicos (ANDREY *et al.*, 2020; NORDMANN; POIREL, 2014).

2.2 Resistência bacteriana – Gram-negativos

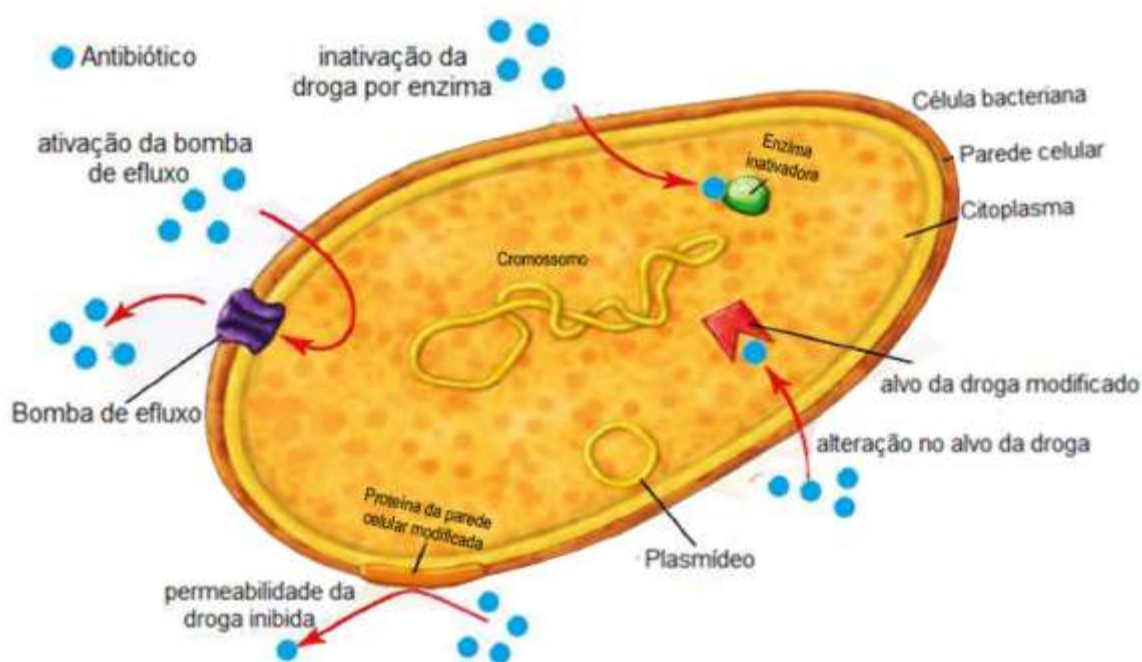
A resistência aos antibióticos pelas bactérias Gram-negativas é um tema preocupante. Estas bactérias podem disseminar seus mecanismos de resistência rapidamente por meio de elementos genéticos móveis como plasmídeos e transposons (QUEENAN; BUSH, 2007), limitando as opções de tratamento e aumentando as probabilidades de falha terapêutica.

A definição do grau de resistência aos antibióticos é definida como: Multirresistentes (MDR) - quando a bactéria é resistente a pelo menos três classes

de antimicrobianos diferentes; Resistência-extensa (XDR) - quando a bactéria é resistente a quase todos os grupos de antibióticos, com exceção a 1 ou 2 classes; e, Pan resistência (PAN) - resistência a todas as classes de antibióticos disponíveis em combate a um determinado microrganismo patogênico (MAGIORAKOS *et al.*, 2012).

Os mecanismos de resistência mais comuns entre as bactérias Gram-negativas são: a expressão de bomba de efluxo, a redução da permeabilidade da membrana, a modificação do sítio de ação e a produção de enzimas inativadoras de antimicrobianos, como as beta-lactamases (BUSH; JACOBY, 2010; EICHENBERGER; THADEN, 2019). A Figura 1 ilustra os quatro principais mecanismos de resistência bacteriana em bactérias Gram-negativas (BGN).

Figura 1 – Ilustração dos principais mecanismos de resistência bacteriana em BGN



Fonte: PORCINO, 2018.

As BGN possuem uma membrana extracelular lipoproteica que, em sua estrutura, apresenta proteínas denominadas porinas. Estas funcionam como canais que conectam os meios extra e intracelular e facilitam o transporte de substâncias para dentro das células. Quando há a diminuição no número de porinas, o transporte das moléculas antimicrobianas para o interior da célula é prejudicado, pois as porinas são responsáveis. Essa característica é responsável pela resistência de

bactérias Gram-negativas frente a algumas classes de antibióticos (NIKAIDO, 1994; SUAY-GARCÍA; PÉREZ-GRACIA, 2019).

A expressão da bomba de efluxo é caracterizada pela capacidade das bactérias de bombear (ou seja, transportar de forma ativa) para o meio extracelular as substâncias antimicrobianas que acabaram de ser absorvidas. Essas bombas são codificadas principalmente no cromossomo, embora também possam ser codificadas por plasmídeo (LI; NIKAIDO, 2009).

Uma vez que moléculas antimicrobianas são extremamente específicas quanto ao alvo de inativação, a alteração do sítio de ação é uma mutação que ocorre no DNA bacteriano. Essa mutação impede a ligação ou diminuição da afinidade da molécula antimicrobiana com a célula bacteriana, levando à resistência. Essa ação não interfere na função do alvo alterado, a bactérias mantem suas funções e escapa da ação dos antibióticos (BRUCHMANN *et al.*, 2013).

O principal mecanismo de resistência dos bacilos Gram-negativos é a produção de β -lactamases, enzimas que se encontram em altas concentrações no espaço periplasmático, entre a parede e a membrana celular dessas bactérias. Essas enzimas são capazes de hidrolisar o anel β -lactâmico presente nos antibióticos β -lactâmicos, inativando-os (BUSH; JACOBY, 2010; DRAWZ; BONOMO, 2010).

Devido ao aumento da quantidade de cepas produtoras β -lactamases de espectro estendido (ESBL), e também ao seu espectro ampliado e sua estabilidade frente aos carbapenêmicos, os carbapenêmicos tornaram-se os antibióticos de escolha no tratamento de infecções graves por *Enterobacterales*. Eles fornecem cobertura anaeróbica e Gram-negativa eficaz em comparação com outros β -lactâmicos (NICOLAU, 2008).

Esta classe de antibióticos foi introduzida e aprovada na década de 1980, tendo como primeiro representante o imipenem para uso clínico (MIYADERA *et al.*, 1983). Posteriormente, foram introduzidos meropenem, ertapenem e doripenem, e até o final da década de 1990 havia uma baixa frequência de resistência aos carbapenêmicos (YIGIT *et al.*, 2001). No entanto, a utilização indiscriminada nas últimas décadas, somadas com a habilidade de alguns microrganismos em transferir elementos genéticos móveis que conferem resistência, impulsionou a emergência de bactérias resistentes a esta classe (DESHPANDE *et al.*, 2007).

Um dos mecanismos de resistência mais frequentemente observados em bactérias hospitalares é a produção de enzimas inativadoras de antibióticos, como por exemplo, as betalactamases, oxacilinases e carbapenemases. A produção de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) é o mecanismo de resistência mais frequente (96,2%) em *K. pneumoniae* resistente a carbapenem (POIREL *et al.*, 2004; SAMPAIO; GALES, 2016).

2.3 Enterobacterales resistentes aos carbapenêmicos (ERC)

As enterobactérias produtoras de carbapenemase (EPC) foram identificadas como uma das principais ameaças à saúde humana. Essas bactérias fazem parte da lista de patógenos prioritários da Organização Mundial da Saúde (OMS), considerados de importância crítica e para os quais novos antibióticos são necessários (OMS, 2017).

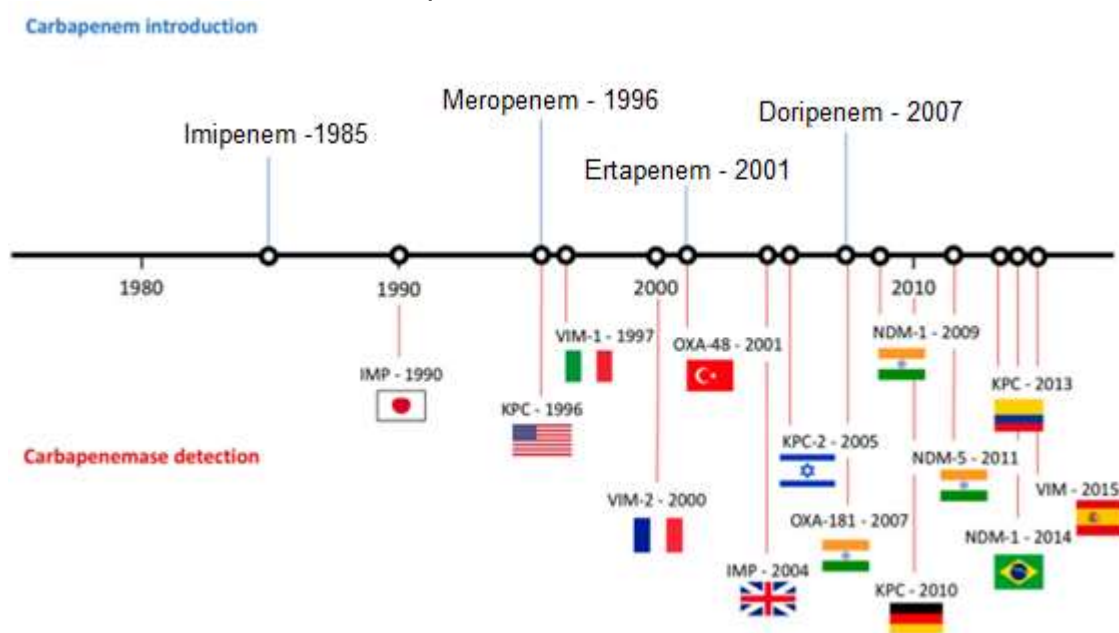
Os hospitais são locais onde mais se usa antibióticos e a pressão seletiva devido ao uso extensivo de antimicrobianos favorece a seleção de superbactérias, multidroga resistentes que podem contaminar o meio ambiente (CAHILL *et al.*, 2019; LIEN *et al.*, 2016; MUTUKU *et al.*, 2022; VERLICCHI *et al.*, 2012).

Enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos (ERC) são resistentes a pelo menos um dos antibióticos carbapenêmicos (ertapenem, meropenem, doripenem ou imipenem) ou produzem uma carbapenemase (uma enzima que pode torná-los resistentes aos antibióticos carbapenêmicos) e são chamadas de ERC. Em exceção aos gêneros de *Providencia* spp., *Proteus* spp., e *Morganella* spp., em que a resistência unicamente ao imipenem não confere o critério de ERC, uma vez que estes organismos têm concentrações inibitórias mínimas (CIMs) intrinsecamente elevadas ao referido antimicrobiano (CDC, 2019).

A incidência relatada de infecção por ERC nos Estados Unidos é de 2,93/100.000 pessoas (LIVORSI *et al.*, 2018). As infecções por ERC estão associadas a maior morbidade e mortalidade especificamente em pacientes que apresentam pneumonia e bacteremia, em Unidade de Terapia Intensiva (UTI). Os maiores riscos estão associados ao uso de antibióticos e internação em UTI. Em estudo realizado em hospital terciário de referência na Arábia Saudita com casos de infecções por ERC, a maioria dos isolados é de *Klebsiella pneumoniae* (77%). A alta taxa de resistência e as opções de tratamento limitadas os tornaram com uma alta

incidência na prática clínica (KHAMIS *et al.*, 2022). A Figura 2 ilustra a linha do tempo com a introdução de carbapenêmicos e o aparecimento de enzimas carbapenemases.

Figura 2 – Linha do tempo representando a introdução de carbapenêmicos e o aparecimento de carbapenemases em todo o mundo



Fonte: SUAY-GARCÍA; PÉREZ-GRACIA, 2019.

As ERC são bactérias emergentes descritas no mundo todo com habilidade de disseminação por meio de plasmídeos (LOGAN; WEINSTEIN, 2017).

Nos Estados Unidos estima-se que as infecções por ERC resultam em 26% de mortalidade e um custo financeiro de aproximadamente 275 milhões de dólares anualmente (MCCANN *et al.*, 2018). Em uma análise realizada em países de baixa e média renda conclui-se que ERCs causando infecções de corrente sanguínea foram associados com o aumento de 75% de probabilidade de mortalidade hospitalar, uma diminuição próxima a 40% na probabilidade de alta hospitalar com vida e um aumento no tempo de hospitalização de 3,7 dias (MARTIN *et al.*, 2018).

No Brasil, houve uma disseminação de β -lactamases mediadas por plasmídeos em *Enterobacteriaceae*. São amplamente disseminadas no ambiente hospitalar e a *Klebsiella pneumoniae* é a espécie predominante entre os produtores de ESBL. Enterobactérias produtoras de carbapenemase tornaram-se amplamente disseminadas no Brasil, a produção de KPC é o mecanismo de resistência mais

frequente (96,2%) em *K. pneumoniae* resistente a carbapenem. A resistência antimicrobiana em *Enterobacteriaceae* no Brasil é um problema crescente que precisa de ações urgentes (BARTLEY *et al.*, 2019; SAMPAIO; GALES, 2016).

Klebsiella pneumoniae podem apresentar mais de um mecanismo de resistência aos antibióticos (TAHERPOUR e HASHEMI, 2013; TSAI *et al.*, 2011). Isolados clínicos produtores de ESBL também podem expressar mecanismos de resistência a outras classes de antimicrobianos tais como fluorquinolonas e aminoglicosídeos e, quando combinado com perda de porinas e bomba de efluxo, também reduzem a sensibilidade aos carbapenêmicos (CHA *et al.*, 2015; CHARFI *et al.*, 2017). A hiperexpressão dessas bombas ou a perda de porinas aliada a outros mecanismos podem resultar em altos níveis de resistência aos β -lactâmicos (TAHERPOUR; HASHEMI, 2013).

Dentre os mecanismos de resistência, a produção de enzimas é o principal. Existem três grupos principais de enzimas responsáveis pela maior parte da resistência aos carbapenêmicos: KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) (classe A), NDM (Metallo- β -Lactamases) (classe B) e OXA-48-like (classe D). Todos os três grupos de enzimas são mediados por plasmídeos, o que implica uma transferência horizontal mais fácil e, portanto, uma disseminação mais rápida da resistência aos carbapenêmicos em todo o mundo (SUAY-GARCÍA; PÉREZ-GRACIA, 2019).

2.3.1 Classificação das beta-lactamases

Com o tempo novas enzimas foram sendo descobertas e foram propostos dois sistemas de classificação de β -lactamases. O primeiro baseado na sequência de aminoácidos (AMBLER *et al.*, 1991) e outro de acordo com características funcionais dessas estruturas (BUSH; JACOBY; MEDEIROS, 1995). Com o avanço científico, a possibilidade de sequenciamento dos genes de resistência, novos subgrupos e variantes são constantemente adicionados aos esquemas de classificação (BUSH; JACOBY, 2010).

A classificação molecular é baseada na sequência de aminoácidos e divide as β -lactamases em enzimas de classe A, C e D que utilizam serina para hidrólise de β -lactâmicos e metaloenzimas de classe B que requerem íons de zinco bivalentes para hidrólise do substrato (BUSH; JACOBY, 2010; NAGSHETTY *et al.*, 2021). A Tabela

1 ilustra a classificação e os representantes das enzimas beta-lactamase de espectro estendido.

Tabela 1 - Classificação e representantes das enzimas beta-lactamase de espectro estendido

Classificação de Ambler (Molecular)	Grupo Bush & Jacoby (2009)	substrato/alvo	Perfil de inibição		Exemplos de membros
			Ácido clavulânico	Azobactam	
A	2a	Penicilinas	Sim	Não	PC-1
	2b	Penicilinas, algumas cefalosporinas de 1ª geração	Sim	Não	TEM-1, TEM-2, SHV-1
	2be	Cefalosporina de espectro estendido, monobactam	Sim	Não	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PET-1, VEB-1
	2br	Penicilinas	Não	Não	TEM-30, SHV-10
	2ber	Cefalosporina de espectro estendido, monobactam	Não	Não	TEM-50
	2c	Carbenicilina	Sim	Não	PSE-1, CARB-3
	2ce	Carbenicilina, cefepima	Sim	Não	RTG-4
	2e	Beta-lactâmicos de espectro estendido	Sim	Não	CepA
B	2f		Mudando	Não	KPC-2, 1M1-1, SME-1
	3a	Carbapenêmicos	Não	Sim	IMP-1, VIM-1, Ccr-A, IND-1, NDM-1
C	3b	Carbapenêmicos	Não	Sim	CphA, Sfh-1
	1	Cefalosporinas	Não	Não	MIR-1
	1e	Cefalosporinas	Não	Sim	GC1, CMY-37
D	2d	Cloxacilina de espectro estendido	Mutável	Não	OXA-1, OXA-10
	2de	Cefalosporina de espectro estendido	Mutável	Não	OXA-11, OXA-15
	2df	Carbapenêmicos	Variável	Não	OXA-23, OXA-48

Fonte: NAGSHETTY *et al.*, 2021 (Adaptado).

Vários novos subgrupos de cada um dos grupos principais são descritos, com base em atributos específicos de enzimas individuais, tais como as enzimas de Classe A, B, C e D descritas a seguir.

Classe A - Beta-Lactamases

Beta-lactamases classe A na forma de variantes de SHV (variável reagente de sulfidril) são comumente encontradas em isolados de *Escherichia coli* e

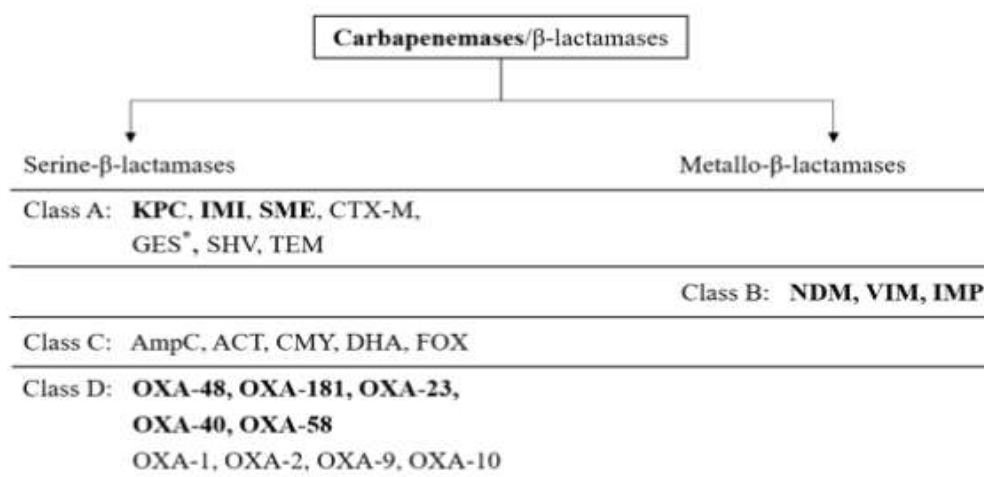
Klebsiella pneumoniae resistentes à beta-lactamase associadas a infecções da corrente sanguínea, respiratórias e urinárias adquiridas no ambiente hospitalar (BUSH; JACOBY, 2010).

Mutações em genes *bla*TEM-1 e *bla*SHV-1 pré-existentes deram origem ao surgimento de ESBLs capazes de hidrolisar cefalosporinas de espectro estendido com uma cadeia lateral oxiiimino. Essas cefalosporinas incluem cefotaxima, ceftriaxona e ceftazidima, bem como o *oxiiimino-monobactam* aztreonam. Cefotaximases são caracterizadas por genes CTX-M que surgiram por transferência de plasmídeo de genes ESBL cromossômicos pré-existentes de bactérias *Kluyvera* spp. (DRAWZ; BONOMO, 2010). CTX-M ESBLs representam uma grande proporção de cepas ESBL globais e são as ESBLs dominantes nos EUA, principalmente entre as infecções do trato urinário (SURGERS *et al.*, 2018).

Classe A – Serina-carbapenemases

As beta-lactamases não metálicas podem hidrolisar carbapenêmicos, bem como cefalosporinas, penicilina e aztreonam (DRAWZ; BONOMO, 2010), marcando a evolução da atividade da beta-lactamase de direcionar principalmente penicilinas e cefalosporinas para enzimas que hidrolisam os carbapenêmicos. Representante de serina carbapenemases classe A incluem as enzimas NMC-A, IMI, SME e KPC (HANSEN, 2021). A Figura 3 ilustra a classificação de carbapenemases/ β -lactamases dependendo do seu domínio catalítico central.

Figura 3 - Classificação de carbapenemases/ β -lactamases dependendo do seu domínio catalítico central



*Algumas variantes podem possuir atividade carbapenemase.

Fonte: NORDMANN; POIREL, 2019.

As enzimas KPC são as mais conhecidas e bem descritas desta classe, que, embora inicialmente encontradas em *K. pneumoniae*, agora são prontamente detectadas em muitos membros da família *Enterobacteriaceae*. Conferem resistência a todos os beta-lactâmicos (incluindo carbapenêmicos e monobactâmicos) (DRAWZ; BONOMO, 2010). As KPCs são frequentemente carregadas por plasmídeos e têm a capacidade de hidrolisar carbapenêmicos e são parcialmente inibidas pelo ácido clavulânico (JI *et al.*, 2015).

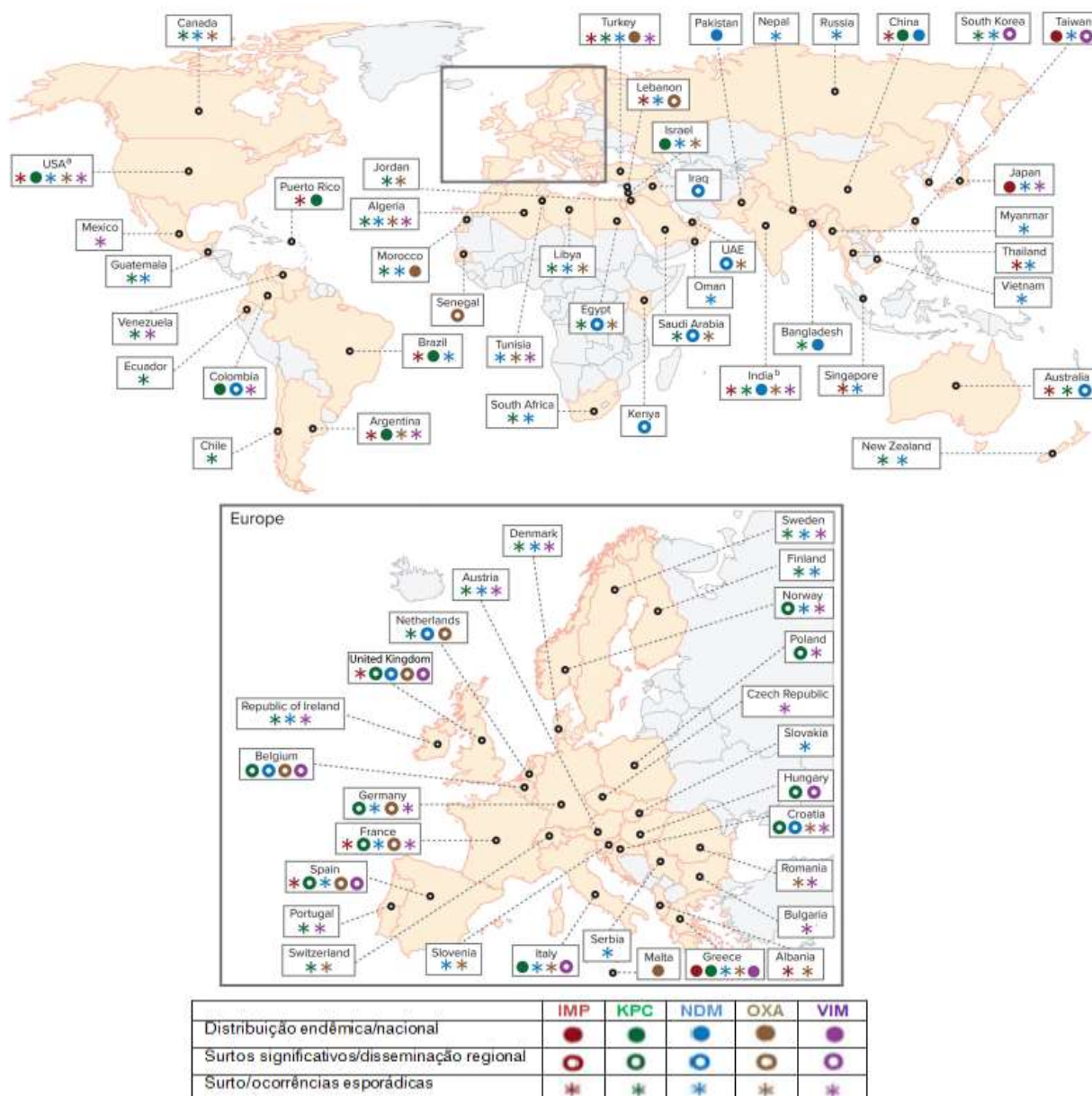
Organismos que expressam genes KPC são produtores de enzimas disseminadas mundialmente e frequentemente são resistentes a outras classes de antibióticos, como quinolonas e aminoglicosídeos, criando assim organismos altamente MDR (LOGAN; WEINSTEIN, 2017, PORRECA; SULLIVAN; GALLAGHER, 2018).

O primeiro estudo que reportou uma cepa produtora de KPC no Brasil foi publicado em 2009 (MONTEIRO *et al.*, 2009). Oito anos antes, a enzima KPC-1 foi reportada pela primeira vez em *K. pneumoniae* isolada de amostra de paciente internado em hospital da Carolina do Norte – EUA (YIGIT *et al.*, 2001).

No estado de Mato Grosso do Sul, o primeiro relato de *K. pneumoniae* produtora de KPC foi isolada de urina em paciente com leucemia linfocítica admitida no Hospital Universitário (HUMAP) no ano de 2010 (CHANG *et al.*, 2013). Recente estudo mostra que *K. pneumoniae* produtora de carbapenemase é muito frequente nos grandes hospitais de nosso estado (CAMPOS *et al.*, 2017).

As carbapenemases variantes do gene KPC são as mais comuns, globalmente encontradas, sendo as variantes dos genes *blaKPC-2* e *blaKPC-3* as mais frequentes. Os países com alta prevalência de *K. pneumoniae* produtores de KPC incluem EUA, Itália, Grécia, Reino Unido e Ásia (China), bem como alguns países do Médio Leste (Israel) e América do Sul (Brasil, Colômbia) (LOGAN; WEINSTEIN, 2017). A Figura 4 mostra a distribuição global de carbapenemases em *Enterobacteriaceae*.

Figura 4 - Distribuição global de carbapenemases em *Enterobacteriaceae*, por país e região



Legenda: IMP - imipenem metalo- β -lactamase; KPC - *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase; NDM - metalo- β -lactamase de Nova Deli; OXA - β -lactamase hidrolisada de carbapenem do tipo oxacilina e VIM - , metalo- β -lactamase codificada por integron de Verona.

Fonte: LOGAN; WEINSTEIN, 2017 (adaptado).

Na Figura acima, OXA refere-se principalmente a OXA-48, exceto na Índia, onde se refere a OXA-181. Abreviaturas: IMP, ativo sobre imipenem metalo- β -lactamase; KPC, *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase; NDM, metalo- β -lactamase de Nova Deli; OXA, β -lactamase hidrolisada de carbapenem do tipo oxacilina; VIM, metalo- β -lactamase codificada por integron de Verona.

O alto poder de disseminação do gene *blaKPC* se deve a sua inserção em elementos genéticos móveis, como transposons e plasmídeos conjugativos. O principal elemento móvel reportado na literatura é o transposon Tn4401 responsável pela disseminação desse gene no Brasil e no mundo (MATHERS *et al.*, 2011).

Outra carbapenemase denominada BKC (Brazilian *Klebsiella carbapenemase*) foi descrita em três isolados na cidade de São Paulo (NICOLETTI *et al.*, 2015). O gene *blaBKC* foi relatado apenas no estado de São Paulo até a data do trabalho e com baixa prevalência (0,3%). Essa carbapenemase foi encontrada em elementos móveis e pode se disseminar para outras bactérias e outras regiões (MARTINS *et al.*, 2016).

Classe B - Beta-Lactamases

São denominadas de metallo- β -lactamases (MBLs), e diferente das outras classes que utilizam a serina como sítio para a hidrólise dos antibióticos. Essas necessitam de pelo menos um cofator metálico (íon de Zn^{2+}) para exercer a atividade hidrolítica em todos os antibióticos β -lactâmicos, exceto o aztreonam (BONOMO, 2017).

Foram isoladas de *Acinetobacter* spp. e *Pseudomonas* spp., e estão cada vez mais associados a membros das *Enterobacterales*, como *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *Escherichia coli* e *Enterobacter* spp. MBLs são codificadas por integron de Verona (VIM), tipo *Pseudomonas* (IMP) e o Nova Delhi MBL (NDM), VIM e IMP são geralmente encontradas em *Pseudomonas* e NDM em enterobactérias (GAUTHIER *et al.*, 2019).

MBLs são comumente expressas a partir de elementos genéticos móveis, como integrons, plasmídeos e transposons, que contribuíram para a disseminação de MBLs. Elas hidrolisam efetivamente as beta-lactamases e não são inibidas por inibidores de beta-lactamase (ácido clavulânico, tazobactam, vaborbactam) (QUEENAN; BUSH, 2007).

A MBL New Delhi Metallo-beta-lactamase-1 (NDM) foi descrita pela primeira vez em *K. pneumoniae* proveniente de urina de uma paciente Indiana que vivia na Suécia e havia viajado para Nova Delhi, Índia (YONG *et al.*, 2009). No Brasil, essa carbapenemase já foi reportada em *Providencia rettgeri* oriundo de um paciente situado na cidade de Porto Alegre – RS (CARVALHO-ASSEF *et al.*, 2013).

As NDM estão disseminadas no mundo e, geralmente, estão presentes em microrganismos MDR. Estudos demonstram que plasmídeos que carregam o gene *bla*NDM também levam consigo outros determinantes de resistência a quinolonas, aminoglicosídeos e β -lactamases de amplo espectro (ESBL) (RARO *et al.*, 2020). Foram descritas 31 variantes destas enzimas que também se disseminam por meio de elementos genéticos móveis e possuem propriedades hidrolíticas eficazes contra a maioria dos β -lactâmicos, exceto monobactams (DUIN; DOI, 2017; NAAS *et al.*, 2017).

No Brasil foram isolados *Enterobacterales* com coprodução de ambas enzimas KPC e NDM, chamados de coprodutores (QUILES *et al.*, 2015, VIVAS *et al.*, 2020).

Também merecem destaque as enzimas VIM e IMP, ambas são originárias de *P. aeruginosa* e foram transferidas para membros da ordem *Enterobacterales*. Além disso, partilham de similaridades relacionadas aos plasmídeos as quais são carregadas e no seu mecanismo de ação, ambas hidrolisam β -lactâmicos exceto monobactam e são suscetíveis aos inibidores de β -lactâmicos (BUSH, 2018).

As metalo β -lactamases do tipo IMP estão entre as mais comuns carbapenemases detectadas em *Enterobacteriaceae* e foram relatados principalmente no leste da Ásia, incluindo o Japão (NORDMANN; POIREL, 2014). No Brasil a mais frequente é a NDM (CAMARGO, 2022). Embora as MBLs do tipo IMP sejam beta-lactamases classe B, suas propriedades hidrolíticas para os carbapenêmicos são fracas, muitas vezes resultando em elevada resistência ao meropenem enquanto mantem a suscetibilidade ao imipenem (TADA *et al.*, 2015).

Classe C - Cefalosporinases baseadas em serina

São enzimas serino-dependentes comuns em cromossomos de bacilos Gram-negativos não fermentadores e enterobactérias (BUSH; JACOBY, 2010). Entre as cefalosporinases, as β -lactamases do tipo AmpC são clinicamente importantes por conferir espectro de resistência às cefalosporinas (JACOBY, 2009).

As AmpC β -lactamases são comumente associados a *Serratia* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Providencia* spp., *Proteus mirabilis/vulgaris* indol-positivo, *Citrobacter* spp., e *Enterobacter* spp., que coletivamente são muitas vezes referidos como organismos “SPICE”. São geralmente resistentes a penicilinas, inibidores de

beta-lactamase e cefalosporinas como cefoxitina, cefotetan, ceftriaxona e cefotaxima (HANSEN, 2021).

São maioritariamente enzimas codificadas por genes cromossomais (cAmpCs) mas que em alguns casos também podem ser mediadas por aquisição plasmidial (pAmpCs). Não degradam os carbapenêmicos. Porém, são capazes de impedir fisicamente a ligação entre antibiótico e seu alvo nestes microrganismos (GOESSENS *et al.*, 2013; QUEENAN *et al.*, 2010). Os produtores de cAmpCs frequentemente possuem altos níveis de suscetibilidade às fluoroquinolonas e aminoglicosídeos (CHAUBEY *et al.*, 2014; HILTY *et al.*, 2013).

Em muitas *Enterobacterales*, a expressão de AmpC é baixa, mas induzível em resposta à exposição de β -lactâmicos (HANSEN, 2021).

Classe D - Serina oxacilinas

As oxacilinas são enzimas que têm capacidade de hidrolisar as penicilinas, não são inibidas por inibidores de β -lactamases e foram inicialmente descritas em bacilos Gram-negativos não fermentadores. Apesar da alta variabilidade quanto a sequência de aminoácidos e em relação ao espectro de ação, de forma geral, conferem resistência a ampicilina, cefalotina, cloxacilina e oxacilina (BUSH; JACOBY, 2010). Essas se tornaram recentemente uma preocupação clínica (HANSEN, 2021).

Beta-lactamases classe D, e variantes OXA, possuem significativas atividades carbapenemase e, geralmente, não são inibidas pelo ácido clavulânico, tazobactam e sulbactam (com algumas exceções; por exemplo, OXA-2 e OXA-32 são inibidos pelo tazobactam, mas não por sulbactam e clavulanato, e OXA-53 é inibido pelo clavulanato) (DRAWZ; BONOMO, 2010).

Os casos iniciais de um produtor de OXA-48 em *K. pneumoniae* apresentaram-se como uma cepa altamente resistente a drogas porque coexpressou outras betalactamases (β -lactamase de espectro estendido classe A SHV-2a e as β -lactamases de espectro estreito TEM-1 e OXA-47), bem como defeitos dentro das proteínas da membrana externa (POIREL; POTRON; NORDMANN, 2012).

Quase um terço das variantes de OXA hidrolisam os antibióticos carbapenêmicos. OXAcarbapenemases são predominantemente isoladas em *Acinetobacter* spp. Entretanto, a carbapenemase OXA-48 foi descrita em um isolado

MDR de *K. pneumoniae* em 2004 em um paciente com infecção do trato urinário (POIREL *et al.*, 2004).

As oxacilinas são enzimas também carregadas por plasmídeos e têm a habilidade de mutar-se e expandir seu espectro de atividade. Mais de mil variantes foram reportadas do grupo das oxacilinas (NAAS *et al.*, 2017). No Brasil, uma variante também capaz de hidrolisar os carbapenêmicos, OXA-370, foi descrita em *Enterobacter hormaechei* resistente aos carbapenêmicos, oriundo de um swab retal de um paciente (SAMPAIO *et al.*, 2014). Esta enzima já foi identificada também em *K. pneumoniae* isolados no estado do Rio de Janeiro e em outras cidades no sul do Brasil (MAGAGNIN *et al.*, 2017, PEREIRA *et al.*, 2015).

Enquanto OXA-48 é uma β -lactamase classe D com a mais alta eficiência catalítica para imipenem (DOCQUIER *et al.*, 2009), organismos contendo o plasmídeo mediado pelo gene blaOXA-4 hidrolisa eficazmente as penicilinas, mas hidrolisam carbapenêmicos em níveis baixos e mostram atividade fraca para cefalosporinas e baixa atividade hidrolítica contra ceftazidima e cefepima (HANSEN, 2021).

Os microrganismos abrigando diferentes tipos de enzimas, incluindo as mais importantes e predominantes KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase), VIM (Verona imipenemase), IMP (Imipenemase), NDM (New Delhi metallo- β -lactamase) e OXA-48 (Oxacillinase), são relatados rotineiramente e estão frequentemente presentes em muitas infecções em todo o mundo (HANSEN, 2021).

2.4 Testes de suscetibilidade antimicrobiana e testes para detecção de carbapenemases

Os testes de suscetibilidade antimicrobiana (TSA) fornecem evidências quantitativas se um isolado tem ou não suscetibilidade reduzida a um antibiótico carbapenêmico específico. Os resultados de tais testes são usados principalmente para orientar as modalidades de tratamento e prever o sucesso terapêutico (HARA *et al.*, 2013). Embora esses resultados também possam ser usados para identificar ERC para fins epidemiológicos e preventivos, são necessários testes adicionais para identificar de forma confiável EPC e identificar o tipo de carbapenemase responsável pela diminuição da suscetibilidade observada (ANDERSON; BOERLIN, 2020).

De acordo com BrCAST (2018) os valores de cut off epidemiológico (ECOFF) definidos pelo EUCAST podem ser utilizados para detectar produtores de carbapenemase. O Meropenem oferece a melhor combinação entre sensibilidade e especificidade em termos de detecção de produtores de carbapenemase. Ertapenem tem excelente sensibilidade, mas pouca especificidade, particularmente em espécies como *Enterobacter* spp., devido à sua relativa instabilidade frente às ESBLs e β -lactamases AmpC em associação com perda de porinas. A Tabela 2 mostra os pontos de corte clínicos para triagem de *Enterobacteriaceae* produtoras de carbapenemases.

Tabela 2 - Pontos de corte clínicos para triagem de *Enterobacteriaceae* produtoras de carbapenemases (de acordo com a metodologia do BrCAST)

Carbapenêmico	Diâmetro do halo de inibição (mm) com discos de 10 μ g	
	Valor de corte S/I	Valor de corte para triagem
Meropenem	≥ 22	$< 28^*$
Ertapenem	≥ 25	< 25

*Isolados com 25-27mm só necessitam ser investigados para produção de carbapenemases se forem resistentes a piperacilina/tazobactam e/ou temocilina (temocilina contribui mais para especificidade). Investigação de carbapenemases é sempre necessária se o diâmetro da zona para meropenem for < 25 mm.

Para a confirmação de produtores de carbapenemases vários métodos foram desenvolvidos. Podem ser divididos da seguinte maneira: a) testes baseados em inibidores de carbapenemase; b) testes de crescimento baseados na inativação de carbapenêmicos; c) testes baseados na detecção de produtos de hidrólise de carbapenêmicos; d) testes imunocromatográficos para detecção de carbapenemases; e) Dessorção a Laser Assistida por Matriz/Ionização-Tempo de Massa de Vôo Espectrometria (MALDI-TOF) (ANDERSON; BOERLIN, 2020).

O teste do disco combinado, método baseado em inibidores, embora não possam identificar todas as classes ERC, fornecem informações úteis. Esse teste é usado em conjunto com TSAs, principalmente como parte de testes de difusão em

disco, para os quais discos contendo combinações de carbapenêmicos e inibidores são agora comercialmente acessíveis (ANDERSON; BOERLIN, 2020).

Neste teste o ácido borônico inibe carbapenemases da classe A (embora dados além de KPC sejam raros) e o ácido dipicolínico e o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) inibem carbapenemases classe B. Cloxacilina, que inibe β -lactamases AmpC, foi adicionada aos testes para diferenciar entre hiperprodução de AmpC com perda simultânea de porinas e produção de carbapenemase. A principal desvantagem é que eles podem demorar 18 horas (na prática a incubação é feita durante a noite), por essa razão novos métodos rápidos estão sendo atualmente pesquisados (BrCAST, 2018).

Os testes de crescimento baseados na inativação de carbapenêmicos são o teste Hodge modificado (THM) e o método de inativação do carbapenêmico (CIM) (ANDERSON; BOERLIN, 2020). O THM é o estriamento de um isolado clínico em uma linha de distância de um disco impregnado com ertapenem ou meropenem que foi previamente colocado em uma placa de ágar inoculada com cepa de *E. coli* ATCC 25922 suscetível a carbapenem (TAMMA; SIMNER, 2018).

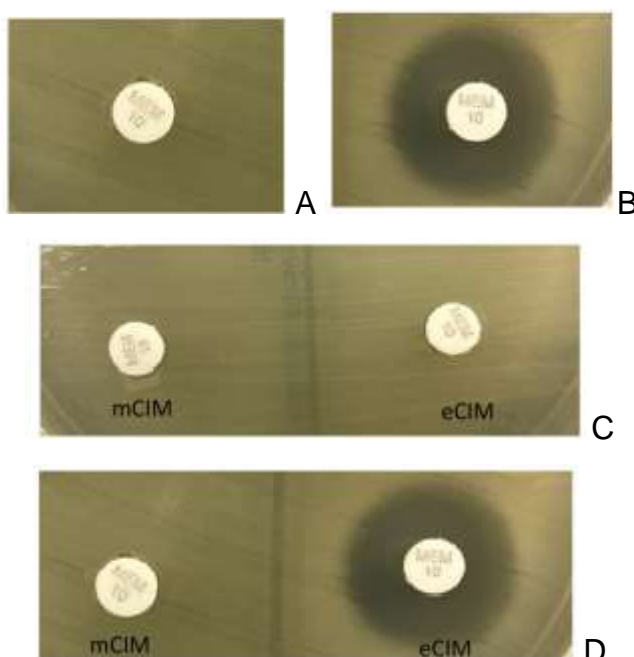
O THM além de ser barato e prático, tem excelente sensibilidade para detectar isolados de enterobactérias que produzem carbapenemases classe A (KPC) e classe D (OXA-48). Porém sua sensibilidade é baixa para produtores de NDM. No entanto, este teste tem uma baixa especificidade e é demorado (NORDMANN; GIRLICH; POIREL, 2012). Devido a essas limitações, o THM foi retirado do Documento CLSI M100 em 2018, à medida que abordagens fenotípicas mais recentes com maior precisão se tornaram disponíveis (CLSI, 2018).

De acordo com o BrCAST (2018) o princípio do método de mCIM é detectar a hidrólise enzimática pela incubação de um carbapenem com uma suspensão bacteriana. Utiliza discos de teste de sensibilidade a antibióticos como substrato. Após duas horas de incubação de uma alça carregada de colônias bacterianas com um disco de meropenem, o disco é colocado em um ágar previamente inoculado com *Escherichia coli* ATCC 25922. A inativação enzimática é indicada por ausência de zona de inibição, enquanto que ausência de atividade de carbapenemase implicará na formação de zona de inibição visto que o meropenem no disco não foi hidrolisado.

O mCIM mostrou-se um método de triagem fenotípico econômico e robusto que pode detectar de forma confiável atividade de carbapenemases (VAN DER

ZWALUW *et al.*, 2015), mas são necessários testes moleculares para a identificação dos genes produtores de carbapenemases (TIJET; PATEL; MELANO, 2016). O complemento eCIM, com a adição de quelante catiônico bivalente EDTA permite a diferenciação de metalo- β -lactamases de serina carbapenemases em isolados de *Enterobacteriaceae* que são positivos para o mCIM (CLSI, 2018). A Figura 5 ilustra a interpretação do teste fenotípico mCIM e eCIM.

Figura 5 - Ilustração da interpretação do teste fenotípico mCIM e eCIM

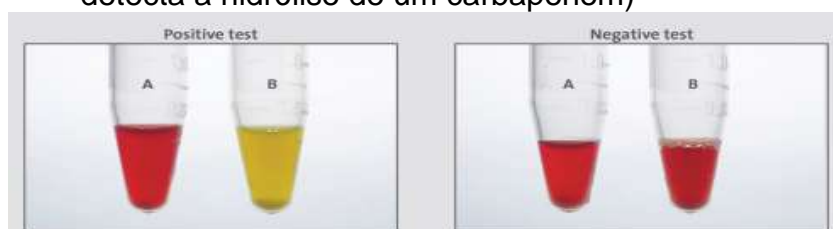


- A. Resultado positivo do mCIM;
- B. Resultado negativo de mCIM;
- C. mCIM e eCIM resultados positivos para um produtor de serina carbapenemase, pois não há inibição da atividade da carbapenemase na presença de EDTA.
- D. mCIM e eCIM positivos para um produtor de metalo-beta-lactamase, pois há inibição da atividade da carbapenemase na presença de EDTA.

Fonte: TAMMA; SIMNER, 2018

Os testes baseados na detecção de produtos de hidrólise de carbapenem, consistem em variações do teste Carba NP, que é um ensaio bioquímico que detecta a hidrólise de um carbapenem por extratos bacterianos por meio de um indicador de pH (Potencial de hidrogênio), produzindo uma mudança de cor resultante de um indicador vermelho de fenol de vermelho para amarelo (VASOO *et al.*, 2013). A principal vantagem do teste Carba NP e seus derivados sobre outros testes fenotípicos é que pode ser lido após 2 horas de incubação (ANDERSON; BOERLIN, 2020). A Figura 6 ilustra a interpretação deste teste.

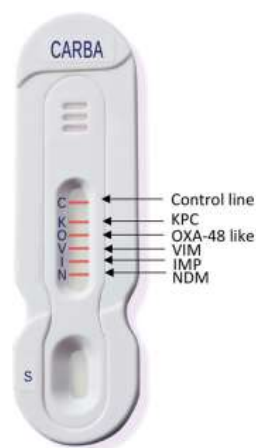
Figura 6 - Ilustração da interpretação do teste Carba NP (ensaio bioquímico que detecta a hidrólise de um carbapenem)



Fonte: CLSI, 2018.

Outra metodologia desenvolvida recentemente é o teste imunocromatográfico para detecção de carbapenemases, que são baseados em anticorpos e usados rotineiramente na forma de imunoenensaio de fluxo lateral. BOUTAL *et al.* (2018) validou um painel imunocromatográfico suficientemente amplo de enzimas, ou seja, NDM-, KPC-, IMP-, VIM- tipo e carbapenemases semelhantes a OXA-48. No entanto, esses tipos de testes ainda são muito caros para triagem de rotina de EPCs (ANDERSON; BOERLIN, 2020). A Figura 7 ilustra o teste imunocromatográfico.

Figura 7 - Ilustração do teste imunocromatográfico NG-Teste Carba 5 (NG Biotech)



Legenda: Control line – linha controle; IMP - imipenem metalo- β -lactamase; KPC - *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase; NDM - metalo- β -lactamase de Nova Deli; OXA-48 like - β -lactamase hidrolisada de carbapenem do tipo oxacilina e VIM - , metalo- β -lactamase codificada por integron de Verona.

Fonte: TAMMA; SIMNER, 2018

A técnica de Ionização e dessorção a laser assistida por matriz utilizando equipamento para MALDI-TOF (sigla em inglês *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Light*) foi utilizada para detectar a diminuição ou desaparecimento de certos picos específicos de carbapenêmicos em um espectro de massa quando a

suspensão é previamente incubada com o carbapenêmico (HRABÁK *et al.*, 2012, LASSERRE *et al.*, 2015). Tal como acontece com outros métodos, o MALDI-TOF também pode ter problemas com produtores do tipo OXA-48. Este problema de sensibilidade foi melhorado pela adição de bicarbonato de amônio (NH_4HCO_3) ao tampão da reação (PAPAGIANNITSIS *et al.*, 2015). Apesar destes resultados promissores, o uso rotineiro de MALDI-TOF para identificar produtores de carbapenemases em laboratórios de diagnóstico e vigilância pode ter que esperar, até que protocolos automatizados e as configurações do instrumento sejam estabelecidos (ANDERSON; BOERLIN, 2020).

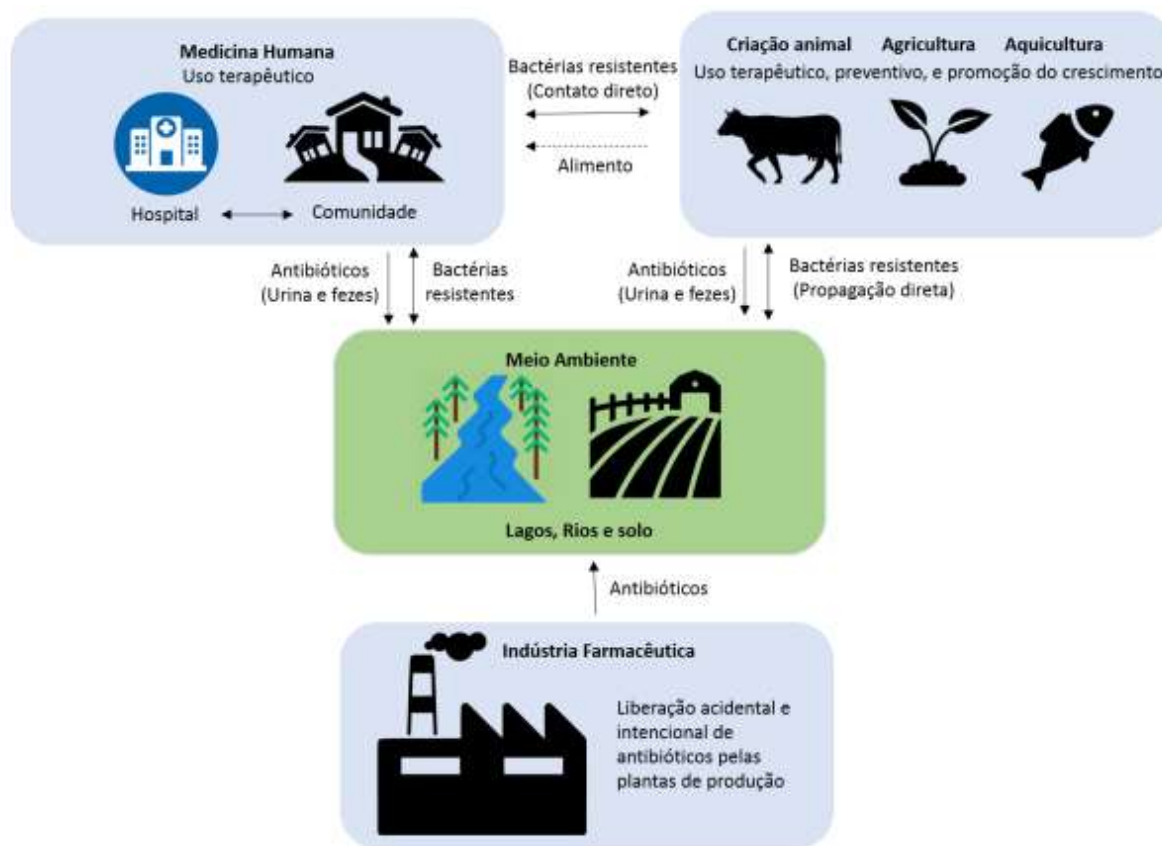
Existem ainda os métodos baseados em ácido desoxirribonucleico (DNA) que são o padrão-ouro para a detecção de EPCs. A reação em cadeia da polimerase (PCR) é a ferramenta mais comum utilizada para detectar a presença de um gene de interesse. Além de ser rápido, a PCR também é capaz de detectar genes de carbapenemase que podem ser difíceis de detectar de outra forma, como aqueles para enzimas semelhantes a OXA-48 (KOROSKA *et al.*, 2017).

2.5 Disseminação ambiental de bactérias resistentes a antibióticos

A disseminação ambiental de bactérias resistentes a antibióticos é reconhecida como uma ameaça crescente à saúde pública (BERENDONK *et al.*, 2015; WILLIAMS *et al.*, 2016).

O uso imprudente e excessivo de antibióticos nos setores agrícola, veterinário e médico contribuem para o aumento epidêmico global da resistência antimicrobiana. Fator contribuinte à disseminação de bactérias resistentes a antibióticos e seus genes de resistência também está associado a resíduos de antibióticos liberados ao meio ambiente (SAMREEN *et al.*, 2021). A Figura 8 ilustra a ecologia dos antibióticos e a resistência aos antibióticos.

Figura 8 – Ecologia dos antibióticos e resistência a antibióticos



Fonte: ANGELO, 2019.

Em junho de 2017, a Comissão Europeia publicou a ação de saúde da União Europeia (UE), um plano contra a resistência antimicrobiana (RAM) com base no plano de ação da União Europeia contra a RAM lançado anteriormente em 2011. O novo plano de ação contra a RAM preconiza uma abordagem de saúde única e destaca a importância da interconexão ambiente, saúde humana e saúde animal (EUROPEAN COMMISSION, 2017).

Em 2018 a Secretaria de Vigilância em Saúde do Brasil publicou o Plano de ação nacional de prevenção e controle da resistência aos antimicrobianos no âmbito da saúde única 2018-2022 (PAN-BR) que possui vários objetivos. O objetivo geral é garantir que se mantenha a capacidade de tratar e prevenir doenças infecciosas com medicamentos seguros e eficazes, que sejam de qualidade assegurada e que sejam utilizados de forma responsável e acessível a todos que deles necessitem (BRASIL, 2018). Como parte do seu plano de ação, o Plano de Ação Nacional de Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos no âmbito da Agropecuária, o PAN-BR AGRO foi elaborado visando o desenvolvimento de um

sistema de vigilância e monitoramento da resistência aos antimicrobianos no âmbito da agropecuária (BRASIL, 2018).

Embora a resistência microbiana seja um fenômeno de ocorrência natural, esse processo pode ser acelerado por alguns fatores, como o uso excessivo de antibióticos (JO *et al.*, 2021; KARAKONSTANTIS, KALEMAKI, 2019). Um agravante é o emprego desses medicamentos também na agricultura, na pecuária e em outras atividades de produção de proteína animal (MANYI-LOH *et al.*, 2018; MELETIS *et al.*, 2015; VIDOVIC, VIDOVIC, 2020).

O plano de ação global sobre resistência antimicrobiana (RAM) enfatiza lacunas particularmente importantes no conhecimento que precisam ser preenchidas, incluindo informações sobre a magnitude da RAM em humanos, animais, agricultura e meio ambiente; e o entendimento aprimorado sobre como a resistência se desenvolve e se espalha, incluindo como a resistência circula dentro e entre seres humanos e animais e por meio de alimentos, água e meio ambiente. Essas informações e entendimento são importantes para o desenvolvimento de novas ferramentas, políticas e regulamentos para combater a RAM (THAMLIKITKUL *et al.*, 2019).

O conceito *One Health* (Saúde Única) é definido como uma abordagem colaborativa, multissetorial e transdisciplinar a nível local, regional, nacional e global que tem como objetivo alcançar ótimos resultados de saúde. A fim de facilitar a prevenção e contenção da RAM deve-se valorizar a interconexão entre pessoas, animais, plantas e ambiente (THAMLIKITKUL *et al.*, 2019).

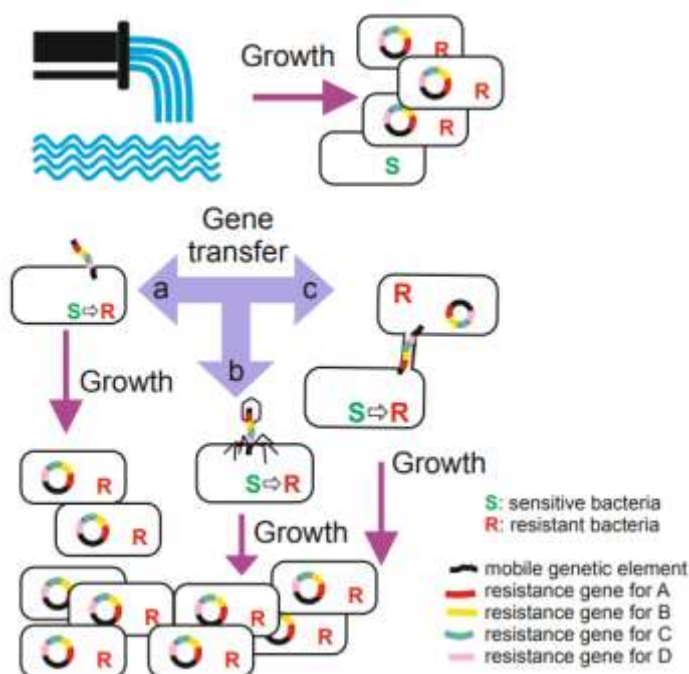
Os efluentes hospitalares caracterizam-se como possíveis veículos de disseminação de inúmeros microrganismos patogênicos, além de apresentar grandes concentrações de contaminantes utilizados por serviços de saúde, que são excretados pelas vias urinárias e fecais de pacientes. Sendo assim, quando não tratados são importantes contaminantes dos recursos hídricos (AREND; HENKES, 2014).

As bactérias Gram-negativas resistentes a antibióticos, principalmente da família *Enterobacteriaceae*, são cada vez mais relatadas em águas residuais hospitalares (CAHILL *et al.*, 2019, PARVEZ; KHAN, 2018).

As águas residuais e as estações de tratamento de efluente são consideradas como potenciais focos de transferência dos genes de resistência bacteriana. As bactérias sem e com genes de resistência estão presentes nos efluentes e podem

adquirir genes de resistência por três vias, são eles: a) transformação, onde a bactéria interioriza fragmentos de materiais genéticos móveis com genes de resistência, integrando-os em seu cromossomo; b) transdução, onde um bacteriófago insere seu material genético (DNA ou RNA) com genes de resistência; e c) conjugação, onde uma bactéria duplica o plasmídeo portador de genes de resistência e, através do pilus sexual, transfere tais genes para a bactéria, até então, sensível. A Figura 9 ilustra esses mecanismos de transferência e aquisição de genes (KARKMAN *et al.*, 2018).

Figura 9 - Ilustração dos mecanismos de transferência e aquisição de genes de resistência por bactérias em efluentes



Fonte: KARKMAN *et al.*, 2018.

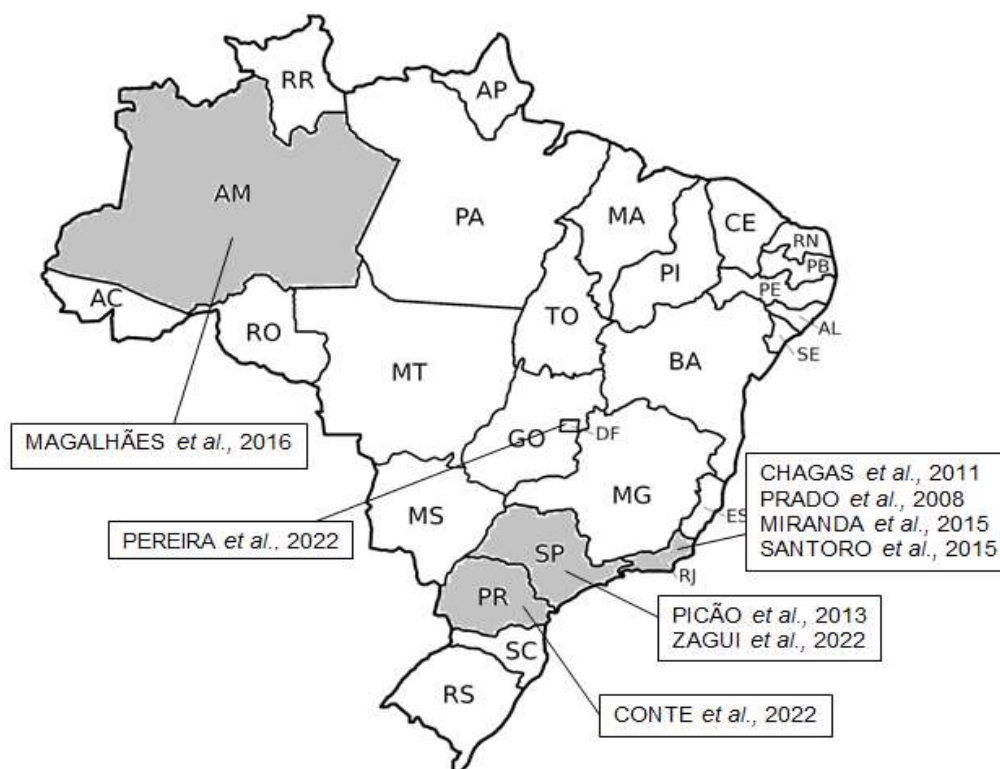
Conforme consta na legislação brasileira, Resolução RDC nº 50 de 21 de fevereiro de 2002, que dispõe sobre o regulamento técnico para planejamento, programação, elaboração e avaliação de projetos físicos de estabelecimentos assistenciais de saúde (EAS), da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), determina que se a região onde está o EAS possuir coleta pública e tratamento de efluente, o efluente resultante desses serviços pode ser lançado na rede coletora sem qualquer tratamento. Entretanto, consta no Art. 11 da Resolução CONAMA nº 358, de 29/04/2005, que os efluentes líquidos provenientes de instituições hospitalares, devem atender a critérios estabelecidos pelos órgãos

ambientais, gestores de recursos hídricos e de saneamento competentes, para poderem ser lançados à rede pública de efluente ou a um corpo receptor. Ainda de acordo com a Resolução do CONAMA n. 430 de 2011, devem ser lançados direta ou indiretamente nos corpos d'águas os resíduos líquidos somente após tratamento prévio obedecendo aos padrões previstos (BRASIL, 2005, 2011).

Partindo do pressuposto da existência de bactérias multirresistentes aos antibióticos no efluente hospitalar, reitera-se a significância da realização de estudos nessas matrizes a fim de verificar a contribuição destas para a contaminação de águas superficiais locais e o potencial risco à população e ao meio ambiente e ainda preencher a lacuna que existe em nosso estado.

Pesquisa realizada na base de dados do Pub med de 2008 a 2023 com as palavras: “sewage”; “Brazil”; “hospital”; “carbapenemase”; e outra pesquisa com as palavras chaves: “bacteria”; “hospital”; “effluent”, “Brazil”, mostram que existem poucos estudos publicados sobre o tema e com maior número de estudos na região sudeste do Brasil (Figura 10).

Figura 10 - Distribuição de estudos com identificação de bactérias em efluente hospitalar em diferentes estados brasileiros



3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Caracterizar as enterobactérias multidroga resistente isoladas de efluente hospitalar e não hospitalar, em Campo Grande – MS.

3.2 Objetivos específicos

- a) Investigar a presença de bactérias produtoras de carbapenemase isoladas de efluente hospitalar e não hospitalar;
- b) Investigar a produção de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) em *Enterobacteriaceae* isoladas de efluente hospitalar e não hospitalar;
- c) Analisar a suscetibilidade aos antimicrobianos de enterobactérias produtoras de KPC, isoladas de efluente hospitalar e não hospitalar;
- d) Determinar a frequência de enterobactérias multidrogas resistentes, extensivamente resistentes e pan resistentes, isoladas de efluente hospitalar e não hospitalar.

4 METODOLOGIA

4.1 Tipo, local e período da pesquisa

Trata-se de pesquisa descritiva, transversal, com coleta de dados primários, realizada no município de Campo Grande – Mato Grosso do Sul, considerando enterobactérias multidrogas resistentes isoladas de efluente hospitalar e não hospitalar. Realizado no período de Setembro de 2021 a Fevereiro de 2022.

4.2 Sítio de coleta de amostras

4.2.1 Coleta de amostras

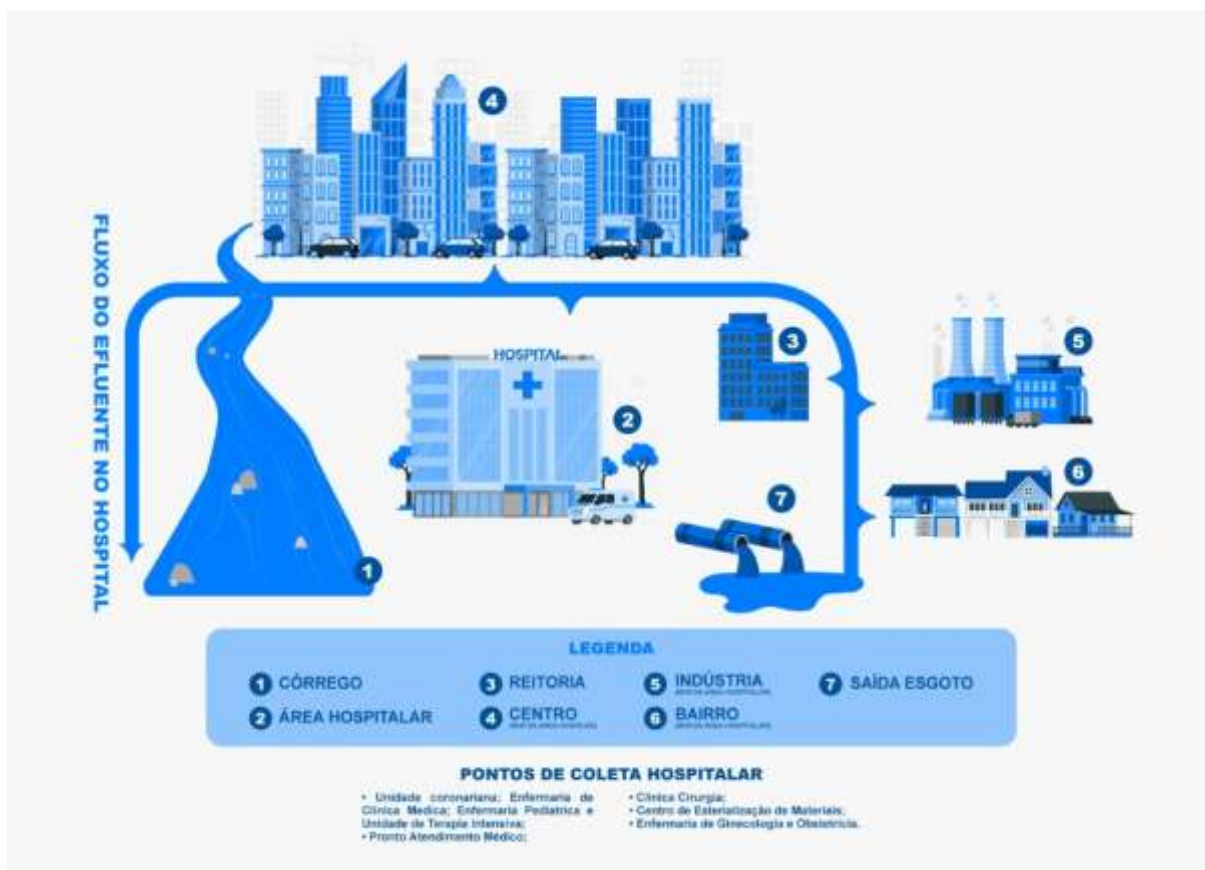
Para realizar a caracterização de enterobactérias e bactérias multidroga resistente foram incluídas amostras de efluente hospitalar e não hospitalar, amostragem não probabilística por conveniência, calculada de acordo com o tempo da coleta de dados.

Durante a coleta das amostras foi utilizado Formulário de dados de coleta de amostras e teste de laboratório (APÊNDICE A) impresso para registrar os dados como: local, data, horário e os resultados obtidos.

As amostras foram coletadas uma vez por mês, durante seis meses. Foram coletadas 42 amostras de efluentes de diferentes locais de um hospital terciário, de ensino, na cidade de Campo Grande – MS. Do hospital, foram coletadas águas residuais da Unidade coronariana (UCO); Enfermaria de clínica médica; Enfermaria pediátrica e Unidade de Terapia Intensiva (UTI); Pronto Atendimento Médico (PAM); Clínica Cirúrgica; Central de Esterilização de Materiais (CEM); Enfermaria de ginecologia e obstetrícia e Saída do efluente do Hospital - Setor de manutenção e local com autorização para coleta da empresa Águas Guariroba: saída do efluente do hospital para estação de tratamento da Águas Guariroba. Para efluentes residuais de ambientes não hospitalares, foram 42 amostras: Odontologia – entrada do efluente no hospital; Laboratório de Análises Clínicas Hospitalar; córrego Anhanduí; centro da cidade; bairro Moreninha (região sul); indústria da região e local com autorização para coleta da empresa Águas Guarirobas: reitoria da

Universidade, ponto antes da entrada do efluente do hospital. A Figura 11 ilustra os locais de coleta.

Figura 11 – Desenho esquemático ilustrando os locais de coleta de amostra



Fonte: A Autora

As amostras foram coletadas de cada um dos pontos em frasco de vidro estéril, em média 200 mL ou mais, de acordo com o acesso ao efluente. Para auxílio na coleta utilizou-se uma corda, conforme Figura 12.

Figura 12 – Foto ilustrando a coleta das amostras



Fonte: A Autora

4.2.2 Isolamento e triagem de bactérias resistente aos carbapênemicos (Ágar KPC)

Após a coleta, rapidamente o frasco foi fechado e as amostras foram transportadas para o Laboratório de Pesquisas Microbiológicas em isopor contendo barras de gelos reaproveitáveis. Posteriormente, os efluentes foram semeados quantitativamente em ágar MacConkey – Ionlab (Lote: 0719/0369), com alça de 1 μ l e incubados aerobicamente em 37° C por 24 horas. Após a incubação, com base na morfologia da colônia, as colônias foram classificadas e quantificadas. A Figura 13 ilustra a placa de Ágar MacConkey com diferentes colônias de bactérias Gram-negativas.

Figura 13 – Foto ilustrando placa de Ágar MacConkey com diferentes colônias de bactérias Gram-negativas



Fonte: A Autora

Após contagem e classificação, as colônias isoladas foram semeadas em Ágar cromogênico KPC – Probac (Brasil) e incubadas aerobicamente em 37° C por 24 horas. Conforme instrução de uso, o ágar KPC isola e diferencia os microrganismos com fator de resistência a antibióticos do grupo Carbapenêmicos. A Figura 14 mostra a interpretação e classificação do ágar cromogênico KPC - Probac.

Figura 14 – Interpretação e classificação do ágar cromogênico KPC - Probac

Interpretação dos Resultados:



K. pneumoniae KPC

Crescimento de colônias de coloração azul escuro de *K. pneumoniae* (KPC) resistente à classe de antibióticos Carbapenêmicos.

Cor típica da colônia	Micro-organismo pré-identificado e resistente aos carbapenêmicos
Rosa escuro a Vermelho	<i>E.coli</i>
Azul metálico	<i>Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter spp</i>
Creme, translúcida	<i>Pseudomonas spp</i>
Inibição	Micro-organismos sensíveis aos carbapenêmicos
Inibição	Bactérias Gram positivas
Frequentemente inibidas	Leveduras

Fonte: Bula ÁGAR CROMOGÊNICO KPC – Probac

Após o tempo de incubação, todas as colônias suspeitas de resistência aos Carbapenêmicos foram purificadas e armazenadas em caldo BHI com glicerol a 15% (CASTRO *et al.*, 2020).

4.2.3 Teste de suscetibilidade frente aos carbapenêmicos

Posteriormente, as colônias isoladas foram triadas para a produção de Carbapenemase, de acordo com a padronização do Comitê Brasileiro de Testes de Sensibilidade aos Antimicrobianos (BrCAST, 2018). O Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos (TSA) foi realizado pela técnica de disco difusão de Kirby-Bauer (BAUER *et al.*, 1966), com 145 isolados com possível probabilidade de ser produtor de carbapenemase, de acordo com item 4.2.2.

Segundo BrCAST, 2018 os valores de corte apropriados para a detecção de possíveis produtores de carbapenemase, em diâmetro do halo de inibição (mm) com discos de 10 µg, é de <28 mm para Meropenem e <25 mm para Ertapenem.

Para a triagem foi preparado o ágar Mueller Hinton (Ionlab – Brasil) de acordo com as instruções do fabricante. De início, os isolados foram descongelados e semeados pela técnica do esgotamento em ágar Müller-Hinton (MH), sendo incubados à temperatura de 35°C. Esse processo foi realizado com finalidade de obter colônias isoladas, para produção de uma suspensão bacteriana, em salina, com turbidez de 0,5 da escala de McFarland.

Foram utilizadas colônias morfológicamente similares, e a inoculação se deu por meio de uma alça estéril. A suspensão foi utilizada para semear o ágar MH por meio de um *swab* de algodão estéril. O *swab* foi pressionado contra a parede do tubo antes da semeadura para retirada do excesso de inoculante. A inoculação do ágar se deu uniformemente em três direções em placas circulares de 90 mm em temperatura ambiente e com inóculo produzido até 15 minutos antes do procedimento. Conforme instruções para o teste de suscetibilidade bacteriana pela técnica de disco difusão em ágar de acordo com a padronização do Comitê Brasileiro de Avaliação de Suscetibilidade Antimicrobiana (BrCAST, 2021).

Nas placas semeadas foram dispostos os discos de Meropenem e Ertapenem 10 µg (SENSIFAR – BRASIL), com os discos em temperatura ambiente e até 15 minutos após a inoculação. Os discos foram dispostos de modo a evitar interferência

entre antimicrobianos e sobreposição de halos. Para incubação, as placas foram dispostas invertidas em estufa a 35 °C por 24 horas em ambiente aeróbio.

Após a incubação, com uma régua calibrada, os diâmetros dos halos de inibição foram aferidos e registrados. Posteriormente, estes dados foram interpretados com base no documento Orientações do EUCAST para a detecção de mecanismos de resistência e resistências específicas de importância clínica e/ou epidemiológica do BrCast (2018).

As colônias com critérios de para a produção de carbapenemase foram submetidas a teste de detecção fenotípica conforme item a seguir (BrCAST, 2018).

4.2.4 Teste fenotípico para detecção de carbapenemase

Para detecção fenotípica de carbapenemase foi utilizado o método de inativação de carbapenêmico modificado (mCIM) e EDTA-CIM (eCIM), segundo CLSI (2018), PIERCE *et al.*, 2017 e TSAI *et al.*, 2020. O método de mCIM é apenas para *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonas aeruginosa*, e o método mCIM e eCIM *Enterobacteriaceae* apenas para identificar especificamente metalo-carbapenemases.

O ágar Mueller Hinton - MH (Ionlab – Brasil) e caldo TSB (Tryptic soy broth – KASVI – Brasil) foram preparados de acordo com as instruções do fabricante. Usando uma alça de inoculação estéril, 1 µl da colônia bacteriana a ser testada foi inoculada em um tubo contendo 2 mL de caldo TSB (Tubo 1). Em um segundo tubo contendo 20 µl de EDTA 0,5M (Sigma-Aldrich – EUA) e 2 mL de caldo TSB (Tubo 2), também foi inoculado 1 µl da colônia bacteriana a ser testada.

Após a inoculação a suspensão bacteriana foi agitada em vortex por 10 a 15 segundos. Em seguida, um disco de Meropenem 10 µg foi adicionado assepticamente à suspensão bacteriana dos dois tubos. Os tubos foram então incubados por 4 horas a 35°C. Antes da conclusão da etapa de inativação do carbapenêmico de 4 horas, uma suspensão da bactéria indicadora do mCIM (*Escherichia coli* ATCC 25922, uma cepa suscetível a carbapenem) com turbidez equivalente a um padrão de McFarland 0,5 foi preparada e inoculada a superfície de uma placa de ágar MH, de acordo com o método de disco-difusão (BrCAST, 2021).

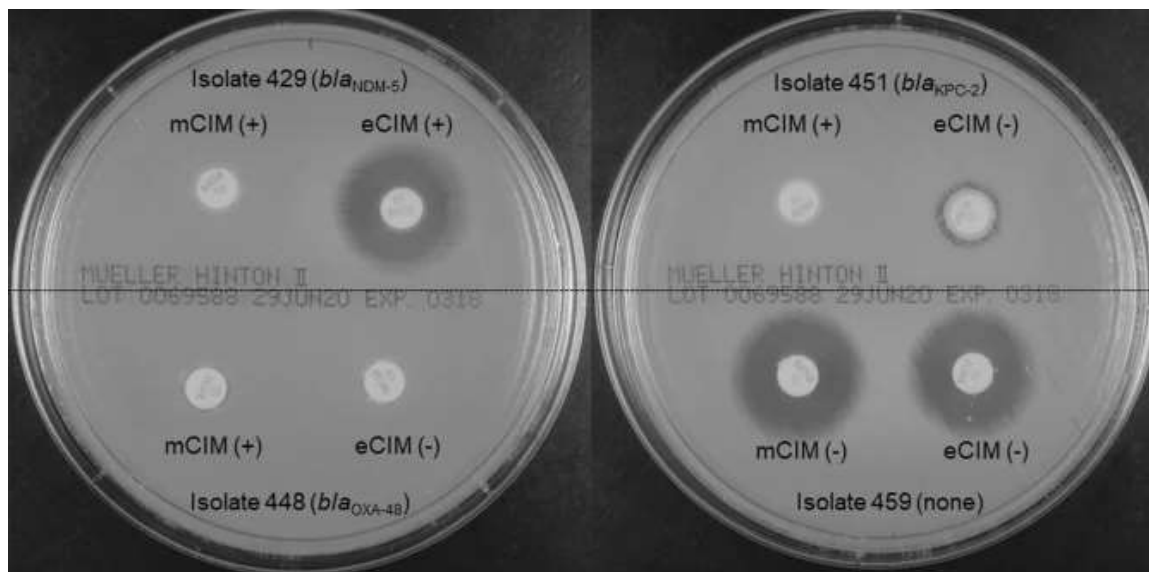
Finalizada a incubação dos dois tubos, o disco de Meropenem foi então removido da suspensão bacteriana de TSB usando uma alça de inoculação de 10 µl, a alça foi arrastada na borda do tubo durante a remoção para remover o excesso de

líquido, e o disco foi colocado na placa de ágar MH inoculada, e assim foi incubada em posição invertida por 24 horas a 35°C.

Os resultados de mCIM e eCIM foram interpretados da seguinte forma: o mCIM é considerado negativo se o tamanho do halo formado for ≥ 19 mm, o isolado do teste não produz carbapenemase, o meropenem no disco não é hidrolisado e inibe o crescimento da *E. coli* ATCC 25922 sensível ao meropenem. Carbapenemase positivo se o tamanho do halo for de 6 a 15 mm, ou intermediário (definido como positivo) se houver colônias presentes dentro do halo de 16 a 18 mm, o isolado produz carbapenemase, o meropenem no disco é hidrolisado e não haverá inibição ou inibição limitada do crescimento da *E. coli* ATCC 25922 sensível ao meropenem (CLSI, 2018).

O teste de eCIM foi interpretado apenas quando o teste mCIM for positivo. Metallo- β -lactamase positivo quando há um aumento de ≥ 5 mm no diâmetro do halo para eCIM em comparação ao diâmetro da zona para o mCIM. O isolado produz uma metallo- β -lactamase, no qual a atividade da carbapenemase é inibida na presença do EDTA de modo que o Meropenem no disco não seja hidrolisado tão eficientemente quanto no tubo sem EDTA. Metallo- β -lactamase negativo quando há um aumento ≤ 4 mm no diâmetro do halo para eCIM em comparação ao diâmetro da zona para o mCIM (CLSI, 2018). A Figura 15 e 16 ilustra a interpretação do teste mCIM e eCIM. E a Figura 17 ilustra o resumo do processamento das amostras.

Figura 15 – Figura demonstrando interpretação do teste mCIM e eCIM



Legenda: Interpretação de testes mCIM e eCIM de 4 isolados clínicos de *K. pneumoniae*. O isolado 459 foi negativo para carbapenemase; 429 positivo para metalo- β -lactamase (*bla*_{NDM-5}); 448 positivo para serina carbapenemase (*bla*_{OXA-48}) e 451 positivo para serina carbapenemase (*bla*_{KPC-2}).

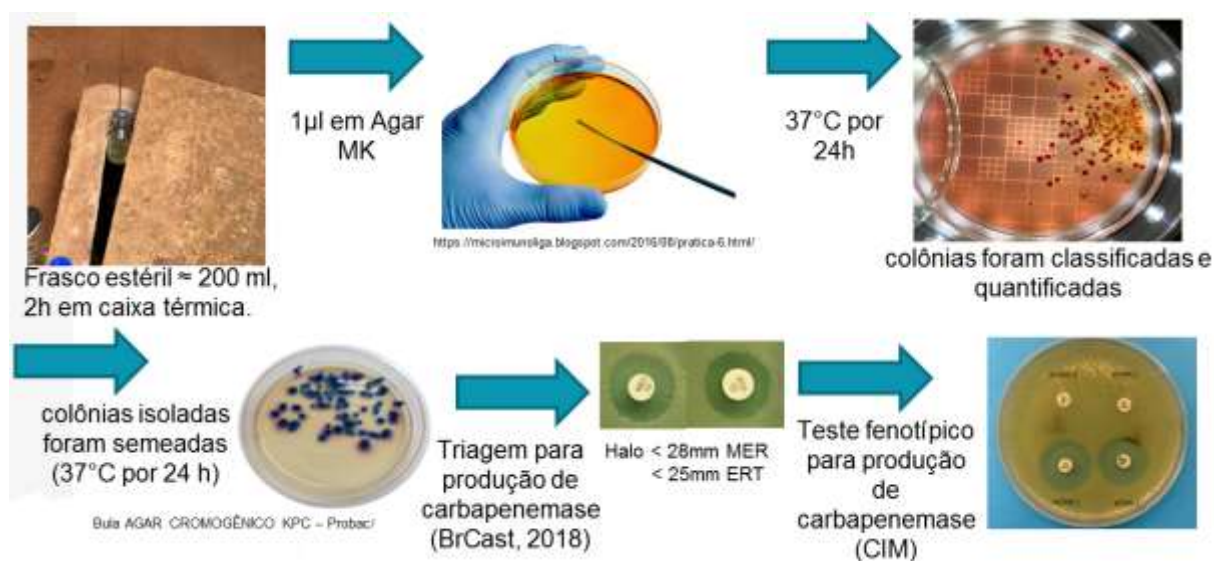
Fonte: TSAI *et al.*, 2020.

Figura 16 – Foto ilustrando resultado e interpretação da detecção fenotípica de carbapenemase



Fonte: A autora.

Figura 17 – Esquema ilustrando resumo do processamento das amostras



Fonte: A autora.

4.2.5 Teste genotípico para detecção do gene *blaKPC*

Para a detecção dos genes de carbapenemase as técnicas baseadas em DNA são as mais confiáveis e precisas do que outras técnicas para detectar ERC (HRABAK; CHUDACKOVA; PAPAGIANNITSIS, 2014). A reação da cadeia da polimerase (PCR), técnicas baseadas em hibridização e sequenciamento do genoma completo são os métodos de detecção molecular usados para identificar a ERC. A PCR convencional ou em tempo real são métodos mais comuns para usar a amplificação de ácidos nucleicos para identificar carbapenemases e foram os métodos utilizados neste estudo (EUCAST, 2017).

O DNA bacteriano para as técnicas de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi extraído pelo método *in house*, conforme procedimento descrito no Anexo 3. Após a extração para conferência foi realizado eletroforese em gel de ágarose 1%. A extração do DNA foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular/FAMED da UFMS.

O gene codificador de resistência *blaKPC* foi pesquisado pela técnica de PCR simples, utilizando primers e condições de reação descritos por Monteiro (2009) e Remya, Shanthi, Sekar (2018). Em cabine de segurança biológica, foi preparada uma solução mãe para cada um dos genes a serem pesquisados. Para a pesquisa dos genes, a solução mãe foi preparada com 0,75 µL de cada um dos primers, 12,5

μL de PCR Master MIX Promega 2x (Promega Corporation, Madison, WI, EUA), 7,25 μL de água ultrapura e 1,25 μL de DMSO 5%.

Os primers utilizados para a amplificação do gene *blaKPC* foram: forward 5'-TGTCAGTGTATCGCCGTC-3'; reverse 5'-CTCAGTGCTCTACAGAAAACC-3'. Após preparada a solução mãe, foram distribuídos 22,5 μL em microtubos de 200 μL. Adicionou-se 2,5 μL do sobrenadante contendo o DNA de cada amostra. Todos os microtubos foram devidamente identificados. O volume final para a reação foi de 25 μL. A reação de amplificação do DNA foi realizada em termociclador (Veriti 96-Well Fast Thermal Cycler, Thermo Fisher Scientific, EUA) com condições específicas para o gene.

As condições de reação foram: desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos, seguido por 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 25 segundos, anelamento a 56 °C por 40 segundos e extensão a 72 °C por 50 segundos. Após os ciclos, uma última etapa de extensão a 72 °C por 6 minutos. A revelação do produto amplificado foi feita por eletroforese em gel de ágarose (Invitrogen - Thermo Fisher Scientific, EUA) a 2% corado com Gel Red® (Biotium, Hayward, EUA). A visualização do gel foi feita sob luz ultravioleta em transiluminador (BIO-RAD - ChemicDoc XRS). Para o controle positivo, foram utilizadas cepas caracterizadas como produtoras dos genes *blaKPC*. Para o controle negativo, uma alíquota da solução mãe foi utilizada. A detecção molecular dos genes de resistência foi realizada no laboratório de Biologia Molecular/FAMED da UFMS.

4.2.6 Identificação bacteriana e teste de suscetibilidade aos antimicrobianos

A identificação e a suscetibilidade antimicrobiana foram realizadas pelo sistema automatizado Vitek 2 compact system (bioMérieux, Marcy L'Etoile, France) seguindo os protocolos do BrCast, 2021. Os antibióticos testados utilizando o cartão AST-409 do Vitek 2 foram: Meropenem, Imipenem, Ertapenem, Amicacina, Amoxicilina/Ácido clavulânico, Aztreonam, Ceftazidima, Cefepime, Ceftriaxona, Ciprofloxacino, Piperacilina/Tazobactam, Gentamicina, Ceftazidima/Avibactam e Ceftolozone/Tazobactam.

4.3 Organização e análise dos dados

Para as análises estatísticas, as variáveis categóricas foram expressas em termos de frequência relativa e absoluta e as variáveis numéricas em termos de médias e desvio padrão para aquelas que apresentaram distribuição normal e mediana, primeiro e terceiro quartis para aquelas que não apresentaram distribuição normal. A normalidade da distribuição das variáveis numéricas foi verificada pelo teste Kolmogorov-Smirnov.

Para verificar a hipótese de associação entre as variáveis numéricas, aplicou-se o teste Kruskal-Wallis e post teste de Dunn. Para verificar a hipótese de associação entre variáveis categóricas, aplicou-se o teste Chi-quadrado de Pearson ou teste Exato de Fisher, quando indicado. Para todas as análises foi adotado o nível de significância de 0,05.

A análise estatística foi realizada utilizando o R (versão 4.1.1) usando a interface RStudio (R Core Team, 2021). O pacote ggplot2 R foi usado para desenvolver gráficos (WICKHAM, 2014).

4.4 Aspectos éticos

Este projeto foi aprovado pela Gerência de Ensino e Pesquisa do Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian- HUMAP (Resolução nº 48, de 21 de Julho de 2021 - Anexo 1) e foi aprovado pela Concessionária dos Serviços Públicos de Abastecimento de Água Potável e de Esgotamento Sanitário do Município de Campo Grande (MS) – Águas Guariroba (Protocolo n. 2082/2021 - Anexo 2).

Por ser um estudo que não envolve diretamente seres humanos, este projeto não foi enviado ao Comitê de Ética em Pesquisa da UFMS.

5 RESULTADOS

Entre setembro de 2021 a fevereiro de 2022 foram coletadas 84 amostras de efluentes na cidade de Campo Grande – MS, sendo 42 (50%) amostras hospitalares e 42 (50%) não hospitalares (Tabela 3). Em 84 amostras de efluentes foram isoladas um total de 7.299×10^3 unidades formadoras de colônias (UFC)/ml, com uma mediana de 2,5 a 19×10^3 UFC/ml de bactérias Gram-negativas (BGN) por amostra coletada. Houve uma equivalência com o número de UFC em amostras de efluentes

hospitalares (n=3633) e efluentes não hospitalares (n=3666). Ao aplicar teste de Kolmogorov-Smirnov para avaliar a normalidade dos dados, foi encontrado um valor- $p < 0,001$, apontando para uma não-normalidade na amostra. Portanto foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para avaliar as diferenças entre os grupos. Os resultados são demonstrados na Tabela 3.

Tabela 3 – Número de UFC/ml de bactérias Gram-negativas isolados de efluentes em diferentes locais de coleta. Campo Grande– MS, 2021-2022

Local de coleta do efluente	UFC/ml de efluente (n=7.299 x 10 ³)			P-valor*
	N (x 10 ³)	Mediana	1º e 3º quartil	
Ambiente Hospitalar				
Unidade coronariana; Clínica médica; Pediatria e Unidade de Terapia Intensiva	951	15,0	(4,75 - 25,26)	
Pronto Atendimento Médico	205	7,5	(4,00 - 19,76)	
Clínica Cirúrgica	732	14,0	(3,00 - 30,00)	
Unidade de ginecologia e obstetrícia	355	13,0	(8,00 - 28,76)	
Saída do efluente do Hospital	1330	10,5	(5,76 - 18,00)	
Central de Esterilização de Materiais	60	6,0	(2,26 - 7,0)	
Ambiente Não-Hospitalar				
Odontologia	537	19,0	(4,50 - 40,00)	<0,001
Laboratório de Análises Clínicas Hospitalar	489	12,0	(5,00 - 25,00)	
Córrego Anhanduí	137	2,5	(1,00 - 6,50)	
Centro da cidade	315	4,0	(9,00 - 15,00)	
Bairro Moreninha	1445	16,0	(7,75 - 45,01)	
Indústria da região	682	18,0	(10,0 - 26,0)	
Reitoria da Universidade	51	3,0	(1,76 - 6,01)	

*Teste de Kruskal Wallis.

A Tabela 3 compara a mediana de UFC/ml de BGN encontrado nas unidades de coleta. O maior número de UFC observada nas amostras abrangendo a área hospitalar foi na saída do hospital. Entretanto, um ponto externo (bairro) obteve quantidade ainda maior (n=1445), provável por ser muito populoso. Dentro das unidades hospitalares o menor número de colônias isoladas foi encontrado na Central de Esterilização de Materiais (CEM) e no Pronto Atendimento Médico (PAM).

Dos pontos não hospitalares as menores quantidades de UFC foram observadas na Reitoria e Córrego Anhanduí. Quando comparadas todas as unidades, observou-se diferença estatística significativa (<0,001).

A fim de identificar quais grupos específicos eram diferentes, foi realizado o teste de Dunn com correção de Bonferroni. Essa comparação é representada na Tabela 4.

Tabela 4 - Resultados do Teste de Dunn para comparação múltipla após o Teste de Kruskal-Wallis demonstrando diferenças no número de UFC/ml de BGN por unidade de coleta. Campo Grande- MS, 2021-2022

	Bairro Moreninha	CEM	Centro da cidade	Clínica Cirúrgica	Córrego Anhanduí	Unidade de Terapia Intensiva	Indústria da região	Laboratório	Odontologia	Pronto Atendimento Médico	Reitoria da Universidade	Saída do efluente do Hospital	Bairro Moreninha	Unidade de ginecologia e obstetrícia
CME	0,001*													
Centro da cidade	0,024*	0,088												
Clínica Cirúrgica	0,065	0,027*	0,277											
Córrego Anhanduí	0,000*	0,342	0,014*	0,001*										
Unidade de Terapia Intensiva	0,107	0,023*	0,231	0,425	0,001*									
Indústria da região	0,351	0,002*	0,043	0,114	0,000*	0,175								
Laboratório	0,088	0,018*	0,217	0,422	0,001*	0,496	0,151							
Odontologia	0,170	0,008*	0,126	0,276	0,000*	0,358	0,270	0,341						
Pronto Atendimento Médico	0,017*	0,117	0,432	0,223	0,025*	0,185	0,031*	0,170	0,095					
Reitoria da Universidade	0,000*	0,281	0,018*	0,003*	0,394	0,003*	0,000*	0,001*	0,001*	0,028				
Saída do efluente do Hospital	0,046	0,028	0,298	0,461	0,001*	0,386	0,084	0,379	0,233	0,237	0,003*			
Bairro Moreninha	0,026	0,057	0,427	0,330	0,005*	0,273	0,049	0,259	0,149	0,358	0,009*	0,367		
Unidade de ginecologia e obstetrícia	0,079	0,017*	0,219	0,431	0,000*	0,486	0,138	0,490	0,328	0,171	0,002*	0,289	0,637	

*Resultados com diferenças significativas

No teste de triagem de bactérias resistente aos carbapenêmicos (Ágar cromogênico KPC) houve crescimento de 145 BGN com provável resistência a esses antimicrobianos. Entre essas, 78 foram isoladas de efluentes hospitalares e 67 de não hospitalares. Cento e dezoito colônias (n=81%) pertenciam à família *Enterobacteriaceae* e 27 colônias (n=19%) eram de bacilos Gram-negativos não fermentadores. A Tabela 5 mostra a distribuição e frequência das bactérias de acordo com o local de coleta.

Tabela 5 - Distribuição e frequência de bactérias Gram-negativas com resistência a carbapenêmicos (ágar cromogênico KPC, Probac) de acordo com local de coleta. Campo Grande-MS, 2021-2022

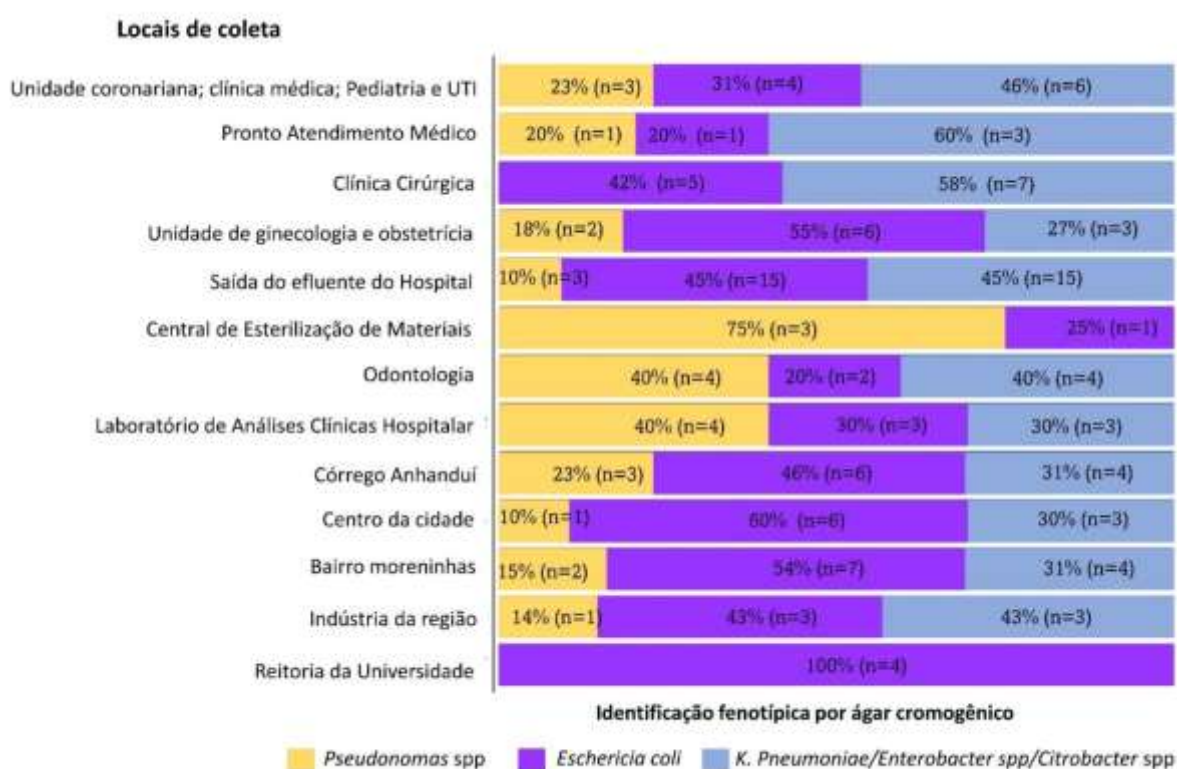
Bactérias	Provável resistência a carbapenêmicos (N=145)					
			Não		Sim	
	N	%	N	%	N	%
Não hospitalar	67	100%	51	76,10%	16	23,90%
<i>Escherichia coli</i>	31	46,3 %	25	49,0 %	6	37,5 %
<i>K. pneumoniae/Enterobacter spp/Citrobacter spp</i>	21	31,3 %	17	33,3 %	4	25,0 %
<i>Pseudomonas spp</i>	15	22,4 %	9	17,6 %	6	37,5 %
Hospitalar	78	100%	46	59%	32	41%
<i>Escherichia coli</i>	32	41,0 %	25	54,3 %	7	21,9 %
<i>K. pneumoniae/Enterobacter spp/Citrobacter spp</i>	34	43,6 %	17	37,0 %	17	53,1 %
<i>Pseudomonas spp</i>	12	15,4 %	4	8,7 %	8	25,0 %

Nas amostras hospitalares isolou-se maior quantidade de colônias resistentes (41%) do que em amostras de origem não hospitalar (23,9%). No ágar cromogênico, colônias azuis sugestivas de pertencerem aos gêneros *K. pneumoniae*, *Enterobacter* spp e *Citrobacter* spp foram observadas em maior número (n=17) do que *Escherichia coli* (colônia vermelha, n=7) e *Pseudomonas* spp (colônia creme, n=8).

A Figura 18 ilustra a identificação fenotípica obtida no ágar cromogênico (KPC - Probac), por ponto de coleta. Apenas 4 pontos não tiveram uma distribuição homogênea entre as identificações. O ponto não hospitalar da Reitoria da Universidade apresentou pouco crescimento bacteriano e 100% de *E. coli*. Do ponto hospitalar da Central de esterilização de materiais (CEM) observou-se reduzido

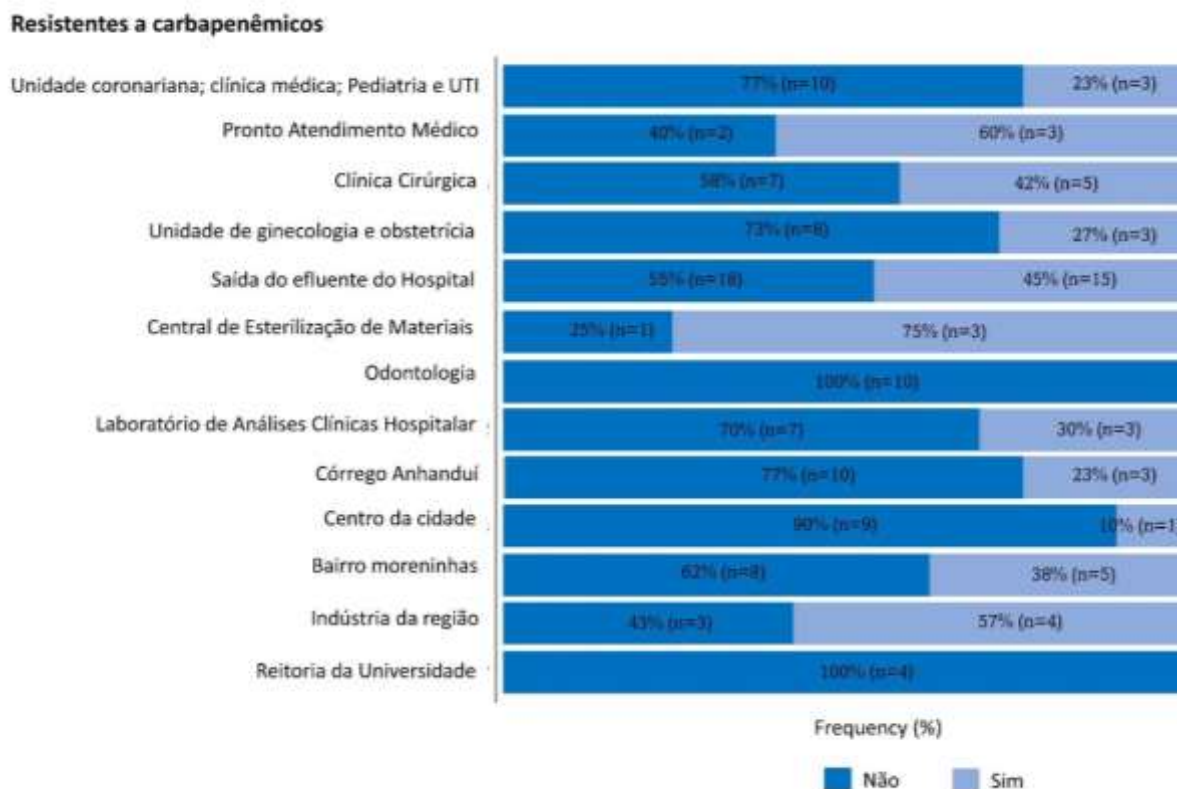
número de colônias de *E. coli* e *Pseudomonas* sp. Em amostras da enfermaria de Clínica Cirúrgica não apresentou crescimento de colônias bacilos Gram-negativos não fermentadores e no Pronto Atendimento Médico foram isoladas maior número de colônias sugestivas de *K. pneumoniae/Enterobacter/Citrobacter* spp.

Figura 18 - Identificação fenotípica e frequência relativa dos isolados, segundo local de coleta. Campo Grande-MS, 2021-2022



No teste de suscetibilidade frente por disco difusão, 32% (n=48) das bactérias testadas apresentaram resistência ao antibiótico ertapenem e/ou meropenem. Na Figura 19 estão apresentados os resultados do perfil de resistência por local de coleta.

Figura 19 - Suscetibilidade de bactérias Gram-negativas aos antibióticos carbapenêmicos (meropenem e/ou ertapenem) isoladas de efluentes hospitalar e não hospitalar, segundo local de coleta. Campo Grande, 2021- 2022



Nos locais de coleta não hospitalares Odontologia e Reitoria da Universidade não foram isoladas BGN resistentes a carbapenêmicos. Entre os pontos não hospitalares a maior quantidade de microrganismos resistentes foi observada na indústria da região. Entre as amostras hospitalares a CEM devido à pequena quantidade de colônias apresentou 75% (n=3) de resistência, superior aos demais locais.

No teste fenotípico para a produção de carbapenemase pelo método de inativação de carbapenêmico modificado (mCIM) 33% (n=16) dos BGN foram positivas para a classe A ou D de Ambler. A Tabela 6 mostra a distribuição e frequência das amostras com resultado positivo para o teste realizado.

Tabela 6 - Distribuição e frequência de amostras positivas para o teste de inativação de carbapenêmico modificado (mCIM). Campo Grande-MS, 2021-2022

Microrganismo (n=48)	mCIM				P-valor*
	Negativo		Positivo (classe A ou D)		
	N	%	N	%	
<i>Pseudomonas</i> spp	14	100	0	0,00	
<i>Escherichia coli</i>	9	69,2	4	30,8	<0,001
<i>K. pneumoniae/Enterobacter</i> spp/ <i>Citrobacter</i> spp	9	42,8	12	48,2	

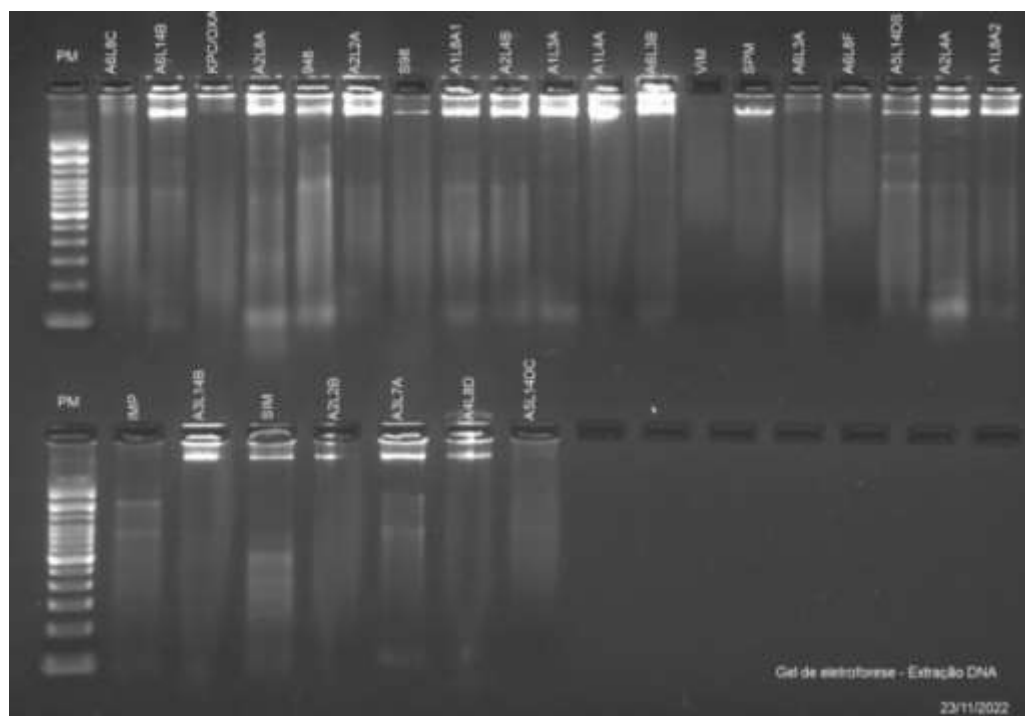
*Teste Exato de Fisher

Não observamos nenhuma bactéria não fermentadora com resultado positivo para o teste fenotípico e bactérias dos gêneros *K. pneumoniae/Enterobacter* spp/*Citrobacter* spp apresentaram maior de carbapenemase do tipo classe A ou D (serina carbapenemase). Os resultados encontrados possuem diferença significativa (p-valor <0,001).

Este resultado sugere que existe uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos de microrganismos em termos de inativação do carbapenêmico. Mas especificamente, a probabilidade de que as diferenças observadas sejam devido ao acaso é extremamente baixa (menor que 0,05), indicando uma forte evidência de uma relação dependente entre o tipo de microrganismo e a inativação do carbapenêmico. Portanto, podemos inferir que o fenômeno de inativação do carbapenêmico não é uniformemente distribuído entre os diferentes microrganismos examinados neste estudo.

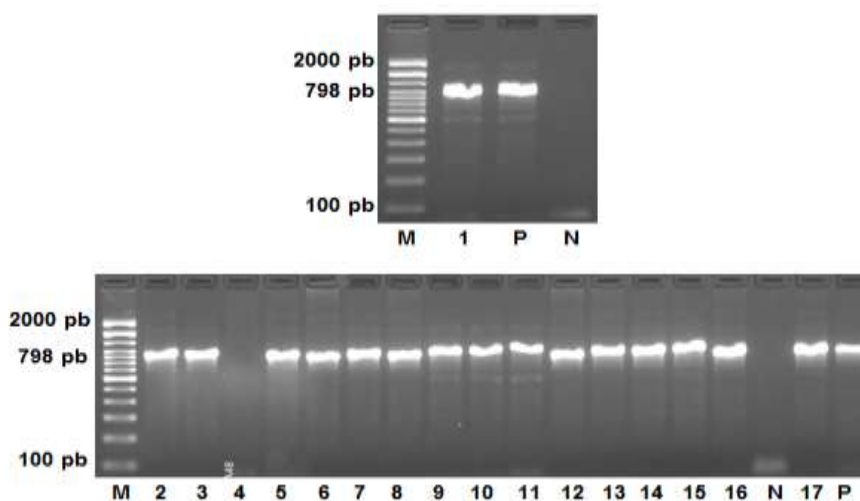
A produção de carbapenemase foi confirmada pela detecção do gene *blaKPC* nas 16 amostras que foram positivas no método de inativação de carbapenêmico modificado (mCIM). Todas as 16 bactérias com o gene *blaKPC* foram provenientes de ambiente hospitalar sendo: 8 (50%) Saída total do efluente hospitalar, 3 (19%) Pronto atendimento médico, 3 (19%) Clínica Cirúrgica, 2 (13%) Unidade coronariana; Enfermaria de clínica médica; Enfermaria pediátrica e Unidade de Terapia Intensiva. As Figuras 20 e 21 ilustram o resultado do teste genotípico.

Figura 20 – Foto ilustrando a extração do DNA das bactérias positivas no teste fenotípico



Fonte: A autora

Figura 21 – Foto ilustrando o resultado da técnica de PCR simples utilizada para detectar o gene de resistência *blaKPC*. Campo Grande-MS, 2021-2022



Legenda: M: marcador de peso molecular; P: Controle positivo; N: Controle negativo; Bandas 1-17: amostras testadas. *blaKPC*: 798 pb.

Fonte: A autora

Das 16 bactérias hospitalares que apresentaram carbapenemases do tipo KPC, fez-se a identificação em nível de gênero e espécie, sendo: 5 (31%) *Klebsiella*

pneumoniae ssp pneumoniae; 4 (25%) *Enterobacter cloacae complex*; 2 (12%) *Klebsiella pneumoniae ssp ozaenae*; 2 (12%) de *Klebsiella oxytoca*; 2 (12%) de *Citrobacter farmeri* e 1 (6%) de *Kluyvera intermedia*.

No teste de suscetibilidade aos antimicrobianos (painel Vitek 2, número 409) todas as 16 (100%) das bactérias foram consideradas multidrogas resistentes (MDR), 11 (69%) XDR e 2 (12%) de PAN resistentes. As Tabelas 7 e 8 mostram a identificação automatizada e o perfil de resistência das bactérias.

Tabela 7 – Perfil de resistência antimicrobiana de 16 bacilos Gram-negativos isoladas de efluentes hospitalares de acordo com a detecção de carbapenemase e do gene *blaKPC*. Campo Grande-MS, 2021-2022

Data coleta	Local	Identificação no Vitek	Meropenem	Imipenem	Ertapenem	Amicacina	Amoxicilina/ácido clavulânico	Aztreonam	Ceftazidima	Cefepime	Ceftriaxona	Ciprofloxacino	Piperacilina/Tazobactam	Gentamicina	Ceftazidima/Avibactam	Ceftolozane/Tazobactam	Fenótipo de resistência
08/09/2021	PAM	<i>Enterobacter cloacae</i> complex	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	MDR/XDR
08/09/2021	Clínica Cirúrgica	<i>Enterobacter cloacae</i> complex	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	MDR/XDR
08/09/2021	Saída do efluente do hospital	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp <i>pneumoniae</i>	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Sensível	Resistente	MDR/XDR
08/09/2021	Saída do efluente do hospital	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp <i>ozaenae</i>	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Sensível	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Sensível	Resistente	MDR/XDR
29/10/2021	UCO/EMP/UTI	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Sensível	Resistente	Sensível	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	MDR
29/10/2021	UCO/EMP/UTI	<i>Citrobacter farmeri</i>	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Sensível	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Sensível	Resistente	MDR
29/10/2021	Clínica Cirurgia	<i>Kluyvera intermedia</i>	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Sensível	Resistente	MDR/XDR
29/10/2021	Clínica Cirurgia	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp <i>ozaenae</i>	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Sensível	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Sensível	Resistente	MDR
19/11/2021	Saída do efluente do hospital	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp <i>pneumoniae</i>	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Sensível	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Sensível	Resistente	MDR
03/12/2021	Saída do efluente do hospital	<i>Citrobacter farmeri</i>	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Sensível	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Sensível	Resistente	MDR/XDR
07/01/2022	Saída do efluente do hospital	<i>Enterobacter cloacae</i> complex	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Sensível	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Sensível	Resistente	MDR/XDR
11/02/2022	PAM	<i>Enterobacter cloacae</i> complex	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Sensível	Resistente	MDR/XDR
11/02/2022	PAM	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp <i>pneumoniae</i>	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	MDR/XDR/PAN
11/02/2022	Saída do efluente do hospital	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp <i>pneumoniae</i>	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Sensível	Resistente	Resistente	MDR/XDR
11/02/2022	Saída do efluente do hospital	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	MDR/XDR/PAN
11/02/2022	Saída do efluente do hospital	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp <i>pneumoniae</i>	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Sensível	Resistente	Sensível	Resistente	Sensível	Resistente	Resistente	Sensível	Resistente	MDR

Legenda: PAM – Pronto atendimento médico. UCO/EMP/UTI – Unidade coronariana/Enfermaria clínica médica e Enfermaria Pediatria/Unidade terapia intensiva. MDR – Multirresistente. XDR – Resistência-extensa. PAN – Pan resistente.

Tabela 8 – Perfil de resistência antimicrobiana de 16 bacilos Gram-negativos de acordo com a detecção de carbapenemase e do gene *blaKPC*. Campo Grande MS, 2021-2022

<i>Nº do perfil de resistência</i>	<i>Perfil de resistência antimicrobiana</i>	<i>Nº de antimicrobianos</i>	<i>Nº de cepas (%)</i>	<i>Produção de KPC pelo mCIM</i>	<i>Presença de blaKPC</i>
1	AMI/AMO/PIT/CAZ/CTX/C-T/CPM/AZT/ERT/MER/GEN/CIP	12	2	Positivo classe* A ou D	Sim
2	AMO/PIT/CAZ/CTX/CZA/C-T/CPM/AZT/ERT/MER/GEN/CIP	12	3	Positivo classe* A ou D	Sim
3	AMO/PIT/CAZ/CTX/C-T/CPM/AZT/ERT/MER/GEN/CIP	11	3	Positivo classe* A ou D	Sim
4	AMO/PIT/CAZ/CTX/C-T/CPM/AZT/ERT/MER/CIP	10	1	Positivo classe* A ou D	Sim
5	AMO/PIT/CTX/CPM/AZT/ERT/MER/GEN/CIP	9	1	Positivo classe* A ou D	Sim
6	AMO/PIT/CTX/C-T/AZT/ERT/MER/GEN/CIP	9	1	Positivo classe* A ou D	Sim
7	AMO/PIT/CTX/AZT/ERT/MER/GEN/CIP	8	1	Positivo classe* A ou D	Sim
8	AMO/PIT/CAZ/CTX/C-T/AZT/ERT/MER	8	2	Positivo classe* A ou D	Sim
9	AMO/PIT/CAZ/CTX/C-T/ERT/MER/GEN	8	1	Positivo classe* A ou D	Sim
10	AMO/PIT/CTX/ERT/MER/GEN	6	1	Positivo classe* A ou D	Sim

Legenda: AMI – Amicacina, AMO – Amoxicilina/Ácido clavulânico, PIT – Piperacilina/Tazobactam, CAZ – Ceftazidima, CTX – Ceftriaxona, CZA – Ceftazidima/Avibactam, C-T – Ceftolozane/Tazobactam, CPM – Cefepime, AZT – Aztreonam, ERT – Ertapenem, MER – Meropenem, GEN – Gentamicina, CIP – Ciprofloxacina. KPC – *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase. mCIM - método de inativação de carbapenêmico modificado. *classe de Ambler

6 DISCUSSÃO

A pesquisa de enterobactérias neste estudo foi motivada por ser um grupo de bactérias comum em efluentes hospitalares e não hospitalares (BARTLEY *et al.*, 2019; CAHILL, *et al.*, 2019; CHAGAS *et al.*, 2011; CONTE *et al.*, 2022; LIEN *et al.*, 2017; THAMLIKITKUL *et al.*, 2019).

A origem de *Enterobacteriaceae* potencialmente patogênicas nos efluentes hospitalares deve-se ao fato destas estarem presentes no ambiente hospitalar como em roupas, utensílios, mobiliários, camas e colchões, pisos, banheiros, pias, descarte inadequado de soluções, fluídos e secreções.

Infecções causadas por enterobactérias, produtoras de carbapenemases, representam uma crescente ameaça para a saúde humana devido às limitadas opções de tratamento disponíveis. Recentemente, grande ênfase foi colocada no conceito *One Health* que mostra a indissociável relação da saúde humana, dos animais e do meio ambiente e a importância dessa relação na transmissão, persistência e disseminação de bactérias resistentes aos antibióticos (CAHILL *et al.*, 2019). Microrganismos multidroga resistentes são classificados como prioridade alta pela Organização Mundial de Saúde (OMS, 2017).

Apesar do encontro de microrganismos em efluentes ser um fato comum, pouco se sabe, sobre a existência e a disseminação de bactérias multidrogas resistentes de efluentes hospitalares e não hospitalares (CHAGAS *et al.*, 2011; CONTE *et al.*, 2022; MAGALHÃES *et al.*, 2016; PICÃO *et al.*, 2013; PRADO *et al.*, 2008; SANTORO *et al.*, 2015).

Bactérias Gram-negativas MDR já foram descritas em amostras ambientais de muitos lugares, como no continente europeu (HRENOVIC *et al.*, 2016; HUBENY *et al.*, 2022), na África (MOGES *et al.*, 2014), no Japão (TANAKA *et al.*, 2019) e na América Latina (CHAVEZ; CAICEDO; CASTILLO, 2019; JORQUERA *et al.*, 2021).

Após pesquisa realizada na base de dados pubmed com as palavras chaves: “*environment*”; “*resistant*”; “*Gram negative*”; “*bacteria*”; “*brazil*” e “*water*” e uma segunda pesquisa utilizando como palavras chaves: “*environment*”; “*resistant*”; “*Gram negative*”; “*bacteria*”; “*brazil*” e “*effluent*”, constatou-se no Brasil estudos que abordam este tema (CHAGAS *et al.*, 2011; CONTE *et al.*, 2022; MAGALHÃES *et al.*, 2016; PICÃO *et al.*, 2013; PRADO *et al.*, 2008; SANTORO *et al.*, 2015). Bactérias Gram-negativas MDR isoladas de amostras ambientais já foram descritas na Região

Amazônica (FREITAS *et al.*, 2019; MAGALHÃES *et al.*, 2016), no Nordeste (BARTLEY *et al.*, 2019); região Centro Oeste, (RESENDE, 2009) e no Sudeste do Brasil (DOMINGOS *et al.*, 2011; RESENDE *et al.*, 2012; RESENDE *et al.*, 2014).

E até o presente momento, não há nenhum estudo que tenha registrado a presença de bactérias MDR em efluentes da cidade de Campo Grande-MS, nem mesmo no estado do Mato Grosso do Sul. Novos estudos são necessários com maior número de amostras para determinar o impacto ambiental que essas bactérias podem causar.

Na presente investigação foram detectadas bactérias MDR em efluente hospitalar, mas não foram encontradas em efluentes não hospitalares. Este fato pode relacionar-se com o uso extensivo de antimicrobianos no hospital e que podem sair pelos efluentes do mesmo (MORRIS *et al.*, 2016).

A quantidade de unidades formadoras de colônias (UFC) por mL de amostra coletada pode fornecer informação a respeito do grau de contaminação microbiana no efluente e pode variar de um local de coleta para outro. Considerando que não há no Brasil legislação que determine valores de UFC de referência, não dispomos de parâmetros para dizer se as UFC de BGN/ml de amostra coletada encontradas neste estudo são um valor aceitável ou não. Na União Europeia também não há regulamentos específicos sobre resíduos antimicrobianos ou bactérias resistentes aos antibióticos (MORRIS *et al.*, 2016).

Embora o teste de Kruskal-Wallis tenha indicado diferenças entre os grupos, a análise posterior com o teste de Dunn permitiu a identificação de quais pares de grupos especificamente apresentaram diferenças significativas. Isso sugere que as diferenças detectadas nas UFC/placa pelo teste de Kruskal-Wallis não são uniformemente distribuídas entre todos os pares de grupos, mas sim concentradas em determinados pares específicos. Apontando assim para uma variabilidade no crescimento de agentes bacterianos, o que pode ser influenciado por ambiente, temperatura, local (GORDON *et al.*, 2017; MAIER e PEPPER, 2015). Pesquisas futuras são necessárias para analisar essa influência nos efluentes.

Dados da literatura revelam que ambientes com pacientes graves em uso de antibioticoterapia é apontado como um dos fatores para a multirresistência bacteriana (CAMPOS *et al.*, 2017; GARCIA-VIDAL *et al.*, 2018; SANTORO *et al.*, 2020).

Apesar da crescente preocupação com a disseminação de bactérias MDR em efluentes hospitalares pouco é feito para controlar a disseminação dessas bactérias. Normalmente, no tratamento de águas residuais urbanas o principal objetivo é eliminar contaminantes orgânicos e inorgânicos e não eliminação de resíduos de antibióticos ou bactérias resistentes aos antibióticos (MORRIS *et al.*, 2016).

Faz-se importante destacar que a avaliação de resíduos antimicrobianos e BRA é uma prioridade para determinar se há grandes riscos ao meio ambiente e à saúde humana e animal (MORRIS *et al.*, 2016).

No presente estudo, o rastreio das ERC foi possível com a utilização de meio cromogênico seletivo. O uso destes meios em Microbiologia Ambiental, principalmente para a análise de efluente, ainda não é muito difundido (ABRANTES, 2022). Porém, há relatos do uso em pesquisa com efluente hospitalar (CAHILL *et al.*, 2019; HSIAO *et al.*, 2011; HSIAO *et al.*, 2013).

De acordo com estudos prévios, o ágar cromogênico tem sensibilidade e especificidade variando de 40% a 75% e especificidade de 85% a 99%, respectivamente (NORDMANN; GIRLICH; POIREL, 2012; MOUBARECK *et al.*, 2020). Dessa forma, o meio cromogênico pode ser utilizado como teste de triagem para Gram-negativos resistentes aos carbapenêmicos e métodos confirmatórios são necessários. Os métodos moleculares como Xpert Carba-R (análise qualitativa automatizada de PCR) são padrões para identificar produtores de carbapenemases. Porém, são métodos caros, inviáveis para a rotina de um laboratório de pequeno e médio porte (MOUBARECK *et al.*, 2020).

No teste de triagem de bactérias resistente aos carbapenêmicos (Ágar cromogênico KPC) membros da família *Enterobacteriaceae* foram isolados em maior número assim como em outros estudos (CAHILL, *et al.*, 2019, PICÃO *et al.*, 2013, SUZUKI *et al.*, 2020).

A identificação no meio cromogênico não é, de fato, conclusiva. A identificação acurada a nível de espécie só é possível com sistemas automatizados, por espectrometria de massa e técnicas moleculares. Neste estudo a identificação das bactérias MDR foi feita pelo equipamento automatizado Vitek 2 (bioMérieux, Marcy L'Etoile, France). Este sistema é amplamente utilizado em laboratórios de grande porte, incluindo laboratórios de hospitais e de pesquisa. Utiliza cartões plásticos com diversas reações bioquímicas que permitem a identificação e a determinação da suscetibilidade do microrganismo de forma padronizada, rápida e

segura (ABRANTES, 2022; JORGENSEN, PFALLER, CARROLL, 2015; KONEMAN *et al.*, 2018; ZAGUI *et al.*, 2022).

A identificação de subespécies (ssp) não é possível por meio de testes convencionais. As bactérias identificadas pelo sistema Vitek 2 foram *Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae*; *Enterobacter cloacae complex*; *Klebsiella pneumoniae ssp ozaenae*; *Klebsiella oxytoca*; *Citrobacter farmeri* e *Kluyvera intermedia*. .

Similar a outros estudos, a espécie *Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae* foi a enterobactéria MDR identificada em maior quantidade (ABRANTES, 2022; CHAGAS *et al.*, 2011; EDA *et al.*, 2021; MOGES *et al.*, 2014; RUIZ, 2010; RESENDE, 2009; SUZUKI *et al.*, 2020; THAMLIKITKUL *et al.*, 2019; ZAGUI, 2019). E similar ao estudo de THAMLIKITKUL *et al.* (2019), amostras coletadas de resíduos de mercados da cidade não foram encontradas *E. coli* e *K. pneumoniae* resistentes a carbapenem, assim como neste estudo não foram observadas ERC em ambientes não hospitalares.

Klebsiella pneumoniae (*K. pneumoniae*) é uma bactéria que reside no trato gastrointestinal. Diante de condições favoráveis, se dissemina para outros sítios, onde atuam como patógeno oportunista. Causa infecções nosocomiais e adquiridas na comunidade, incluindo septicemia, pneumonia e meningite (NAZIR *et al.*, 2020; YAN *et al.*, 2017). É uma das bactérias relacionadas à alta taxa de mortalidade em pacientes imunocomprometidos (LI *et al.*, 2020). Faz-se importante destacar que *K. pneumoniae* MDR é um dos principais patógenos em hospitais do mundo todo (BOUCHER *et al.*, 2009; KARLOWSKY *et al.*, 2017).

Por fazer parte da microbiota intestinal, o isolamento desta bactéria em efluentes urbanos e hospitalares é comum. Este achado corrobora com a frequência de *K. pneumoniae* em instituições que prestam assistência em saúde, assim como nos seus resíduos (PICÃO *et al.*, 2013; NICOLETTI *et al.*, 2015; ZAGUI, 2019; RIBEIRO *et al.*, 2020).

Estudos prévios mostram, por meio de testes moleculares, que uma *Klebsiella pneumoniae* isolada de uma sonda vesical de paciente era geneticamente idêntica a um isolado de águas residuais de uma entrada de estação de tratamento de efluente (RÖDEROVÁ *et al.*, 2016). Essa pesquisa fundamenta que as bactérias identificadas no efluente hospitalar no presente estudo podem se originar de infecções e se disseminar por meio do meio ambiente.

O *Enterobacter* spp., segunda maior quantidade de bactérias identificadas neste estudo, são comensais naturais do animal e microbiota intestinal humana (MESA *et al.*, 2006). Bactérias do complexo *Enterobacter cloacae* (ECC) inclui várias espécies como *E. asburiae*, *E. carcinogenus*, *E. cloacae*, *E. hormaechei*, *E. kobei*, *E. nimipressuralis*, *E. ludwigii* e *E. mori*. Essas são também considerados patógenos oportunistas causadores de infecções associadas à assistência à saúde e a sua resistência aos carbapenêmicos está associada principalmente com a produção de carbapenemase-KPC (ANNAVAJHALA; GOMEZ-SIMMONDS; UHLEMANN, 2019 e CHAVDA *et al.* 2016).

O complexo *Enterobacter cloacae* é frequentemente associado à resistência a múltiplas drogas (MDR), principalmente devido à capacidade de adquirir facilmente numerosos elementos genéticos móveis portadores de genes de resistência (MEZZATESTA *et al.*, 2012). Dados epidemiológicos disponíveis mostram que o ECC se tornou a terceira maior espécie de *Enterobacteriaceae* envolvida em infecções nosocomiais após *Escherichia coli* e *K. pneumoniae* (ZHOU *et al.*, 2018). O ECC foi relatado em vários surtos hospitalares com fenótipo multirresistente, o que tem estimulado o estudo nessas espécies (DAVIN-REGLI, LAVIGNE, PAGÈS, 2019).

Kluyvera intermedia é uma bactéria raramente isolada de amostras clínicas (FARMER *et al.*, 1981; SARRIA, VIDAL, KIMBROUGH, 2001) mas assim como em nosso estudo, já foi isolada em efluente hospitalar (ABRANTES, 2022; PICÃO, 2013).

Neste estudo não foi identificado entre as BGN-MDR, bactérias não fermentadoras (*Pseudomonas aeruginosa* e do complexo *Acinetobacter baumannii*) que são comumente isoladas em ambientes úmidos dentro do hospital (ESMAEILI-FARD-BARZEGAR *et al.*, 2022; GHEORGHE-BARBU *et al.*, 2022; GORDON *et al.*, 2017). Esses achados podem refletir diferenças biológicas em que BGNNF são colonizadores ambientais sobrevivendo em condições de baixo teor de nutrientes, enquanto *Enterobacteriaceae* são predominantemente de origem humana. Esse dado pode justificar a falta de isolamento de BGNNF nos efluentes hospitalares estudados.

Corroborando com estudo de CAHILL *et al.* (2019), os resultados dos testes de suscetibilidade mostraram que as bactérias provenientes de amostras hospitalares apresentaram maior porcentagem de resistência frente aos antibióticos

meropenem e ertapenem do que as amostras não hospitalares. Esse fato ocorre pois o uso em larga escala de antibióticos no ambiente hospitalar contribui para o aumento de resíduos de antibióticos e BRA nos sistemas de águas residuais hospitalares (MORRIS *et al.*, 2016). Bactérias resistentes a carbapenêmicos e MDR já foram descritas em afluente e efluente de estações de tratamento de águas residuais e de unidades hospitalares (CAHILL *et al.*, 2019, SURLEAC *et al.*, 2020, ZAGUI, 2019).

Diferente deste estudo há pesquisas em que bactérias MDR foram relatadas em lagos e córregos (ASFAW *et al.*, 2020; FURLAN *et al.*, 2021; HO *et al.*, 2021; PÉREZ-ETAYO *et al.*, 2020). Isso se torna um grande risco para a população, pois se sabe que a saída da maioria dos esgotos urbanos de hospitais, hotéis e indústrias estão indo diretamente para esses corpos d'água devido à falta de um sistema adequado de gerenciamento de águas residuais. Locais como na Etiópia, em que a cobertura do abastecimento de água potável é fraca e a sociedade utilizam águas não tratada de rios e lagos, a presença de bactérias MDR é uma ameaça direta para as pessoas que usam esses corpos d'água (ASFAW *et al.*, 2020).

A presença de bactérias MDR clinicamente relevantes nos ambientes aquáticos demonstra a necessidade de melhorar a vigilância e tratamentos das águas residuais de matadouros, hospitais e estações de tratamento de esgoto, de forma a minimizar a dispersão de resistências através dos efluentes destas áreas (PÉREZ-ETAYO *et al.*, 2020). Portanto, estudos epidemiológicos são necessários para monitorar bactérias multirresistentes e seus genes de resistência antimicrobiana em ecossistemas aquáticos para determinar possíveis rotas e destinos desses genes (FURLAN *et al.*, 2021).

Dessa forma, o fato de nesta pesquisa não verificarmos a presença de MDR nas amostras do córrego analisado, é um dado relevante para a população que reside próxima deste local.

No estado do Mato Grosso do Sul este é o primeiro estudo que documenta BGN produtoras de carbapenemases em efluente hospitalar. Os resultados desta pesquisa mostram que 50% das bactérias MDR foram isoladas de efluentes que saem do hospital. Entretanto, não foram encontradas bactérias com o mesmo perfil de resistência em efluentes não hospitalares. Para a população em geral, este é um dado positivo pois mostra que o número de bactérias multidrogas resistentes que

saem dos efluentes hospitalares não são suficientemente grandes para serem detectadas em outras regiões da cidade.

Neste estudo, além de bacilos Gram-negativos MDR, foram isoladas enterobactérias consideradas como XDR e até mesmo PAN resistentes. Apesar de pouco conhecidos, outros estudos também descrevem enterobactérias com esses perfis de resistência. Rabbani, Howlader e Kabir (2017) descrevem que todos os isolados de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* isoladas de efluente hospitalar em Bangladesh foram MDR, 61% de *E. coli* e 52% de *K. pneumoniae* eram XDR e um isolado de *E. coli* foi considerado PAN resistente.

A rápida transferência horizontal dos genes de resistência e da aquisição de elementos genéticos móveis observados em bacilos Gram-negativos seleciona super-bactérias é favorecido pelo extensivo uso de antibióticos na clínica.

A detecção do gene *blaKPC* em enterobactérias isoladas neste estudo corrobora com dados de pesquisas anteriores que mostram que a produção de KPC é o principal mecanismo de resistência em enterobactérias isoladas de amostras clínicas em Campo Grande-MS (CAMPOS *et al.*, 2017; CHANG *et al.*, 2013; RODRIGUES *et al.*, 2019). Faz-se importante lembrar, que as bactérias produtoras destas enzimas são capazes de hidrolisar todos os antibióticos β -lactâmicos – penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e monobactâmico – e tem a capacidade de disseminação muito rápida, podendo causar surtos de infecção e até epidemia (BONOMO, 2017; LOGAN; WEINSTEIN, 2017).

Para a confirmação da produção da enzima carbapenemase existem testes de triagem, fenotípicos e confirmatórios. Neste estudo, o teste fenotípico utilizado confirmou em 33% das bactérias resistentes aos carbapenêmicos, carbapenemase da classe A ou D de Ambler. Posteriormente 100% foram confirmadas com teste molecular pela detecção do gene *blaKPC*. OTA *et al.* (2022) identificou na cidade de Tóquio, Japão, *Citrobacter freundii* e *Klebsiella variicola* produtores de KPC em tanque de efluente na unidade de terapia intensiva.

Em nosso estudo houve 100% de concordância entre os resultados obtidos do teste fenotípico (CIM) com a PCR utilizados para a detecção de carbapenemase-KPC. Diante do exposto, o método de CIM apresenta especificidade e é de baixo custo comparado ao método molecular, ainda não disponível na maioria dos laboratórios de rotina (TIJET; PATEL; MELANO, 2016).

Além disso, este método pode ser utilizado também para a detecção de carbapenemases em bacilos Gram-negativos não fermentadores (VAN DER ZWALUW, *et al.*, 2015).

Kluyvera intermedia foi uma das bactérias isoladas em nosso estudo e que apresentou o gene de resistência *blaKPC*. Até o momento, não foi encontrada nenhuma descrição deste gene nesta espécie de bactéria, nem de amostras clínicas e amostras ambientais. Devido a escassos dados da literatura a resistência a múltiplas drogas entre as espécies deste gênero permanece rara. O gene *blaKPC-2* foi relatado em *Kluyvera georgiana* de amostra clínica (RIBEIRO *et al.*, 2012). Ribeiro *et al.* (2014) descreveu a presença do gene GES-5, em uma *Kluyvera* sp. recuperada de ambiente hospitalar. Também já há relato de bacteremia com choque séptico causado por *Kluyvera intermedia* (INOUE *et al.*, 2023).

Neste estudo não foram identificadas bactérias produtoras de carbapenemase com confirmação do gene *blaKPC* em ambiente não hospitalar. Entretanto, há registros destes genes no Japão (SEKIZUKA *et al.*, 2018), no Brasil (OLIVEIRA *et al.*, 2014), na Holanda (PAULUS *et al.*, 2019). Na Itália, PERILLI *et al.*, 2013 identificou em cepas ambientais e clínicas (isolados clínicos do hospital universitário da cidade de L'Aquila, Itália) os mesmos elementos genéticos móveis, incluindo um determinante *blaKPC-3*.

O gene *blaKPC* em isolados clínicos, têm sua distribuição bem caracterizada, são amplamente distribuídos geograficamente e endêmicos em diversos países, inclusive no Brasil (SAMPAIO; GALES, 2016). Recentemente também FLACH *et al.* (2021) identificou com sequenciamento de genoma completo em Hospital localizado na Suécia, amostras de efluente e pacientes com concordância entre níveis de genes e abundância para *blaNDM*, *blaOXA-48-like* e *blaKPC*, evidenciando a disseminação desses genes de resistência entre as diferentes espécies de bacilos Gram-negativos.

As descobertas de bactérias resistentes a carbapenem enfatizam a importância do efluente hospitalar como potencial reservatório de patógenos e sua disseminação associada ao gene *blaKPC* por meio de ambientes aquáticos hospitalares (CAHILL *et al.*, 2019).

Há relatos na literatura também de microrganismos Gram-positivos com fatores de resistência em efluente hospitalar. Neste estudo esse grupo não foi

abordado, mas essas cepas também podem estar presentes na disseminação ambiental (BASODE *et al.*, 2018, SAKKAS *et al.*, 2019).

Programas de controle e uso adequado de administração de antibióticos podem ajudar a impedir o surgimento de altas taxas de MRA (RABAAN *et al.*, 2022).

Efluentes hospitalares e agrícolas são os principais responsáveis por causar poluição ambiental ao espalhar antibióticos não metabolizados e bactérias resistentes (EKWANZALA *et al.*, 2020).

Além das bactérias carreadoras de resistência, os antimicrobianos presentes em efluentes precisam ser estudados. O efluente hospitalar que desemboca no esgotamento sanitário carrega tanto os microrganismos resistentes quanto os antimicrobianos não – metabolizados (AKTER *et al.*, 2012; EKWANZALA *et al.*, 2020).

A disseminação ambiental dos antibióticos selecionados de águas residuais hospitalares para águas residuais municipais serão objetos de novos estudos pelo nosso grupo de pesquisa.

Um tratamento adequado de águas residuais é essencial antes de sua descarga em rios, lagos ou sistema de efluente para evitar a propagação de BRA e genes de resistência no meio ambiente. Reatores de tratamento anaeróbio-aeróbico de baixa energia, zonas úmidas construídas e processos de desinfecção mostraram boas eficiências de remoção. Nanomateriais e biochar (carvão vegetal) combinados com outros métodos de tratamento e processo de coagulação são estratégias muito recentes em relação à remoção desses microrganismos (BARANCHESHME, MUNIR, 2018).

Conforme dados apresentados e os fornecidos pelos estudos citados, corroboram com a literatura, no qual apresenta o tipo KPC como predominante em nosso estado e nosso país (ANVISA, 2013; BATISTA, 2020; CHANG *et al.*, 2013; DIENSTMANN *et al.*, 2010; SOARES *et al.*, 2021; SOUSA; RAMALHO; CAMARGO, 2020). Essas informações são essenciais para relacionar aos estudos epidemiológicos, ratificando a presença deste tipo de resistência e o risco para a Saúde Pública. No contexto ambiental, a presença de bactérias portadoras de genes de resistência causam risco de transferência dos mesmos para outras bactérias, promovendo um desequilíbrio do meio pela modificação de ecossistemas (SILVA, 2021). Assim os resultados obtidos chamam a atenção para a disseminação de

microrganismos potencialmente patogênicos e resistentes aos antimicrobianos no meio ambiente.

7 CONCLUSÃO

Enterobactérias são isoladas em grande número tanto em efluentes hospitalar e não hospitalar. Neste estudo a maior carga microbiana foi observada na saída do hospital para a rede de esgoto municipal e também em um bairro afastado do hospital, mas que possui grande número de habitantes.

A quantidade de enterobactérias em efluentes varia de um sítio para o outro e está relacionado com o grau de contaminação microbiana no efluente.

O teste cromogênico detectou cepas resistentes que não foram identificadas no teste de suscetibilidade e no teste molecular, demonstrando assim que testes complementares para detecção de resistência aos carbapenêmicos são necessários.

As principais bactérias MDR isoladas foram *Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae*; *Enterobacter cloacae complex*; *Klebsiella pneumoniae ssp ozaenae*; *Klebsiella oxytoca*; *Citrobacter farmeri* e *Kluyvera intermedia*

Em amostras de efluente hospitalar, o gene *blaKPC* foi encontrado em todos os isolados positivos do teste fenotípico. No ambiente não hospitalar, foram isoladas bactérias resistentes a carbapenem. Porém, não produtoras de carbapenemase do tipo KPC. A resistência pode ser por mutações de porina e aumento da expressão da bomba de efluxo, combinados com beta-lactamases.

As ERC do efluente hospitalar apresentaram espectro amplo de resistência aos antibióticos, com destaque para 16 bactérias MDR com resistência à amoxicilina/ácido clavulânico, piperacilina/tazobactam, ceftriaxona, ertapenem, imipenem e meropenem.

Em efluente hospitalar foram identificadas 16 bactérias MDR, 11 XDR e 2 PAN resistentes.

REFERÊNCIAS¹

ABRANTES, J. A. **Avaliação da resistência bacteriana em Estações de Tratamento de Efluente da Fiocruz com ênfase no perfil fenotípico e molecular para beta-lactamases em enterobactérias**. 2022. 116 f. Tese (Doutorado). Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Rio de Janeiro, 2022. Disponível em: https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/handle/icict/55326/jaime_antonio_abrantes_ens_p_dout_2022.pdf?sequence=2&isAllowed=y. Acesso em 01. fev. 2023.

ADEOLU, M.; ALNAJAR, S.; NAUSHAD S.; GUPTA, R. S. Genome-based phylogeny and taxonomy of the 'Enterobacteriales': proposal for *Enterobacterales* ord. nov. divided into the families *Enterobacteriaceae*, *Erwiniaceae* fam. nov., *Pectobacteriaceae* fam. nov., *Yersiniaceae* fam. nov., *Hafniaceae* fam. nov., *Morgane*. **International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology**, v. 66, n. 12, Dec. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001485> Disponível em: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijsem.0.001485>. Acesso em: 10. out. 2022.

AKTER, F.; AMIN, M. R.; OSMAN, K. T.; ANWAR, M. N.; KARIM, M. M.; HOSSAIN, M. A. Ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* in hospital wastewater of Bangladesh and prediction of its mechanism of resistance. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 3, p. 827-34, Mar. 2012. DOI: 10.1007/s11274-011-0875-3. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22805801/>. Acesso em: 04. fev. 2023.

AMBLER, R.P.; COULSON, A.F.; FRERE, J.M. et al. A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases. **Biochemical Journal**, v.276, n.1, p.269, 1991. DOI: 10.1042/bj2760269. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1151176/pdf/biochemj00159-0263.pdf>. Acesso em: 18. out. 2022.

ANDERSON, R. E. V.; BOERLIN, P. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in animals and methodologies for their detection. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 84, n. 1, p. 3-17, Jan. 2020. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6921994/pdf/cjvr_01_3.pdf. Acesso em: 24. out. 2022.

ANDREY, D. O.; DANTAS, P. P.; WILLAMES, B. S. M.; FABÍOLA, M. D. C.; LUIZ, G. P. A.; KIRSTY, S.; EDWARD, P.; JULIEN, S.; RODRIGO, C.; MARISA, F. N.; ANA, T. R. V.; EDUARDO, A. M.; TIMOTHY, R. W.; ANA, C. G. An Emerging Clone, *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase 2–Producing K. pneumoniae Sequence Type 16, Associated With High Mortality Rates in a CC258-Endemic Setting. **Clinical Infectious Diseases**, v. 71, n. 7, p. e141-e150, Oct. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1093/cid/ciz1095>. Disponível em: <https://academic.oup.com/cid/article/71/7/e141/5622601>. Acesso em: 06. nov. 2020.

¹Nota: Normas segundo ABNT (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, NBR 6023: Informação e documentação: Referência: Elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

ANGELO, B. J. **Resistência a antibióticos e o impacto no microbioma intestinal humano**. 2019. Trabalho de Conclusão de Curso (Farmácia Bioquímica) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019. Disponível em: <https://repositorio.usp.br/directbitstream/4f0cfd3e-95ef-4def-b03e-dabae4589dc6/3050061.pdf>. Acesso em: 16. out. 2022.

ANNAVAJHALA, M. K.; GOMEZ-SIMMONDS, A.; UHLEMANN, A.-C. Multidrug-Resistant *Enterobacter cloacae* Complex Emerging as a Global, Diversifying Threat. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. 31, Jan. 2019. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00044>. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.00044/full>. Acesso em: 04. fev. 2023.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Nota técnica nº 01/2013 – Medidas de prevenção e controle de infecções por enterobactérias multirresistentes**. Brasília, 2013. Disponível em: <https://cevs.rs.gov.br/upload/arquivos/201706/30132435-1369161512-nota-tec-01-2013-anvisa.pdf>. Acesso em: 09. fev. 2023.

AREND, R. G.; HENKES, J. A. Efluente Hospitalares: Avaliação da forma de disposição dos efluentes hospitalares em quatro municípios da região do vale dos sinos, no estado do Rio Grande do Sul. **Revista Gestão & Sustentabilidade Ambiental**, v. 2, n. 2, p. 263 - 308, out. 2013/ mar. 2014. Disponível em: http://www.portaldeperiodicos.unisul.br/index.php/gestao_ambiental/article/view/1684/1246. Acesso em: 10. jan. 2021.

ASFAW, T.; GENETU, D.; SHENKUTE, D. High Burden of Antibiotic-Resistant Bacteria from Wastewater in Ethiopia: A Systematic Review. **Risk Manag Healthc Policy**, v. 13, p. 3003-3011, Dec. 2020. DOI: 10.2147/RMHP.S277640. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33376424/>. Acesso em: 26. jul. 2023.

BARANCHESHME, F.; MUNIR, M. Strategies to Combat Antibiotic Resistance in the Wastewater Treatment Plants. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. 2603, Jan. 2018. DOI: 10.3389/fmicb.2017.02603. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29387043/>. Acesso em: 09. fev. 2023.

BARTLEY, P. S.; DOMITROVIC, T. N.; MORETTO, V. T.; SANTOS, C. S.; PONCE-TERASHIMA, R.; REIS, M. G.; BARBOSA, L. M.; BLANTON, R. E.; BONOMO, R. A.; PEREZ, F. Antibiotic Resistance in *Enterobacteriaceae* from Surface Waters in Urban Brazil Highlights the Risks of Poor Sanitation. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 100, n. 6, p. 1369-1377, Jun. 2019. DOI: 10.4269/ajtmh.18-0726. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30994094/>. Acesso em: 04. mar. 2023.

BASODE, V. K.; ABDULHAQ, A.; ALAMOUDI, M. U. A.; TOHARI, H. M., QUHAL, W. A.; MADKHALI, A. M.; HOBANI, Y. H.; HERSHAN, A. A. Prevalence of a carbapenem-resistance gene (KPC), vancomycin-resistance genes (van A/B) and a methicillin-resistance gene (mecA) in hospital and municipal sewage in a southwestern province of Saudi Arabia. **BMC Research Notes**, v. 15, n. 1, p. 30,

Jan. 2018. DOI: 10.1186/s13104-018-3167-2. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29335025/>. Acesso em: 05. fev. 2023.

BATISTA, A. C. C. A. ***Klebsiella pneumoniae*: Análise Fenotípica e Molecular dos Mecanismos de Resistência KPC e NDM em um Hospital de Foz do Iguaçu, PR.** Dissertação (Mestrado em Ciências). Universidade Federal da Integração Latino-Americana. Foz do Iguaçu, 2020. Disponível em: <https://dspace.unila.edu.br/handle/123456789/5960;jsessionid=0736836E6B835FCE61F87CDAE34C5ADA>. Acesso em: 09. fev. 2023.

BAUER, A. W.; KIRBY, W. M.; SHERRIS, J. C.; TRUCK, M. Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, n. 4, p. 493–496, April 1966. DOI: https://doi.org/10.1093/ajcp/45.4_ts.493. Disponível em: https://academic.oup.com/ajcp/article/45/4_ts/493/4821085. Acesso em: 28. out. 2022.

BERENDONK, T. U.; MANAIA, C. M.; MERLIN, C.; FATTA-KASSINOS, D.; CYTRYN, E.; WALSH, F.; BÜRGMANN, H.; SORUM, H.; NORSTRÖM, M.; PONS, M. N.; KREUZINGER, N.; HUOVINEN, P.; STEFANI, S.; SCHWARTZ, T.; KISAND, V.; BAQUERO, F.; MARTINEZ, J. L. Tackling antibiotic resistance: the environmental framework. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 5, p. 310–317, May 2015. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrmicro3439>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25817583/>. Acesso em: 10. nov. 2020.

BONOMO, R. A. β -lactamases: a focus on current challengs. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 7, n. 1, a025239, Jan. 2017. DOI: 10.1101/cshperspect.a025239. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5204326/pdf/cshperspectmed-ANR-a025239.pdf>. Acesso em: 20. out. 2022.

BOUCHER, H. W.; TALBOT, G. H.; BRADLEY, J. S.; EDWARDS, J. E.; GILBERT, D.; RICE, L. B.; SCHELD, M.; SPELLBERG, B.; BARTLETT, J. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 48, n. 1, p. 1-12, Jan. 2009. DOI: 10.1086/595011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19035777/>. Acesso em 16. mar. 2023.

BOUTAL, H.; VOGEL, A.; BERNABEU, S.; DEVILLIERS, K.; CRETON, E.; COTELLON, G.; PLAISANCE, M.; OUESLATI, S.; DORTET, L.; JOUSSET, A.; SIMON, S.; NAAS, T.; VOLLAND, H. A multiplex lateral flow immunoassay for the rapid identification of NDM-, KPC-, IMP- and VIM-type and OXA-48-like carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 73, n. 4, p. 909-915, Apr. 2018. DOI: 10.1093/jac/dkx521. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5890661/pdf/dkx521.pdf>. Acesso em: 28. out. 2022.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Resolução do CONAMA Nº 358, de 29 de abril de 2005, Dispõe sobre o tratamento e disposição final dos resíduos dos

serviços de saúde e dá outras providências. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, n. 84, p. 63, 04 maio 2005. Disponível em: <https://www.jusbrasil.com.br/diarios/596386/pg-63-secao-1-diario-oficial-da-uniao-dou-de-04-05-2005>. Acesso em: 10. nov. 2020.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Resolução do CONAMA Nº 430, de 13 de maio de 2011, Dispõe sobre as condições de lançamento de efluentes. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, n. 92, p. 89, 16 maio 2011. Disponível em: <https://www.jusbrasil.com.br/diarios/26738562/pg-89-secao-1-diario-oficial-da-uniao-dou-de-16-05-2011>. Acesso em: 10. nov. 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução-RDC Nº 50, de 21 de fevereiro de 2002, Dispõe sobre o Regulamento Técnico para planejamento, programação, elaboração e avaliação de projetos físicos de estabelecimentos assistenciais de saúde. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 20 mar. de 2002. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2002/rdc0050_21_02_2002.html. Acesso em: 24. out. 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Plano de ação nacional de prevenção e controle da resistência aos antimicrobianos no âmbito da saúde única 2018-2022 (PAN-BR)**. Brasília - D.F., 2018. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/resistencia-aos-antimicrobianos/publicacoes/PANBRdez2018.pdf>. Acesso em: 24. out. 2022.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária Comissão sobre Prevenção da Resistência aos Antimicrobianos em Animais. **Plano de ação nacional de prevenção e controle da resistência aos antimicrobianos, no âmbito da agropecuária**. Brasília - D.F., 2018. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/resistencia-aos-antimicrobianos/pan-br-agro/PANBRAGROv.1.0maio2018.pdf>. Acesso em: 24. out. 2022.

BrCAST - COMITÊ BRASILEIRO DE TESTES DE SUSCETIBILIDADE ANTIMICROBIANA. **Orientações do EUCAST para a detecção de mecanismos de resistência e resistências específicas de importância clínica e/ou epidemiológica**, versão 2.0, set. 2018. Disponível em: <https://brcast.org.br/wp-content/uploads/2022/09/Orientac%CC%A7o%CC%83es-do-EUCAST-para-a-detecc%CC%A7a%CC%83o-de-mecanismos-de-resiste%CC%82ncia-e-resiste%CC%82ncias-especi%CC%81ficas2.pdf>. Acesso em: 10. jan. 2021.

BrCAST - COMITÊ BRASILEIRO DE TESTES DE SUSCETIBILIDADE ANTIMICROBIANA. **Método de Disco-Difusão para Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos**, versão 9.0, jan. 2021. Disponível em: <https://brcast.org.br/wp-content/uploads/2022/09/06-Me%CC%81todo-de-Disco-Difusa%CC%83o-BrCAST-24-6-2021.pdf>. Acesso em: 10. jan. 2021.

BRUCHMANN, S.; DÖTSCH, A.; NOURI, B.; CHABERNY, I. F.; HÄUSSLER, S. Quantitative contributions of target alteration and decreased drug accumulation to *Pseudomonas aeruginosa* fluoroquinolone resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 3, p. 1361-1368, Mar. 2013. DOI: 10.1128/AAC.01581-12. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23274661/>. Acesso em: 17. out. 2022.

BUSH, K.; JACOBY, G.A.; MEDEIROS, A.A. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, n. 6, p. 1211, June 1995. DOI: 10.1128/aac.39.6.1211. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC162717/pdf/391211.pdf>. Acesso em: 18. out. 2022.

BUSH, K.; JACOBY, G.A. Updated Functional Classification of β -Lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 3, p. 969-976, Mar. 2010. DOI: <https://doi.org/10.1128/AAC.01009-09>. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/epub/10.1128/AAC.01009-09>. Acesso em: 06. out. 2022.

BUSH K. Past and Present Perspectives on β -Lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, n. 30, Oct. 2018. DOI: 8. <https://doi.org/10.1128/AAC.01076-18>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6153792/pdf/e01076-18.pdf>. Acesso em: 19. out. 2022.

CAHILL, N.; O'CONNOR, L.; MAHON, B.; VARLEY, A.; MCGRATH, E.; RYAN, P.; CORMICAN, M.; BREHONY, C.; JOLLEY, K. A.; MAIDEN, M. C.; BRISSE, S.; MORRIS, D. Hospital effluent: A reservoir for carbapenemase-producing *Enterobacterales*? **Science of the Total Environment**, v. 672, p. 618-624, July 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.428>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969719314366?via%3Dihub>. Acesso em: 09. nov. 2020.

CAMARGO, C.H. Current status of NDM-producing *Enterobacterales* in Brazil: a narrative review. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 3, n. 53, p. 1339-1344, Sep. 2022. DOI: 10.1007/s42770-022-00779-1. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35690653/>. Acesso em: 24. jul. 2023.

CAMPOS, C.C.; RORIZ, N. F.; ESPÍNOLA, C.N.; LOPES, F. A.; TIEPPO, C.; TETILA, A. F.; CHAVES, C. E. V.; OLIVEIRA, P. A.; CHANG, M. R. KPC: an important mechanism of resistance in *K. pneumoniae* isolates from intensive care units in the Midwest region of Brazil. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 11, n.08, p. 646-651, Aug. 2017. DOI: 10.3855/jidc.8920. Disponível em: <https://jidc.org/index.php/journal/article/view/31085826/1738>. Acesso em: 18. out. 2022.

CARVALHO-ASSEF, A.P.D.A.; PEREIRA, P.S.; ALBANO, R.M.; BERIÃO, G. C.; CHAGAS, T. P.; TIMM, L. N.; SILVA, R. C.; FALCI, D. R.; ASENSI, M. D. Isolation of NDM-producing *Providencia rettgeri* in Brazil. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 12, p. 2956-2957, Dec. 2013. DOI: 10.1093/jac/dkt298.

Disponível em: <https://academic.oup.com/jac/article/68/12/2956/700939?login=false>. Acesso em: 18. out. 2022.

CASTRO, H. C.; CHAGAS, E. F.; LIBERAL, M. H. T.; CARDOSO, C. V.; BARBOSA, E. V.; MAGALHÃES, H. Uso de crioprotetores para a preservação de coleções microbianas mantidas para PD&I. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, v. 3, n. 1, p.143-156, Jan. 2020. Disponível em: <https://brazilianjournals.com/index.php/BJAER/article/download/7018/6163>. Acesso em: 27. set. 2022.

CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, U. S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. **CRE Technical Information**. 2019. Disponível em: <https://www.cdc.gov/hai/organisms/cre/technical-info.html#Definition>. Acesso em: 13. out. 2022.

CHA, M. K.; KANG, C. I.; KIM, S. H.; CHO, S. Y.; HA, Y. E.; WI, Y. M.; CHUNG, D. R.; PECK, K. R.; SONG, J. H.; Korean Network for Study on Infectious Diseases (KONSID). In vitro activities of 21 antimicrobial agents alone and in combination with aminoglycosides or fluoroquinolones against extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* isolates causing bacteremia. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 9, p. 5834-5837, Sep. 2015. DOI: 10.1128/AAC.01121-15. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26124174/>. Acesso em: 22. jul. 2023.

CHAGAS, T. P.; SEKI, L. M.; CURY, J. C.; OLIVEIRA, J. A.; DÁVILA, A. M.; SILVA, D. M.; ASENSI, M. D. Multiresistance, beta-lactamase-encoding genes and bacterial diversity in hospital wastewater in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 111, n. 3, p. 572-81, Sep. 2011. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2011.05072.x. Disponível em: <https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2672.2011.05072.x>. Acesso em: 24. out. 2022.

CHARFI, K.; GRAMI, R.; JEDDOU, A.B.; MESSAOUDI, A.; MANI, Y.; BOUALLEGUE, O.; BOUJAAFAR, N.; AOUNI, M.; MAMMERI, H.; MANSOUR, W. Extended-spectrum β -lactamases and plasmid-mediated quinolone resistance in enterobacterial clinical isolates from neonates in Tunisia. **Microbial Pathogenesis**, v.110, p.184-188, Sep. 2017. DOI: 10.1016/j.micpath.2017.06.030 .Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28648624/>. Acesso em: 22. jul. 2023.

CHANDY, S. J.; NAIK, G. S.; BALAJI, V.; JEYASEELAN, V.; THOMAS, K.; LUNDBORG, C. S. High cost burden and health consequences of antibiotic resistance: the price to pay. **Journal of infection in developing countries**, v. 8, n. 9, p. 1096-102, Sep. 2014 DOI: 10.3855/jidc.4745. Disponível em: <https://jidc.org/index.php/journal/article/view/25212073/1143>. Acesso em: 21. out. 2022.

CHANG, M. R.; BIBERG, C.A.; LOPES, F. A.; TETILA, A. F.; PIGNATARI, A. A. C. The first report of infection with *Klebsiella pneumoniae* carrying the bla kpc gene in State of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 1, p. 114-115, Jan. 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/0037->

868215502013. Disponível em:
https://www.researchgate.net/publication/236128560_The_first_report_of_infection_with_Klebsiella_pneumoniae_carrying_the_blakpc_gene_in_State_of_Mato_Grosso_do_Sul_Brazil. Acesso em: 10. dez. 2020.

CHAUBEY, V. P.; PITOUT, J. D. D.; DALTON, B.; GREGSON, D. B.; ROSS, T. Laupland KB. Clinical and microbiological characteristics of bloodstream infections due to AmpC β -lactamase producing *Enterobacteriaceae*: an active surveillance cohort in a large centralized Canadian region. **BMC Infectious Diseases**, v. 14, n. 1, p. 647, Dec. 2014. DOI: 10.1186/s12879-014-0647-4. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4299784/pdf/12879_2014_Article_647.pdf. Acesso em: 19. out. 2022.

CHAVDA, K. D.; CHEN, L.; FOUTS, D. E.; SUTTON, G.; BRINKAC, L.; JENKINS, S. G.; BONOMO, R. A.; ADAMS, M. D. Kreiswirth BN. Comprehensive Genome Analysis of Carbapenemase-Producing *Enterobacter* spp.: New Insights into Phylogeny, Population Structure, and Resistance Mechanisms. **mBio**, v. 7, n. 6, p. e02093-16, Dec. 2016. DOI: 10.1128/mBio.02093-16. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27965456/>. Acesso em: 04. fev. 2023.

CHAVEZ, M. V.; CAICEDO, L. D.; CASTILLO, J. E. Occurrence of β -Lactamase-Producing Gram-Negative Bacterial Isolates in Water Sources in Cali City, Colombia. **International Journal of Microbiology**, Sep. 2019. DOI: 10.1155/2019/1375060. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6754923/pdf/IJMICO2019-1375060.pdf>. Acesso em: 21. out. 2022.

CLSI - Clinical & Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. **CLSI supplement M100-S28**, 28^o ed., 2018. Disponível em: <https://file.qums.ac.ir/repository/mmrc/CLSI-2018-M100-S28.pdf>. Acesso em 28. set. 2022.

COLLIGNON, P. J.; MCEWEN, S. A. One Health-Its Importance in Helping to Better Control Antimicrobial Resistance. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v. 4, n. 1, p. 22, Jan. 2019. DOI:10.3390/tropicalmed4010022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6473376/pdf/tropicalmed-04-00022.pdf>. Acesso em: 21. out. 2022.

CONTE, D.; MESA, D.; JOVÉ, T.; ZAMPARETTE, C. P.; SINCERO, T. C. M.; PALMEIRO, J. K.; DALLA-COSTA, L. M. Novel Insights into bla_{GES} Mobilome Reveal Extensive Genetic Variation in Hospital Effluents. **Microbiology spectrum**, v. 10, n. 4, p. e0246921, Aug. 2022. DOI: 10.1128/spectrum.02469-21. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9430818/pdf/spectrum.02469-21.pdf>. Acesso em: 21. out. 2022.

DAVIN-REGLI, A.; LAVIGNE, J. P.; PAGÈS, J. M. *Enterobacter* spp.: Update on Taxonomy, Clinical Aspects, and Emerging Antimicrobial Resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 32, n. 4, p. e00002-19, Jul. 2019. DOI: 10.1128/CMR.00002-19. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31315895/>. Acesso em: 04. fev. 2023.

DESHPANDE, L. M.; JONES, R. N.; FRITSCH, T. R.; SADER, H. S. Occurrence and characterization of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2000-2004). **Microbial Drug Resistance**, v. 12, n. 4, p. 223-30, Jan. 2007. DOI: <https://doi.org/10.1089/mdr.2006.12.223>. Disponível em: <https://www.liebertpub.com/doi/epdf/10.1089/mdr.2006.12.223>. Acesso em: 18. out. 2022.

DIEKEMA, D. J.; HSUEH, P. R.; MENDES, R. E.; PFALLER, M. A.; ROLSTON, K. V.; SADER, H. S.; JONES, R. N. The microbiology of bloodstream infection: 20-year trends from the SENTRY antimicrobial surveillance program. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 63, n. 7, July 2019. DOI: 10.1128/AAC.00355-19. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31010862/>. Acesso em: 10. out. 2022.

DIENSTMANN, R.; PICOLI, S.U.; MEYER, G.; SCHENKEL, T.; STEYER, J. Avaliação fenotípica da enzima *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) em *Enterobacteriaceae* de ambiente hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 46, n. 1, p. 23-27, Fev. 2010. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1676-24442010000100005>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/jbpm/la/wWg6tbkYQXdwj4cB7DFBFch/?lang=pt>. Acesso em: 09. fev. 2023.

DOCQUIER, J. D.; CALDERONE, V.; LUCA, F. D.; BENVENUTI, M.; GIULIANI, F., BELLUCCI, L.; TAFI, A.; NORDMANN, P.; BOTTA, M.; ROSSOLINI, G. M.; MANGANI, S. Crystal structure of the OXA-48 beta-lactamase reveals mechanistic diversity among class D carbapenemases. **Chemistry & Biology**, v. 16, n. 5, p. 540-7, May 2009. DOI: 10.1016/j.chembiol.2009.04.010. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1074552109001434?via%3Dihub>. Acesso em: 20. out. 2022.

DOMINGOS, M. O.; FRANZOLIN, M. R.; ANJOS, M. T.; FRANZOLIN, T. M.; BARBOSA, R. C. A.; ANDRADE, G. R.; LOPES, R. J.; BARBARO, K. C. The influence of environmental bacteria in freshwater stingray wound-healing. **Toxicon**, v. 58, n. 2, p. 147-53, Aug. 2011. DOI: 10.1016/j.toxicon.2011.04.016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010111001516>. Acesso em: 09. mar. 2023.

DRAWZ, S. M.; BONOMO, R. A. Three decades of β -lactamase inhibitors. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 23, n.1, p. 160-201, Jan. 2010. DOI: <https://doi.org/10.1128/CMR.00037-09>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2806661/pdf/0037-09.pdf>. Acesso em: 18. out. 2022.

DUIN, V. D.; DOI, Y. The global epidemiology of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. **Virulence**, v. 8, n. 4, p. 460-469, May 2017. DOI: 10.1080/21505594.2016.1222343. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5477705/pdf/kvir-08-04-1222343.pdf>. Acesso em: 18. out. 2022.

EDA, R.; MAEHANA, S.; HIRABAYASHI, A.; NAKAMURA, M.; FURUKAWA, T.; IKEDA, S.; SAKAI, K.; KOJIMA, F.; SEI, K.; SUZUKI, M.; KITASATO, H. Complete genome sequencing and comparative plasmid analysis of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from hospital sewage water in Japan. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 24, p. 180-182, Mar. 2021. DOI: 10.1016/j.jgar.2020.12.007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33373730/>. Acesso em: 16. mar. 2023.

EICHENBERGER, E. M.; THADEN, J. T. Epidemiology and Mechanisms of Resistance of Extensively Drug Resistant Gram-Negative Bacteria. **Antibiotics (Basel)**, v. 8, n. 2, p. 37, Apr. 2019. DOI: 10.3390/antibiotics8020037. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6628318/pdf/antibiotics-08-00037.pdf>. Acesso em: 17. out. 2022.

EKWANZALA, M. D.; LEHUTSO, R. F.; KASONGA, T. K.; DEWAR, J. B.; MOMBA, M. N. B. Environmental Dissemination of Selected Antibiotics from Hospital Wastewater to the Aquatic Environment. **Antibiotics (Basel)**, v. 9, n. 7, p. 431, Jul. 2020. DOI: 10.3390/antibiotics9070431. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7400012/>. Acesso em: 05. fev. 2023.

ESMAEILI-FARD-BARZEGAR, K.; NAJAR-PEERAYEH, S.; FARD, R. M. N.; BAKHSHI, B. Lytic potential of a filamentous bacteriophage isolated from sewage water in Tehran on clinical carbapenem-resistant strains. **The Iranian Journal of Microbiology**, v. 15, n. 5, p. 705-711, Oct. 2022. DOI: 10.18502/ijm.v14i5.10966. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36531823/>. Acesso em: 05. mar. 2023.

EUCAST - The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. **EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance**. Version 2.0. Julho 2017. Disponível em: https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Resistance_mechanisms/EUCAST_detection_of_resistance_mechanisms_170711.pdf. Acesso em: 19. jan. 2023.

EUROPEAN COMMISSION. **A European One Health Action Plan against: Antimicrobial Resistance (AMR)**. 2017. Disponível em: https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/antimicrobial_resistance/docs/amr_2017_action-plan.pdf. Acesso em: 12 dez. 2020.

FARMER, J. J.; FANNING, G. R.; HUNTLEY-CARTER, G. P.; HOLMES, B.; HICKMAN, F. W.; RICHARD, C.; BRENNER, D. J. *Kluyvera*, a new (redefined) genus in the family *Enterobacteriaceae*: identification of *Kluyvera ascorbata* sp. nov. and *Kluyvera cryocrescens* sp. nov. in clinical specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 13, n. 5, p. 919-33, May 1981. DOI: 10.1128/jcm.13.5.919-933. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7240403/>. Acesso em: 04. fev. 2023.

FREITAS, D. Y.; ARAÚJO, S.; FOLADOR, A. R. C.; RAMOS, R. T. J.; AZEVEDO, J. S. N.; TACÃO, M.; SILVA, A.; HENRIQUES, I.; BARAÚNA, R. A. Extended Spectrum Beta-Lactamase-Producing Gram-Negative Bacteria Recovered From an Amazonian

Lake Near the City of Belém, Brazil. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. 364, Feb. 2019. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00364. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30873145/>. Acesso em: 09. mar. 2023.

FLACH, C. F.; HUTINEL, M.; RAZAVI, M.; ÅHRÉN, C.; LARSSON, D. G. J. Monitoring of hospital sewage shows both promise and limitations as an early-warning system for carbapenemase-producing *Enterobacterales* in a low-prevalence setting. **Water Research**, v. 200, n. 117261, Jul. 2021. DOI: 10.1016/j.watres.2021.117261. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34082263/>. Acesso em: 05. fev. 2023.

FURLAN, J. P. R.; LOPES, R.; RAMOS, M. S.; SANTOS, L. D. R.; ROSA, R. S.; SAVAZZI, E. A. Stehling EG. Colistin-resistant mcr-1-positive *Escherichia coli* ST1775-H137 co-harboring blaCTX-M-2 and blaCMY-2 recovered from an urban stream. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 96, p. 105156, Dec. 2021. DOI: 10.1016/j.meegid.2021.105156. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34823029/>. Acesso em: 26. jul. 2023.

GARCIA-VIDAL, C.; CARDOZO-ESPINOLA, C.; PUERTA-ALCALDE, P.; MARCO, F.; TELLEZ, A.; AGÜERO, D.; ROMERO-SANTANA, F.; DÍAZ-BEYÁ, M.; GINÉ, E.; MORATA, L.; RODRÍGUEZ-NÚÑEZ, O.; MARTINEZ, J. A.; MENSA, J.; ESTEVE, J.; SORIANO, A. Risk factors for mortality in patients with acute leukemia and bloodstream infections in the era of multiresistance. **PloS One**, v. 13, n. 6, p. e0199531, Jun. 2018. DOI: 10.1371/journal.pone.0199531. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6023133/pdf/pone.0199531.pdf>. Acesso em: 17. abr. 2023.

GAUTHIER, L.; DORTET, L.; JOUSSET, A. B.; MIHAILA, L.; GOLSE, N.; NAAS, T.; BONNIN, R. A. Molecular characterization of plasmid-encoded Tripoli MBL 1 (TMB-1) in *Enterobacteriaceae*. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 74, n. 1, p. 42–7, Jan. 2019. DOI: 10.1093/jac/dky372. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30252055/>. Acesso em: 18. out. 2022.

GHEORGHE-BARBU, I.; BARBU, I. C.; POPA, L. I.; PÎRCĂLĂBIORU, G. G.; POPA, M.; MĂRUȚESCU, L.; NIȚĂ-LAZAR, M.; BANCIU, A.; STOICA, C.; GHEORGHE, Ș.; LUCACIU, I.; SĂNDULESCU, O.; PARASCHIV, S.; SURLEAC, M.; TALAPAN, D.; MUNTEAN, A. A.; PREDĂ, M.; MUNTEAN, M. M.; DRAGOMIRESCU, C. C.; POPA, M. I.; OȚELEA, D.; CHIFIRIUC, M. C. Temporo-spatial variations in resistance determinants and clonality of *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* strains from Romanian hospitals and wastewaters. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, v. 11, n. 1, p. 115, Sep. 2022. DOI: 10.1186/s13756-022-01156-1. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36104761/>. Acesso em: 05. mar. 2023.

GIRLICH, D.; POIREL, L.; NORDMANN, P. Value of the modified Hodge test for detection of emerging carbapenemases in *Enterobacteriaceae*. **Journal of clinical microbiology**, v. 50, n. 2, p. 477-9, Feb. 2012. DOI: 10.1128/JCM.05247-11. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3264163/>. Acesso em: 28 out. 2022.

GOESSENS, W. H.; BIJ, V. A. K.; BOXTEL, R.; PITOUT, J. D.; ULSEN, P.; MELLES, D. C. Tommassen J. Antibiotic Trapping by Plasmid-Encoded CMY-2 β -Lactamase Combined with Reduced Outer Membrane Permeability as a Mechanism of Carbapenem Resistance in *Escherichia coli*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 57, n. 8, p. 3941-9, Aug. 2013. DOI: 10.1128/AAC.02459-12. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3719783/pdf/zac3941.pdf>. Acesso em: 19. out. 2022.

GOLAN, Y. Empiric therapy for hospital-acquired, Gram-negative complicated intra-abdominal infection and complicated urinary tract infections: a systematic literature review of current and emerging treatment options. **BMC Infectious Diseases**, v. 15, n. 313, Aug. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12879-015-1054-1>. Disponível em: <https://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12879-015-1054-1>. Acesso em: 10. out. 2022.

GORDON, A. E. K.; MATHERS, A. J.; CHEONG, E. Y. L.; GOTTLIEB, T.; KOTAY, S.; WALKER, S.; PETO, T. E. A.; CROOK, D. W.; STOESSERT, N. The Hospital Water Environment as a Reservoir for Carbapenem-Resistant Organisms Causing Hospital Acquired Infections—A Systematic Review of the Literature. **Clinical Infectious Diseases**, v. 64, n. 10 p. 1435–44, Feb. 2017. DOI: 10.1093/cid/cix132. Disponível em: <https://academic.oup.com/cid/article/64/10/1435/2990266>. Acesso em: 17. jan. 2023.

HANSEN, G. T. Continuous Evolution: Perspective on the Epidemiology of Carbapenemase Resistance Among *Enterobacterales* and Other Gram-Negative Bacteria. **Infectious Diseases and Therapy**, v. 10, p. 75–92, Jan. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40121-020-00395-2>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s40121-020-00395-2>. Acesso em: 18. out. 2022.

HARA, G. L.; GOULD, I.; ENDIMIANI, A.; PARDO, P. R.; DAIKOS, G.; HSUEH, P.; MEHTAR, S.; PETRIKKOS, G.; CASELLAS, J. M.; DACIUK, L.; PACIEL, D.; NOVELLI, A.; SAGINUR, R.; PRYLUKA, D.; MEDINA, J.; SAVIO, E. Detection, treatment, and prevention of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: Recommendations from an International Working Group. **Journal of Chemotherapy**, v. 25, p. 129–140, Jan. 2013. DOI: 10.1179/1973947812Y.0000000062. Disponível em: http://www.infectologia.edu.uy/images/stories/pdf/publicaciones/biomedicas/articulos/detectio_treatmentandprevention_of_CPE.pdf. Acesso em: 24. out. 2022.

HASSOUN-KHEIR, N.; STABHOLZ, Y.; KREFT, J. U.; de la CRUZ, R.; ROMALDE, J. L.; NESME, J.; SØRENSEN, S. J.; SMETS, B.F.; GRAHAM, D.; PAUL, M. Comparison of antibiotic-resistant bacteria and antibiotic resistance genes abundance in hospital and community wastewater: A systematic review. **The Science of the total environment**, v. 743, Nov. 2020. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.140804. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S004896972034328X?via%3Dihub>. Acesso em: 03. out. 2022.

HO, J. Y.; JONG, M. C.; ACHARYA, K.; LIEW, S. S. X.; SMITH, D. R.; NOOR, Z. Z.; GOODSON, M. L.; WERNER, D.; GRAHAM, D. W.; ESWARAN, J. Multidrug-resistant bacteria and microbial communities in a river estuary with fragmented suburban waste management. **Journal of Hazardous Materials**, v. 405, p. 124687, Mar. 2021. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2020.124687. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33301976/>. Acesso em: 26. jul. 2023.

HRENOVIC, J.; GOIC-BARISIC, I.; KAZAZIC, S.; KOVACIC, A.; GANJTO, M.; TONKIC, M. Carbapenem-resistant isolates of *Acinetobacter baumannii* in a municipal wastewater treatment plant, Croatia, 2014. **Eurosurveillance**, v. 21, n. 15, Apr. 2016. DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2016.21.15.30195. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27105318/>. Acesso em: 04. mar. 2023.

HILTY, M.; SENDI, P.; SEIFFERT, S. N.; DROZ, S.; PERRETTEN, V.; HUJER, A. M.; BONOMO, R. A.; MÜHLEMANN, K.; ENDIMIANI, A. Characterisation and clinical features of *Enterobacter cloacae* bloodstream infections occurring at a tertiary care university hospital in Switzerland: is cefepime adequate therapy? **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 41, n. 3, p. 236-49, Mar. 2013. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2012.10.022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4018813/pdf/nihms573002.pdf>. Acesso em: 19. out. 2022.

HRABAK, J.; CHUDACKOVA, E.; PAPAGIANNITSIS, C.C. Detection of carbapenemases in *Enterobacteriaceae*: A challenge for diagnostic microbiological laboratories. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, n. 9, p. 839–853, Sep. 2014. DOI: 10.1111/1469-0691.12678. Disponível em: <https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/action/showPdf?pii=S1198-743X%2814%2965088-6>. Acesso em: 19. jan. 2023.

HRABÁK, J.; STUDENTOVÁ, V.; WALKOVÁ, R.; ZEMLICKOVÁ, H.; JAKUBU, V.; CHUDÁCKOVÁ, E.; GNIADKOWSKI, M.; PFEIFER, Y.; PERRY, J. D.; WILKINSON, K.; BERGEROVÁ, T. Detection of NDM-1, VIM-1, KPC, OXA-48, and OXA-162 carbapenemases by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 7, p. 2441-3, Jul. 2012. DOI: 10.1128/JCM.01002-12. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3405576/pdf/zjm2441.pdf>. Acesso em: 28. out. 2022.

HSIAO, P. K.; CHEN, W. T.; CHANG, K. C.; KE, Y. J.; KUO, C. L.; TSENG, C. C. Performance of CHROMagar Staph aureus and CHROMagar MRSA for Detection of Airborne Methicillin-Resistant and Methicillin-Sensitive *Staphylococcus aureus*. **Aerosol Science and Technology**, v. 46, p. 297–308, Oct. 2011. DOI: 10.1080/02786826.2011.626001. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/02786826.2011.626001>. Acesso em: 02. fev. 2023.

HSIAO, P. K.; CHENG, C. C.; CHANG, K. C.; YIIN, L. M.; HSIEH, C. J.; TSENG, C. C. Performance of CHROMagar VRE Medium for the Detection of Airborne Vancomycin Resistant/Sensitive *Enterococcus* Species. **Aerosol Science and Technology**, v. 48, p. 173– 183, Dec. 2013. DOI: 10.1080/02786826.2013.865833.

Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/02786826.2013.865833>. Acesso em: 02. fev. 2023.

HUBENY, J.; KORZENIEWSKA, E.; BUTA-HUBENY, M.; ZIELIŃSKI, W.; ROLBIECKI, D.; HARNISZ M. Characterization of carbapenem resistance in environmental samples and *Acinetobacter* spp. isolates from wastewater and river water in Poland. **Science of the Total Environment**, v. 822, p. 153437, May 2022. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2022.153437. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969722005290?via%3Dihub>. Acesso em: 09. mar. 2023.

INOUE, T.; HADANO, Y.; KOGA, H.; TAMEHIRO, K.; SÁGARA, S.; TOKUDA, Y.; URABE, S.; MUKASA, K.; ONITSUKA, K.; HIGUCHI, M.; SUDO, T.; MABE, T.; TOYAMA, K.; ICHIKAWA, A.; HISAKA, S.; MORIYA, T.; YAMAMOTO, M. *Kluyvera intermedia* bacteremia with septic shock: A case report. **IDCases**, v. 32, n. e01765, Apr. 2023. DOI: 10.1016/j.idcr.2023.e01765. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37122594/>. Acesso em 30. mai. 2023.

JACOBY, G. A. AmpC β -lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, n. 1, p. 161-182, Jan. 2009. DOI: <https://doi.org/10.1128/CMR.00036-08>. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/CMR.00036-08>. Acesso em: 20. out. 2022.

JEAN, S. S.; CHANG, Y. C.; LIN, W. C.; LEE, W. S.; HSUEH, P. R.; HSU, C. W. Epidemiology, treatment, and prevention of nosocomial bacterial pneumonia. **Journal of Clinical Medicine**, v. 9, n. 1, p. 275, Jan. 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/jcm9010275>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31963877/>. Acesso em: 10. out. 2022.

JI, S.; LV, F.; DU, X.; WEI, Z.; FU, Y.; MU, X.; JIANG, Y.; YU, Y. Cefepime combined with amoxicillin/clavulanic acid: a new choice for the KPC-producing *K. pneumoniae* infection. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 38, p. 108–14, Sep. 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2015.07.024>. Disponível em: <https://www.ijidonline.com/action/showPdf?pii=S1201-9712%2815%2900192-7>. Acesso em: 18. out. 2022.

JO, J. H.; HARKINS, C. P.; SCHWARDT, N. H.; PORTILLO, J. A.; NISC Comparative Sequencing Program; ZIMMERMAN, M. D.; CARTER, C. L.; HOSSEN, M. A.; PEER, C. J.; POLLEY, E. C.; DARTOIS, V.; FIGG, W. D.; MOUTSOPOULOS, N. M.; SEGRE, J. A.; KONG, H. H. Alterations of human skin microbiome and expansion of antimicrobial resistance after systemic antibiotics. **Science Translational Medicine**, v. 13, n. 626, p. eabd8077, Dec. 2021. DOI: 10.1126/scitranslmed.abd8077. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34936382/>. Acesso em: 05. mar. 2023.

JORGENSEN, J. H. ; PFALLER, M. A.; CARROLL, K. C. **Manual of Clinical Microbiology**, 11^a ed. American Society of Microbiology, 2015.

JORQUERA, C. B.; MORENO-SWITT, A. I.; SALLABERRY-PINCHEIRA, N.; MUNITA, J. M.; NAVARRO, C. F.; TARDONE, R.; GONZÁLEZ-ROCHA, G.; SINGER, R. S.; BUENO, I. Antimicrobial resistance in wildlife and in the built

environment in a wildlife rehabilitation center. **One Health**, v. 13, n. 100298, Jul. 2021. DOI: 10.1016/j.onehlt.2021.100298. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8350056/pdf/main.pdf>. Acesso em: 09. mar. 2023.

KARAKONSTANTIS, S.; KALEMAKI, D. Antimicrobial overuse and misuse in the community in Greece and link to antimicrobial resistance using methicillin-resistant *S. aureus* as an example. **The Journal of Infection and Public Health**, v. 12, n. 4, p. 460-464, Aug. 2019. DOI: 10.1016/j.jiph.2019.03.017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30981652/>. Acesso em: 05. mar. 2023.

KARKMAN, A.; DO, T. T.; WALSH, F.; VIRTA, M. P. J. Antibiotic-resistance gene in waste water. **Trends in Microbiology**, v. 26, n. 3, p. 220-228, March 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.09.005>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29033338/>. Acesso em: 24. out. 2022.

KARLOWSKY, J. A.; HOBAN, D. J.; HACKEL, M. A.; LOB, S. H.; SAHM, D. F. Resistance among Gram-negative ESKAPE pathogens isolated from hospitalized patients with intra-abdominal and urinary tract infections in Latin American countries: SMART 2013-2015. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 21, n. 3, p. 343-348, May 2017. DOI: 10.1016/j.bjid.2017.03.006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19035777/>. Acesso em 16. mar. 2023.

KHAMIS, A. M.; ALMUSA, Z.; HASHHOUSH, M.; ALSAIF, N.; SALAM, A.; ATTA M. Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae*: A Retrospective Review of Presentation, Treatment, and Clinical Outcomes in a Tertiary Care Referral Hospital. **Cureus**, v. 14, n. 7, July 2022. DOI: 10.7759/cureus.27094. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9392368/pdf/cureus-0014-00000027094.pdf>. Acesso em: 13. out. 2022.

KONEMAN, E.; WINN JR, W.; ALLEN, S.; JANDA, W.; PROCOP, G.; SCHRECKENBERBER, P.; WOODS, G. **Diagnóstico microbiológico**: texto e atlas colorido. 2018.

KOROSKA, F.; GÖTTIG, S.; KAASE, M.; STEINMANN, J.; GATERMANN, S.; SOMMER, J.; WILLE, T.; PLUM, G.; HAMPRECHT, A. Comparison of Phenotypic Tests and an Immunochromatographic Assay and Development of a New Algorithm for Detection of OXA-48-like Carbapenemases. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 55, n. 3, p. 877-883, Mar. 2017. DOI: 10.1128/JCM.01929-16. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5328455/pdf/zjm877.pdf>. Acesso em: 28. out. 2022.

LASSERRE, C.; MARTIN, L. S.; CUZON, G.; BOGAERTS, P.; LAMAR, E.; GLUPCZYNSKI, Y.; NAAS, T.; TANDÉ, D. Efficient Detection of Carbapenemase Activity in Enterobacteriaceae by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry in Less Than 30 Minutes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 53, n. 7, p. 2163-71, Jul. 2015. DOI: 10.1128/JCM.03467-14. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4473196/pdf/zjm2163.pdf>. Acesso em: 28. out. 2022.

LI, X.; NIKAIDO, H. Efflux-mediated drug resistance in bacteria: an Update. **Drugs**, v. 69, n. 12, p. 1555-1623, Aug. 2009. DOI: 10.2165/11317030-000000000-00000. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2847397/pdf/nihms183678.pdf>. Acesso em: 17. out. 2022.

LI, M.; XIAO, Y.; LI, P.; WANG, Z.; QI, W.; QI, Z.; CHEN, L.; DU, H.; ZHANG, W. Characterization and genome analysis of *Klebsiella* phage P509, with lytic activity against clinical carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* of the KL64 capsular type. **Archives of Virology**, v. 165, n. 12, p. 2799-2806, Dec. 2020. DOI: 10.1007/s00705-020-04822-0. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32989574/>. Acesso em 16. mar. 2023.

LIEN, T. Q.; LAN, P. T.; CHUC, N. T. K.; HOA, N. Q.; NHUNG, P. H.; THOA, N. T. M.; DIWAN, V.; TAMHANKAR, A. J.; LUNDBORG C. S. Antibiotic Resistance and Antibiotic Resistance Genes in *Escherichia coli* Isolates from Hospital Wastewater in Vietnam. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 14, n. 7, p. 699, June 2017. DOI:10.3390/ijerph14070699. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28661465/>. Acesso em: 06. nov. 2022.

LIEN, L.T.Q.; HOA, N. Q.; CHUC, N. T. K.; THOA, N. T. M. T.; PHUC, H. D.; DIWAN, V.; DAT, N. T.; TAMHANKAR, A. J., LUNDBORG, C. S. Antibiotics in wastewater of a rural and an urban hospital before and after wastewater treatment, and the relationship with antibiotic use: a one year study from Vietnam. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 13, n. 6, p. 588, June 2016. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijerph13060588>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27314366/>. Acesso em: 10. dez. 2020.

LIVORSI, D.J.; CHORAZY, M.L.; SCHWEIZER, M.L.; BALKENENDE, E. C.; BLEVINS, A. E.; RAJESHWARI, N.; SAMORE, M. H.; NELSON, R. E.; KHADER, K.; PERENCEVICH, E. N. A systematic review of the epidemiology of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* in the United States. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, v. 7, n. 55, Apr. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13756-018-0346-9>. Disponível em: <https://aricjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13756-018-0346-9#citeas>. Acesso em: 13. out. 2022.

LOGAN, L. K.; WEINSTEIN, R. A. The Epidemiology of Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae*: The Impact and Evolution of a Global Menace. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 215, n. 1, p. 28-36, Feb. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw282>. Disponível em: https://academic.oup.com/jid/article/215/suppl_1/S28/3092084. Acesso em: 14. out. 2022.

MAGAGNIN, C. M; ROZALES, F. P.; ANTOCHEVIS, L.; NUNES, L. S.; MARTINS, A. S.; BARTH, A. L.; SAMPAIO, J. M.; ZAVASCKI, A. P. Dissemination of bla OXA-370 gene among several *Enterobacteriaceae* species in Brazil. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 36, n. 10, p. 1907–10, Oct. 2017.

DOI: <https://doi.org/10.1007/s10096-017-3012-x>. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s10096-017-3012-x>. Acesso em: 19. out. 2022.

MAGALHÃES, M. J.; PONTES, G.; SERRA, P. T.; BALIEIRO, A.; CASTRO, D.; PIERI, F. A.; CRAINEY, J. L.; NOGUEIRA, P. A.; ORLANDI, P. P. Multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* survey in a stream receiving effluents from ineffective wastewater hospital plants. **BMC Microbiology**, v. 16, n. 1, p. 193, Aug. 2016. DOI: 10.1186/s12866-016-0798-0. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4995675/pdf/12866_2016_Article_798.pdf. Acesso em: 24. out. 2022.

MAGIORAKOS, A. P.; SRINIVASAN, A.; CAREY, R. B.; CARMELI, Y.; FALAGAS, M.E.; GISKE, C. G.; HARBARTH, S.; HINDLER, J. F.; KAHLMETER, G.; OLSSON-LILJEQUIST, B.; PATERSON, D. L.; RICE, L.B.; STELLING, J.; STRUELENS, M. J.; VATOPOULOS, A.; WEBER, J. T.; MONNET, D. L. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 3, p. 268-281, Mar. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>. Disponível em: [https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X\(14\)61632-3/fulltext](https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X(14)61632-3/fulltext). Acesso em: 06. jan. 2021.

MAIER, R. M., PEPPER, I. L. Chapter 3 - Bacterial Growth. **Environmental Microbiology (Third Edition)**, p. 37-56, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394626-3.00003-X>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978012394626300003X>. Acesso em: 26. jul. 2023.

MANYI-LOH, C.; MAMPHWELI, S.; MEYER, E.; OKOH, A. Antibiotic Use in Agriculture and Its Consequential Resistance in Environmental Sources: Potential Public Health Implications. **Molecules**, v. 23, n. 4, p. 795, Apr. 2018. DOI:10.3390/molecules23040795. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6017557/>. Acesso em: 05. mar. 2023.

MARTIN, A.; FAHRBACH, K.; ZHAO, Q.; LODISE, T. Association Between Carbapenem Resistance and Mortality Among Adult, Hospitalized Patients With Serious Infections Due to Enterobacteriaceae: Results of a Systematic Literature Review and Meta-analysis. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 5, n. 7, June 2018. DOI: 10.1093/ofid/ofy150. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30046639/>. Acesso em: 14. out. 2022.

MARTINS, W.M.; NICOLETTI, A.G.; SANTOS, S.R.; SAMPAIO, J. L. M.; GALES, A. C. Frequency of BKC-1-producing *Klebsiella* species isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.60, n.8, p.5044-5046, May 2016. DOI: 10.1128/AAC.00470-16. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4958162/pdf/zac5044.pdf>. Acesso em: 18. out. 2022.

MATHERS, A.J.; COX, H. L.; KITCHEL, B.; BONATTI, H.; BRASSINGA, A. K.; CARROLL, J.; SCHELD, W. M.; HAZEN, K. C.; SIFRI, C. D. Molecular dissection of

an outbreak of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* reveals intergenus KPC carbapenemase transmission through a promiscuous plasmid. **MBio**, v. 2, n. 6, p. e00204-11, Nov. 2011. DOI: 10.1128/mBio.00204-11. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3202755/pdf/mBio.00204-11.pdf>. Acesso em: 18. out. 2022.

MCCANN, E.; SRINIVASAN, A.; DERYKE, C. A.; YE, G.; DEPESTEL, D. D.; MURRAY, J.; GUPTA, V. Carbapenem-Nonsusceptible Gram-Negative Pathogens in ICU and Non-ICU Settings in US Hospitals in 2017: A Multicenter Study. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 5, n. 10, Oct. 2018. DOI: 10.1093/ofid/ofy241. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6194421/pdf/ofy241.pdf>. Acesso em: 14. out. 2022.

MCEACHRAN, A. D.; BLACKWELL, B. R.; HANSON, J. D.; WOOTEN, K. J.; MAYER, G. D.; COX, S. B.; SMITH, P. N. Antibiotics, bacteria, and antibiotic resistance genes: aerial transport from cattle feed yards via particulate matter. **Environmental Health Perspectives**, v. 123, n. 4, p. 337-43, Apr. 2015. DOI: 10.1289/ehp.1408555. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25633846/>. Acesso em: 05. mar. 2023.

MELETIS, G.; CHATZIDIMITRIOU, D.; MALISIOVAS, N. Double- and multi-carbapenemase-producers: The excessively armored bacilli of the current decade. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 34, p. 1487–1493, Apr. 2015. DOI: 10.1007/s10096-015-2379-9. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10096-015-2379-9>. Acesso em: 17. Out. 2022.

MESA, R. J.; BLANC, V.; BLANCH, A. R.; CORTÉS, P.; GONZÁLEZ, J. J.; LAVILLA, S.; MIRÓ, E.; MUNIESA, M.; SACO, M.; TÓRTOLA, M. T.; MIRELIS, B.; COLL, P.; LLAGOSTERA, M.; PRATS, G.; NAVARRO, F. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in different environments (humans, food, animal farms and sewage). **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 58, n. 1, Jul. 2006. DOI: 10.1093/jac/dkl211. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16720567/>. Acesso em: 20. mar. 2023.

MEZZATESTA, M. L.; GONA, F.; STEFANI, S. *Enterobacter cloacae* complex: clinical impact and emerging antibiotic resistance. **Future Microbiology**, v. 7, n. 7, p. 887-902, Jul. 2012. DOI: 10.2217/fmb.12.61. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22827309/>. Acesso em: 20. mar. 2023.

MIRANDA, C. C.; FILIPPIS, I.; PINTO, L. H.; COELHO-SOUZA, T.; BIANCO, K.; CACCI, L. C.; PICÃO, R. C.; CLEMENTINO, M. M. Genotypic characteristics of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* from hospital wastewater treatment plant in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 118, n. 6, p. 1276-86, Jun. 2015. DOI: 10.1111/jam.12792. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25752460/>. Acesso em: 09. mar. 2023.

MIYADERA, T.; SUGIMURA, Y.; HASHIMOTO, T.; TANAKA, T.; IINO, K.; SHIBATA, T.; SUGAWARA, S. Synthesis and in vitro activity of a new carbapenem, RS-533.

The journal of antibiotics, v. 36, n. 8, p. 1034–9, Aug. 1983. DOI: <https://doi.org/10.7164/antibiotics.36.1034>. Disponível em: https://www.jstage.jst.go.jp/article/antibiotics1968/36/8/36_8_1034/_pdf/-char/en. Acesso em: 18. out. 2022.

MOGES, F.; ENDRIS, M.; BELYHUN, Y.; WORKU, W. Isolation and characterization of multiple drug resistance bacterial pathogens from waste water in hospital and non-hospital environments, **Northwest Ethiopia. BMC Research Notes**, v. 7, n. 215, Apr. 2014. DOI:10.1186/1756-0500-7-215. Disponível em: <https://bmcresearchnotes.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-0500-7-215>. Acesso em: 04. mar. 2023.

MONTEIRO, J.; SANTOS, A. F.; ASENSI, M. D.; PEIRANO, G.; GALES, A. C. First Report of KPC-2- Producing *Klebsiella pneumoniae* Strains in Brazil. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 53, n. 1, p. 333–4, Jan. 2009. DOI: 10.1128/AAC.00736-08. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2612176/pdf/0736-08.pdf>. Acesso em: 18. out. 2022.

MONTEIRO, J. **Caracterização molecular dos mecanismos de resistência aos antibióticos beta-lactâmicos em *Klebsiella* spp. isoladas de infecções de corrente sanguínea do Projeto SCOPE Brasil**. 2009. 145 f. Tese (Doutorado em Ciências). Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2009. Disponível em: <https://repositorio.unifesp.br/bitstream/handle/11600/39423/Publico-39423.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em 01. nov. 2022.

MORRIS, D.; HARRIS, S.; MORRIS, C.; COMMINS, E.; CORMICAN, M. Hospital effluent: impact on the microbial environment and risk to human health. **Environmental protection agency**, v. 162, Jan. 2016. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/290433979_Hospital_effluent_impact_on_the_microbial_environment_and_risk_to_human_health. Acesso em: 06. nov. 2022.

MOUBARECK, C. A.; HALAT, D. H.; SARTAWI, M.; LAWLOR, K.; SARKIS, D. K.; ALATOOM, A. Assessment of the performance of CHROMagar KPC and Xpert Carba-R assay for the detection of carbapenem-resistant bacteria in rectal swabs: First comparative study from Abu Dhabi, United Arab Emirates. **The Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 20, p. 147-152, Mar. 2020. DOI: 10.1016/j.jgar.2019.07.021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31352026/>. Acesso em: 02. mar. 2023.

MURRAY, C.J.; IKUTA, K.S.; SHARARA, F.; SWETSCHINSKI, L.; AGUILAR, G.R.; GRAY, A. e demais colaboradores da resistência antimicrobiana citados no fim do artigo) Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. **The Lancet**, v. 399, p. 629-655, Feb. 2022. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0). Disponível em: [https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(21\)02724-0/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(21)02724-0/fulltext). Acesso em: 03. out. 2022.

MUTUKU, C.; GAZDAG, Z.; MELEGH, S. Occurrence of antibiotics and bacterial resistance genes in wastewater: resistance mechanisms and antimicrobial resistance

control approaches. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 9, n. 38, p. 152, Jul. 2022. DOI: 10.1007/s11274-022-03334-0. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9250919/>. Acesso em: 26. jul. 2023.

NAAS, T.; OUESLATI, S.; BONNIN, R. A.; DABOS, M. L.; ZAVALA, A.; DORTET, L.; RETAILLEAU, P.; IORGA, B. I. Beta-lactamase database (BLDB) – structure and function. **Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry**, v. 32, n. 1, p. 917–9, Jan. 2017. DOI: 10.1080/14756366.2017.1344235. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6445328/pdf/ienz-32-1344235.pdf>. Acesso em: 18. out. 2022.

NAGSHETTY, K.; SHILPA, B. M.; PATIL, S. A.; SHIVANNAVAR, C. T.; MANJULA, N. G. An Overview of Extended Spectrum Beta Lactamases and Metallo Beta Lactamases. **Advances in Microbiology**, v. 11, p. 37-62, Jan. 2021. DOI: 10.4236/aim.2021.1111004. Disponível em: <https://www.scirp.org/journal/paperinformation.aspx?paperid=106831>. Acesso em: 06. out. 2022.

NAZIR, A.; ZHAO, Y.; LI, M.; MANZOOR, R.; TAHIR, R. A.; ZHANG, X.; QING, H.; TONG, Y. Structural Genomics of repA, repB1-Carrying IncFIB Family pA1705-qnrS, P911021-tetA, and P1642-tetA, Multidrug-Resistant Plasmids from *Klebsiella pneumoniae*. **Infection and Drug Resistance**, v. 13, p. 1889-1903, Jun. 2020. DOI: 10.2147/IDR.S228704. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32606838/>. Acesso em 16. mar. 2023.

NICOLAU, D. P. Carbapenems: a potent class of antibiotics. **Expert Opin Pharmacother**, v. 9, n. 1, p. 23–37, Jan. 2008. DOI: <https://doi.org/10.1517/14656566.9.1.23>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18076336/>. Acesso em: 17. out. 2022.

NICOLETTI, A.G.; MARCONDES, M.F.; MARTINS, W.M.; ALMEIDA, L. G. P.; NICOLÁS, M. F.; VASCONCELOS, A. T. R.; OLIVEIRA, V.; GALES, A. C. Characterization of BKC-1 class A carbapenemase from *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 9, p. 5159-5164, June 2015. DOI: <https://doi.org/10.1128/AAC.00158-15>. Disponível em: <https://asset-pdf.scinapse.io/prod/1776092547/1776092547.pdf>. Acesso em: 18. out. 2022.

NIKAIDO, H. Porins and specific diffusion channels in bacterial outer membranes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 6, p. 3905-3908, Feb. 1994. Disponível em: [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(17\)41716-9/pdf](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(17)41716-9/pdf). Acesso em 17. out. 2022.

NORDMANN, P.; POIREL, L. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among Enterobacteriaceae worldwide. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, n. 9, p. 821-830, Sept. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12719>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24930781/>. Acesso em: 06. nov. 2020.

NORDMANN, P.; POIREL, L. Epidemiology and Diagnostics of Carbapenem Resistance in Gram-negative Bacteria. **Clinical Infectious Diseases**, v. 69, n. 7, p. 521–8, Nov. 2019. DOI: 10.1093/cid/ciz824. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6853758/pdf/ciz824.pdf>. Acesso em: 18. out. 2022.

NORDMANN, P.; GIRLICH, D.; POIREL, L. Detection of carbapenemase producers in *Enterobacteriaceae* by use of a novel screening medium. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 8, p. 2761–2766, Feb. 2012. DOI: 10.1128/JCM.06477-11. Acesso disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22357501/>. Acesso em: 01. mar. 2023.

OLIVEIRA, S.; MOURA, R. A.; SILVA, K. C.; PAVEZ, M.; MCCULLOCH, J. A.; DROPA, M.; MATTE, M. H.; MAMIZUKA, E. M.; SATO, M. I. Z.; CASTRO, A. F. P.; LINCOPAN, N. Isolation of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains belonging to the high-risk multiresistant clonal complex 11 (ST437 and ST340) in urban rivers. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, n. 3, p. 849-52, Mar. 2014. DOI:10.1093/jac/dkt431. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24159156/>. Acesso em: 29. Mar. 2023.

OMS - ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **OMS publica lista de bactérias para as quais se necessitam novos antibióticos urgentemente**. 2017. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/noticias/27-2-2017-oms-publica-lista-bacterias-para-quais-se-necessitam-novos-antibioticos>. Acesso em: 13. Out. 2022.

OTA, Y.; PRAH, I.; NUKUI, Y.; KOIKE, R.; SAITO, R. blaKPC-2-Encoding IncP-6 Plasmids in *Citrobacter freundii* and *Klebsiella variicola* Strains from Hospital Sewage in Japan. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 88, n.8, p. e0001922, Apr. 2022. DOI: 10.1128/aem.00019-22. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9040577/pdf/aem.00019-22.pdf>. Acesso em: 17. jan. 2023.

PAPAGIANNITSIS, C. C.; ŠTUDENTOVÁ, V.; IZDEBSKI, R.; OIKONOMOU, O.; PFEIFER, Y.; PETINAKI, E.; HRABÁK, J. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry meropenem hydrolysis assay with NH₄HCO₃, a reliable tool for direct detection of carbapenemase activity. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 53, n. 5, p. 1731-5, May 2015. DOI: 10.1128/JCM.03094-14. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4400744/>. Acesso em: 28. out. 2022.

PARVEZ, S.; KHAN, A. U. Hospital sewage water: a reservoir for variants of New Delhi metallo-β-lactamase (NDM)- and extended-spectrum β-lactamase (ESBL)-producing *Enterobacteriaceae*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 51, n. 1, p. 82–88, Jan. 2018. DOI:10.1016/j.ijantimicag.2017.08.032. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28887202/>. Acesso em: 16. out. 2022.

PATRIAL, Y. C.; TORTORELLI L. P.; RODRIGUES A. C. S.; SANTOS I. C. O.; VOLPE-CHAVES, C. E.; CAPATO G. S.; BARBOSA G. A. R.; CARVALHO-ASSEF A. P. D.; CHANG M. R. Post-neurosurgical meningitis caused by KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: report of two cases. **Revista do Instituto de Medicina**

Tropical de São Paulo, v. 61, e69, Dez. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1590/s1678-9946201961069>. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-46652019005000510&tlng=en. Acesso em: 06. jan. 2021.

PÉREZ-ETAYO, L.; GONZÁLEZ, D.; LEIVA, J.; VITAS, A. I. Multidrug-Resistant Bacteria Isolated from Different Aquatic Environments in the North of Spain and South of France. **Microorganisms**, v. 9, n. 8, p. 1425, Sep. 2020. DOI: 10.3390/microorganisms8091425. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32947947/>. Acesso em: 26. jul. 2023.

PAULUS, G. K.; HORNSTRA, L. M.; ALYGIZAKIS, N.; SLOBODNIK, J.; THOMAIDIS, N.; MEDEMA, G. The impact of on-site hospital wastewater treatment on the downstream communal wastewater system in terms of antibiotics and antibiotic resistance genes. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 222, n. 4, p. 635-644, May 2019. DOI: 10.1016/j.ijheh.2019.01.004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30737165/>. Acesso em: 29. Mar. 2023.

PRADO, T.; PEREIRA, W. C.; SILVA, D. M.; SEKI, L. M.; CARVALHO, A. P.; ASENSI, M. D. 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, n. 1, p. 136-41, Jan. 2008. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2007.02275.x. Disponível em: <https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/j.1472-765X.2007.02275.x>. Acesso em: 21. out. 2022.

PEREIRA, P. S.; BORGHI, M.; ARAÚJO, C. F. M.; AIRES, C. A. M.; OLIVEIRA, J. C. R.; ASENSI, M. D.; CARVALHO-ASSEF, A. P. D. Clonal Dissemination of OXA-370-Producing *Klebsiella pneumoniae* in Rio de Janeiro, Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 8, p. 4453–6, Aug. 2015. DOI: 10.1128/AAC.04243-14. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4505195/pdf/zac4453.pdf>. Acesso em: 18. out. 2022.

PEREIRA, A. L.; OLIVEIRA, P. M.; FARIA-JUNIOR, C.; ALVES, E. G.; LIMA, G. R. C. C.; LAMOUNIER, T. A. C.; HADDAD, R.; ARAÚJO, W. N. Environmental spreading of clinically relevant carbapenem-resistant Gram-negative bacilli: the occurrence of blaKPC-or-NDM strains relates to local hospital activities. **BMC Microbiology**, v. 22, n. 1, p. 6, Jan. 2022. DOI: 10.1186/s12866-021-02400-1. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34979901/>. Acesso em: 09. mar. 2023.

PERILLI, M.; BOTTONI, C.; PONTIERI, E.; SEGATORE, B.; CELENZA, G.; SETACCI, D.; BELLIO, P.; STROM, R.; AMICOSANTE, G. Emergence of blaKPC-3–Tn4401a in *Klebsiella pneumoniae* ST512 in the municipal wastewater treatment plant and in the university hospital of a town in central Italy. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 1, n. 4, p. 217-220, Dec. 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2013.07.002>. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2213716513000854>. Acesso em: 17. jan. 2023.

PICÃO, R. C.; CARDOSO, J. P.; CAMPANA, E. H.; NICOLETTI, A. G.; PETROLINI, F. V.; ASSIS, D. M.; JULIANO, L.; GALES, A. C. The route of antimicrobial resistance from the hospital effluent to the environment: focus on the occurrence of KPC-producing *Aeromonas* spp. and *Enterobacteriaceae* in sewage. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 76, n. 1, p. 80-5, May 2013. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2013.02.001. Epub 2013 Mar 9. PMID: 23478032. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0732889313000606?via%3Dihub>. Acesso em: 24. out. 2022.

PIERCE, V. M.; SIMNER, P.J.; LONSWAY, D. R.; ROE-CARPENTER, D. E.; JOHNSON, J. K.; BRASSO, W. B.; BOBENCHIK, A. M.; LOCKETT, Z. C.; CHARNOT-KATSIKAS, A.; FERRARO, M. J.; THOMSON, R. B. Jr.; JENKINS, S. G.; LIMBAGO, B. M.; DAS S. Modified Carbapenem Inactivation Method for Phenotypic Detection of Carbapenemase Production among *Enterobacteriaceae*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 55, n. 8, Aug. 2017. DOI: 10.1128/JCM.00193-17. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5527410/>. Acesso em: 26. set. 2022.

POIREL, L.; HÉRITIER, C.; TOLÜN, V.; NORDMANN, P. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 1, p. 15-22, Jan. 2004. DOI: 10.1128/AAC.48.1.15-22.2004. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC310167/>. Acesso em: 17. out. 2022.

POIREL, L.; POTRON, A.; NORDMANN, P. OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, v. 67, n. 7, p. 1597-606, Jul. 2012. DOI: 10.1093/jac/dks121. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22499996/>. Acesso em: 20. out. 2022.

PORCINO, R. A. **Avaliação da atividade combinatória de antimicrobianos contra *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus aureus***. 2018. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular) - Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília, 2018. Disponível em: https://repositorio.unb.br/bitstream/10482/34888/1/2018_RayssaAlvesPorcino.pdf. Acesso em: 17. out. 2022.

PORRECA, A. M.; SULLIVAN, K. V.; GALLAGHER, J. C. The Epidemiology, Evolution, and Treatment of KPC-Producing Organisms. **Current Infectious Disease Reports**, v. 20, n. 6, p. 13, May 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11908-018-0617-x>. Disponível em: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s11908-018-0617-x.pdf>.

QUADRI, F.; MAZER-AMIRSHAHI, M.; FOX, E. R.; HAWLEY, K. L.; PINES, J. M.; ZOCCHI, M. S.; MAY, L. Antibacterial drug shortages from 2001 to 2013: implications for clinical practice. **Clinical Infectious Diseases**, v. 60, n. 12, p. 1737-1742, Jun.

2015. DOI: 10.1093/cid/civ201. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25908680/>. Acesso em: 20. out. 2022.

QUILES, M. G.; ROCCHETTI, T. T.; FEHLBERG, L. C.; KUSANO, E. J. U.; CHEBABO, A.; PEREIRA, R. M. G.; GALES, A.C.; PIGNATARI, A.C.C. Unusual association of NDM-1 with KPC-2 and armA among Brazilian *Enterobacteriaceae* isolates. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 48, n. 2, p. 174-177, Feb. 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/1414-431X20144154>. Disponível em: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s11908-018-0617-x.pdf>. Acesso em: 19. out. 2022.

QUEENAN, A. M.; BUSH, K. Carbapenemases: the Versatile β -Lactamases. **Clinical microbiology reviews**, v. 3, p. 440–58, Jul. 2007. DOI: 10.1128/CMR.00001-07. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1932750/pdf/0001-07.pdf>. Acesso em: 17. out. 2022.

QUEENAN, A. M.; SHANG, W.; FLAMM, R.; BUSH, K. Hydrolysis and Inhibition Profiles of β Lactamases from Molecular Classes A to D with Doripenem, Imipenem, and Meropenem. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 54, n. 1, p. 565–9, Jan. 2010. DOI: 10.1128/AAC.01004-09. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2798497/pdf/1004-09.pdf>. Acesso em: 19. out. 2022.

RABAAN, A. A.; ELJAALY, K.; ALHUMAID, S.; ALBAYAT, H.; AL-ADSANI, W.; SABOUR, A. A.; ALSHIEKHEID, M. A.; AL-JISHI, J. M.; KHAMIS, F.; ALWARTHAN, S.; ALHAJRI, M.; ALFARAJ, A. H.; TOMBULOGLU, H.; GAROUT, M.; ALABDULLAH, D. M.; MOHAMMED, E. A. E.; YAMI, F. S. A.; ALMUHTARESH, H. A.; LIVIAS, K. A.; MUTAIR, A. A.; ALMUSHRIF, S. A.; ABUSALAH, M. A. H. A.; AHMED, N. An Overview on Phenotypic and Genotypic Characterisation of Carbapenem-Resistant *Enterobacteriales*. **Medicina**, v. 58, n. 11, p. 1675, Nov. 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/medicina58111675>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1648-9144/58/11/1675>. Acesso em: 25. jan. 2023.

RABBANI, M. A. G.; HOWLADER, Z. H.; KABIR, Y. Detection of multidrug resistant (MDR) bacteria in untreated waste water disposals of hospitals in Dhaka City, Bangladesh. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 10, p. 120-125, July 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2017.04.009>. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/318473432_Detection_of_multidrug_resistant_MDR_bacteria_in_untreated_waste_water_disposals_of_hospitals_in_Dhaka_City_Bangladesh. Acesso em: 04. fev. 2023.

RARO, O. H. F.; SILVA, R. M. C.; FILHO, E. M. R.; SUKIENNIK, T. C. T.; STADNIK, C.; DIAS, C. A. G.; IGLESIAS, J. O.; PÉREZ-VÁZQUEZ, M. Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* From Transplanted Patients in Brazil: Phylogeny, Resistome, Virulome and Mobile Genetic Elements Harboring blaKPC–2 or blaNDM–1. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 1563, Jul. 2020. DOI: 10.3389/fmicb.2020.01563. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7374196/pdf/fmicb-11-01563.pdf>. Acesso em: 18. out. 2022.

REMYA, P.; SHANTHI, M.; SEKAR, U. Prevalence of *blaKPC* and its occurrence with other beta-lactamases in *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Laboratory Physicians**, v. 10, n. 4, p.387-391, Dec. 2018. DOI: 10.4103/JLP.JLP_29_18. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6210832/pdf/JLP-10-387.pdf>. Acesso em 01. nov. 2022.

RESENDE, A. C. B. **Detecção de microrganismos presentes no efluente hospitalar e na estação de tratamento de efluente de Goiânia: presença de bactérias Gram-negativas resistentes aos antimicrobianos**. 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais e Saúde) - Universidade Católica de Goiás, Goiânia, Goiás. 2009. Disponível em: http://bdtd.ibict.br/vufind/Record/PUC_GO_4b862a94ff2a869b4cfc496254c5577b. Acesso em: 04. fev. 2023.

RESENDE, J. A.; SILVA, V. L.; FONTES, C. O.; SOUZA-FILHO, J. A.; OLIVEIRA, T. L. R.; COELHO, C. M.; CÉSAR, D. E.; DINIZ, C. G. Multidrug-resistance and toxic metal tolerance of medically important bacteria isolated from an aquaculture system. **Microbes and Environments**, v. 27, n. 4, p. 449-55, Sep. 2012. DOI: 10.1264/jsme2.me12049. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22972388/>. Acesso em: 09. mar. 2023.

RESENDE, J. A.; SILVA, V. L.; OLIVEIRA, T. L.; FORTUNATO, S. O.; da Costa CARNEIRO, J. C.; OTENIO, M. H.; DINIZ, C. G. Prevalence and persistence of potentially pathogenic and antibiotic resistant bacteria during anaerobic digestion treatment of cattle manure. **Bioresource Technology**, v. 153, p. 284-91, Feb. 2014. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.12.007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24374028/>. Acesso em: 09. mar. 2023.

RIBEIRO, V. B.; ZAVASCKI, A. P.; NODARI, C. S.; SANDRI, A. M.; SILVA, M. P.; CAMPOS, J. C.; SAMPAIO, J. L.; BARTH, A. L. Detection of *blaKPC-2* in a carbapenem-resistant *Kluyvera georgiana*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 11, p. 2776-7, Nov. 2012. DOI: 10.1093/jac/dks294. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22850690/>. Acesso em: 04. fev. 2023.

RIBEIRO, V. B.; ZAVASCKI, A. P.; ROZALES, F. P.; PAGANO, M.; MAGAGNIN, C. M.; NODARI, C. S.; SILVA, R. C.; DALAROSA, M. G.; FALCI, D. R.; BARTH, A. L. Detection of *bla(GES-5)* in carbapenem-resistant *Kluyvera intermedia* isolates recovered from the hospital environment. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 1, p. 622-3, Jan. 2014. DOI: 10.1128/AAC.02271-13. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24189244/>. Acesso em: 04. fev. 2023.

RIBEIRO, E. A.; DE OLIVEIRA, R. A.; DA GAMA MELO, J. D.; DA SILVA, G. T. P.; CARNEIRO, J. L. S.; DA SILVA, I. K. L. Detecção fenotípica de bactérias Gram-negativas produtoras de carbapenemases em efluente hospitalar na Amazônia no estado do Pará, Brasil. **Revista de Ciências Ambientais e Saúde**, v. 47, n. 1, p. 1 – 11, Dez. 2020. Disponível em:

<https://seer.pucgoias.edu.br/index.php/estudos/article/view/7939/4926>. Acesso em: 01. Fev. 2023.

RÖDEROVÁ, M.; SEDLÁKOVÁ, M. H.; PUDOVÁ, V.; HRICOVÁ, K.; SILOVÁ, R.; IMWENSI, P. E.; BARDONĚ, J.; KOLÁŘ, M. Occurrence of bacteria producing broad-spectrum beta-lactamases and qnr genes in hospital and urban wastewater samples. **New Microbiologica**, v. 39, n. 2, p. 124-33, Apr. 2016. Disponível em: https://www.newmicrobiologica.org/PUB/allegati_pdf/2016/2/124.pdf. Acesso em: 04. fev. 2023.

RODRIGUES, A. C. S.; SANTOS, I. C. O. S.; CAMPOS, C. C.; REZENDE, I. N.; FERREIRA, Y. M.; CHAVES, C. E. V.; ROCHA-DE-SOUZA, C. M.; CARVALHO-ASSEF, A. P. D.; CHANG, M. R. Non-clonal occurrence of pmrB mutations associated with polymyxin resistance in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 114, e180555, Maio 2019. DOI: <https://doi.org/10.1590/0074-02760180555>. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762019000100328&tlng=en. Acesso em: 06. jan. 2021.

RUIZ, L. G. P. **Resistência aos beta-lactâmicos e detecção dos genes blaSHV, blaTEM, blaCTX-M e blaGES em Enterobacteriaceae isoladas de efluentes hospitalar e comunitário em um município do noroeste paulista**. 2010. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2010. Disponível em: https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/94851/ruiz_lgp_me_sjrp.pdf?sequence=1&isAllowed=y. Acesso em: 04. fev. 2023.

SAKKAS, H.; BOZIDIS, P.; ILIA, A.; MPEKOULIS, G.; PAPADOPOULOU, C. Antimicrobial Resistance in Bacterial Pathogens and Detection of Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* Isolates from Hospital Wastewater. **Antibiotics (Basel)**, v. 8, n. 3, p. 85, Jun. 2019. DOI: [10.3390/antibiotics8030085](https://doi.org/10.3390/antibiotics8030085). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31252510/>. Acesso em: 05. fev. 2023.

SAMPAIO, J. L. M.; GALES, A. C. Antimicrobial resistance in *Enterobacteriaceae* in Brazil: focus on β -lactams and polymyxins. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 31-37, Dec. 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.002>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5156504/pdf/main.pdf>. Acesso em: 17. out. 2022.

SAMPAIO, J. L.; RIBEIRO, V. B.; CAMPOS, J. C.; ROZALES, F. P.; MAGAGNIN, C. M.; FALCI, D. R.; SILVA, R. C.; DALAROSA, M. G.; LUZ, D. I.; VIEIRA, F. J.; ANTOCHEVIS, L. C.; BARTH, A. L.; ZAVASCKI, A. P. Detection of OXA-370, an OXA-48-related class D β -lactamase, in *Enterobacter hormaechei* from Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 6, p. 3566-3567, Jun. 2014. DOI: [10.1128/AAC.02510-13](https://doi.org/10.1128/AAC.02510-13). Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4068428/pdf/zac3566.pdf>. Acesso em: 19. out. 2022.

SAMREEN; AHMAD, I.; MALAK, H. A.; ABULREESH, H. H. Environmental antimicrobial resistance and its drivers: a potential threat to public health. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 27, p. 101-111, Dec. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2021.08.001>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213716521001910?via%3Dihub>. Acesso em: 16. out. 2022.

SANTORO, D. O.; CARDOSO, A. M.; COUTINHO, F. H.; PINTO, L. H.; VIEIRA, R. P.; ALBANO, R. M.; CLEMENTINO, M. M. Diversity and antibiotic resistance profiles of *Pseudomonas* from a hospital wastewater treatment plant. **Journal of Applied Microbiology**, v. 119, n. 6, p. 1527-40, Dec. 2015. DOI: 10.1111/jam.12936. Disponível em: <https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/jam.12936>. Acesso em: 04. fev. 2023.

SANTORO, A.; FRANCESCHINI, E.; MESCHIARI, M.; MENOZZI, M.; ZONA, S., VENTURELLI, C.; MARGHERITA, D.; ROGATI, C.; GUARALDI, G.; PAUL, M.; GYSSENS, I. C.; MUSSINI, C. Epidemiology and risk factors associated with mortality in consecutive patients with bacterial bloodstream infection: Impact of MDR and XDR bacteria. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 7, n. 11, p. ofaa461, Sep. 2020. DOI: 10.1093/ofid/ofaa461. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7652098/>. Acesso em: 17. abr. 2023.

SARRIA, J. C.; VIDAL, A. M.; KIMBROUGH, R. C. Infections caused by *Kluyvera* species in humans. **Clinical Infectious Diseases**, v. 33, n. 7, p. E69-74, Oct. 2001. DOI: 10.1086/322686. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11528588/>. Acesso em: 04. fev. 2023.

SEKIZUKA, T.; YATSU, K.; INAMINE, Y.; SEGAWA, T.; NISHIO, M.; KISHI, N.; KURODA, M. Complete Genome Sequence of a blaKPC-2-Positive *Klebsiella pneumoniae* Strain Isolated from the Effluent of an Urban Sewage Treatment Plant in Japan. **mSphere**, v. 3, n. 5, p. e00314-18, Sep. 2018. DOI: 10.1128/mSphere.00314-18. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30232165/>. Acesso em: 29. Mar. 2023.

SILVA, T. S. M. **Qualidade microbiológica do Rio Carioca-RJ: isolamento e identificação de bactérias do grupo dos coliformes termotolerantes e sua suscetibilidade a antimicrobianos**. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública e Meio Ambiente). Fundação Oswaldo Cruz, 2021. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/49219>. Acesso em: 09. fev. 2023.

SOARES, C. R. P.; SILVA, F. R. F.; JÚNIOR, J. B. O.; ARAÚJO, P. S. R.; FIRMO, E. F. Epidemiologia molecular de bacilos Gram-negativos multidroga resistente produtores de carbapenemases isoladas de diferentes sítios de infecção. **Research, Society and Development**, v.10, n.9, p. e30210918070-e30210918070, jul. 2021. DOI: <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i9.18070>. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/18070>. Acesso em: 09. fev. 2023.

SOUSA, A. B. A.; RAMALHO, F. L.; CAMARGO, B. Prevalência de Infecções nosocomiais ocasionadas por *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase

(KPC) em indivíduos hospitalizados. **Brazilian Journal of Health Review**, v.3, n.2, p. 1915-1932, mar. 2020. DOI:10.34119/bjhrv3n2-051. Disponível em: <https://ojs.brazilianjournals.com.br/ojs/index.php/BJHR/article/view/7713/6685>. Acesso em: 09. fev. 2023.

SUAY-GARCÍA, B.; PÉREZ-GRACIA, M. T. Present and Future of Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* (CRE) Infections. **Antibiotics (Basel)**, v. 8, n. 3, p. 122, Aug. 2019. DOI: 10.3390/antibiotics8030122. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6784177/pdf/antibiotics-08-00122.pdf>. Acesso em: 04 out. 2022.

SURGERS, L.; BOERSMA, P.; GIRARD, P.-M.; HOMOR, A.; GENESTE, D.; ARLET, G.; DECREÉ, D.; BOYD, A. Molecular epidemiology of ESBL-producing *E. coli* and *K. pneumoniae*: establishing virulence clusters. **Infection and Drug Resistance**, v. 12, p. 119-127, Dec. 2018. DOI: 10.2147/IDR.S179134. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6318714/pdf/idr-12-119.pdf>. Acesso em: 18. out. 2022.

SURLEAC, M.; BARBU, I.; PARASCHIV, S.; POPA, L. I.; GHEORGHE, I.; MARUTESCU, L.; POPA, M.; SARBU, I.; TALAPAN, D.; NITA, M.; IANCU, A. V.; ARBUNE, M.; MANOLE, A.; NICOLESCU, S.; SANDULESCU, O.; STREINUCERCEL, A.; OTELEA, D.; CHIFIRIUC, M. C. Whole genome sequencing snapshot of multi-drug resistant *Klebsiella pneumoniae* strains from hospitals and receiving wastewater treatment plants in Southern Romania. **PLoS One**, v. 15, n. 1, p. e0228079, Jan. 2020. DOI: 10.1371/journal.pone.0228079. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31999747/>. Acesso em: 04. fev. 2023.

SUZUKI, Y.; NAZARENO, P. J.; NAKANO, R.; MONDOY, M.; NAKANO, A.; BUGAYONG, M. P.; BILAR, J.; PEREZ, M.; MEDINA, E. J.; SAITO-OBATA, M.; SAITO, M.; NAKASHIMA, K.; OSHITANI, H.; YANO, H. Environmental Presence and Genetic Characteristics of Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae* from Hospital Sewage and River Water in the Philippines. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 86, n. 2, p. e01906-19, Jan. 2020. DOI: 10.1128/AEM.01906-19. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6952235/pdf/AEM.01906-19.pdf>. Acesso em: 30. Jan. 2023.

TADA, T.; NHUNG, P.; MIYOSHI-AKIYAMA, T.; SHIMADA, K.; PHUONG, D. M.; ANH, N. Q.; OHMÁGARI, N.; KIRIKAE, T. IMP-51, a novel IMP-type metallo- β -lactamase with increased doripenem- and meropenem-hydrolyzing activities, in a carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 59, n. 11, p. 7090-3, Nov. 2015. DOI: 10.1128/AAC.01611-15. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4604376/pdf/zac7090.pdf>. Acesso em: 19. out. 2022.

TAHERPOUR, A.; HASHEMI, A. Detection of OqxAB efflux pumps, OmpK35 and OmpK36 porins in extended-spectrum- β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates from Iran. **Hippokratia**, v. 17, n. 4, p. 355, Dec. 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4097418/>. Acesso em: 22. jul. 2023.

TAMMA, P. D.; SIMNER, P. J. Phenotypic Detection of Carbapenemase-Producing Organisms from Clinical Isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 56, n. 11, p. e01140-18, Oct. 2018. DOI: 10.1128/JCM.01140-18. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30158194/>. Acesso em: 28. out. 2022.

TANAKA, H.; HAYASHI, W.; IIMURA, M.; TANIGUCHI, Y.; SOGA, E.; MATSUO, N.; KAWAMURA, K.; ARAKAWA, Y.; NAGANO, Y.; NAGANO, N. Wastewater as a Probable Environmental Reservoir of Extended-Spectrum- β -Lactamase Genes: Detection of Chimeric β -Lactamases CTX-M-64 and CTX-M-123. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 22, n. 85, p. e01740-19, Oct. 2019. DOI: 10.1128/AEM.01740-19. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31519655/>. Acesso em: 25. jul. 2023.

THAMLIKITKUL, V.; TIENGRIM, S.; THAMTHAWEECHOK, N.; BURANAPAKDEE, P.; CHIEMCHAI SRI, W. Contamination by antibiotic-resistant bacteria in selected environments in Thailand. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 16, n. 19, p. 3753, Oct. 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijerph16193753>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31590350/>. Acesso em: 12. nov. 2020.

TIJET, N.; PATEL, S. N.; MELANO, R. G. Detection of carbapenemase activity in *Enterobacteriaceae*: comparison of the carbapenem inactivation method versus the Carba NP test. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 71, n. 1, p. 274-6, Jan. 2016. DOI: 10.1093/jac/dkv283. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26374613/>. Acesso em: 28. out. 2022.

TSAI, Y.K.; FUNG, C.P.; LIN, J.C.; CHEN, J.H.; CHANG, F.Y.; CHEN, T.L.; SIU, L. K. *Klebsiella pneumoniae* outer membrane porins OmpK35 and OmpK36 play roles in both antimicrobial resistance and virulence. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 4, p. 1485-1493, Apr. 2011. DOI: 10.1128/AAC.01275-10. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21282452/>. Acesso em: 22. jul. 2023.

TSAI, Y. M.; WANG, S.; CHIU, H. C.; KAO, C. Y.; WEN, L. L. Combination of modified carbapenem inactivation method (mCIM) and EDTA-CIM (eCIM) for phenotypic detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. **BMC Microbiology**, v. 20, n. 315, Oct. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12866-020-02010-3>. Disponível em: <https://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12866-020-02010-3#citea>. Acesso em 28. set. 2022.

UNEP - United Nations Environment Programme. **Environmental Dimensions of Antimicrobial Resistance: Summary for Policymakers, 2022**. Disponível em: https://wedocs.unep.org/bitstream/handle/20.500.11822/38373/antimicrobial_R.pdf. Acesso em: 03. out. 2022.

VAN DER ZWALUW, K.; HAAN, A.; PLUISTER, G. N.; BOOSTMA, H. J.; NEELING, A. J.; SCHOULS, L. M. The carbapenem inactivation method (CIM), a simple and low-cost alternative for the Carba NP test to assess phenotypic carbapenemase

activity in Gram-negative rods. *PLoS One*, v. 10, n. 3, Mar. 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0123690. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25798828/>. Acesso em: 26. set. 2022.

VASOO, S.; CUNNINGHAM, S. A.; KOHNER, P. C.; SIMNER, P. J.; MANDREKAR, J. N.; LOLANS, K.; HAYDEN, M. K.; PATEL, R. Comparison of a novel, rapid chromogenic biochemical assay, the Carba NP test, with the modified Hodge test for detection of carbapenemase-producing Gram-negative bacilli. **Journal of clinical microbiology**, v. 51, n. 9, p. 3097-101, Sep. 2013. DOI: 10.1128/JCM.00965-13 Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3754676/pdf/zjm3097.pdf>. Acesso em: 28. out. 2022.

VERLICCHI, P.; AUKIDY, M. A.; GALLETI, A.; PETROVI, M.; BARCELÓ, D. Hospital effluent: Investigation of the concentrations and distribution of pharmaceuticals and environmental risk assessment. **The Science of Total Environment**, v. 430, p. 109–118, July 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.04.055>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0048969712005876?via%3Di> hub. Acesso em: 11. nov. 2020.

VIDOVIC, N.; VIDOVIC, S. Antimicrobial Resistance and Food Animals: Influence of Livestock Environment on the Emergence and Dissemination of Antimicrobial Resistance. **Antibiotics**, v. 9, n. 2, p. 52, Jan. 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/antibiotics9020052>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2079-6382/9/2/52>. Acesso em: 05. mar. 2023.

VIVAS, R.; DOLABELLA, S. S.; BARBOSA, A. A.T.; JAIN, S. Prevalence of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase - and New Delhi metallo-beta-lactamase-positive *K. pneumoniae* in Sergipe, Brazil, and combination therapy as a potential treatment option. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 53, Apr. 2020. DOI: 10.1590/0037-8682-0064-2020. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rsbmt/a/JMpJtsPZySRtzHXDtXxMfJf/abstract/?lang=en>. Acesso em: 19. out. 2022.

WEINSTEIN, R. A.; GAYNES, R.; EDWARDS, J. R. Overview of Nosocomial Infections Caused by Gram-Negative Bacilli. **Clinical Infectious Diseases**, v. 41, n. 6, p. 848-854, Sep. 2005. DOI: <https://doi.org/10.1086/432803>. Disponível em: <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1086/432803>. Acesso em: 10. out. 2022.

WICKHAM, H. Programming with ggplot2. In ggplot2. **Springer, Cham**, 241-253, Dec. 2014. Disponível em: <https://cran.microsoft.com/snapshot/2015-01-06/web/packages/ggplot2/ggplot2.pdf>. Acesso em 03. maio. 2023.

WILLIAMS, M. R.; STEDTFELD, R. D.; GUO, X.; HASHSHAM, S.A. Antimicrobial resistance in the environment. **Water Environment Research**, v. 88, n. 10, p. 1951–1967, Oct. 2016. DOI: <https://doi.org/10.2175/106143016X14696400495974>. Disponível em:

https://www.researchgate.net/publication/308874713_Antimicrobial_Resistance_in_the_Environment. Acesso em: 15. nov. 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) – ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. 2017. Disponível em: < 89 <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed> . Acesso em: 04. fev. 2023.

YAN, J.; PU, S.; JIA, X.; XU, X.; YANG, S.; SHI, J.; SUN, S.; ZHANG L. Multidrug Resistance Mechanisms of Carbapenem Resistant *Klebsiella pneumoniae* Strains Isolated in Chongqing, China. **Annals of Laboratory Medicine**, v. 37, n. 5, p. 398-407, Sep. 2017. DOI: 10.3343/alm.2017.37.5.398. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28643488/>. Acesso em 16. mar. 2023.

YIGIT, H.; QUEENAN, A. M.; ANDERSON, G. J.; DOMENECH-SANCHEZ, A.; BIDDLE, J. W.; STEWARD, C. D.; ALBERTI, S.; BUSH, K.; TENOVER, F. C. Novel Carbapenem-Hydrolyzing β -Lactamase, KPC-1, from a Carbapenem-Resistant Strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 4, p. 1151–61, Apr. 2001. DOI: <https://doi.org/10.1128/AAC.45.4.1151-1161.2001>. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/epub/10.1128/AAC.45.4.1151-1161.2001>. Acesso em: 18. out. 2022. Acesso em: 18. out. 2022.

YONG, D.; TOLEMAN, M.A.; GISKE, C.G.; CHO, H. S.; SUNDMAN, K.; LEE, K.; Walsh, T. R. Characterization of a new metallo- β -lactamase gene, blaNDM-1, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 12, p. 5046-5054, Dec. 2009. DOI: 10.1128/AAC.00774-09. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2786356/pdf/0774-09.pdf>. Acesso em: 18. out. 2022.

ZAGUI, G. S. **Avaliação da multirresistência a antibióticos e produção de ESBL e carbapenemases em bacilos Gram-negativos de efluente hospitalar e urbano**. Dissertação (Mestrado em Enfermagem em Saúde Pública) - Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/22/22133/tde-04062019-160947/publico/GUILHERMESGOBBIZAGUI.pdf>. Acesso em: 01. fev. 2023.

ZAGUI, G. S.; TONANIA, K. A. A.; FREGONESI, B. M.; MACHADO, G. P.; SILVA, T. V.; ANDRADE, L. N.; SEGURA-MUÑOZ, S. I. Tertiary hospital sewage as reservoir of bacteria expressing MDR phenotype in Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 82, p. e234471, Jul. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1590/1519-6984.234471>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/bjb/a/r7xFBVQyqsXyvjGwwwKpyvj/?format=pdf&lang=en>. Acesso em: 14. mar. 2023.

ZHOU, K.; YU, W.; BONNET, R.; CATTOIR, V.; SHEN, P.; WANG, B.; ROSSEN, J. W.; XIAO, Y. Emergence of a novel *Enterobacter kobei* clone carrying chromosomal-encoded CTX-M-12 with diversified pathogenicity in northeast China. *New Microbes and New Infections*, v. 17, p. 7-10, Jan. 2017. DOI: 10.1016/j.nmni.2017.01.006.

Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28243445/>. Acesso em: 20. mar. 2023.

APÊNDICE A – Formulário de dados de coleta de amostras e teste de laboratório

Material necessário:

Prancheta	isopor com gelo	Frasco de penicilina
Caneta	frasco de vidro estéril – 200 mL	Ágar seletivo para KPC
Corda	Eppendorf com glicerol	Ágar MacConkey
estufa 37 ° C	Alças 1 ul	

COLETA:

Data: ___/___/___		Hora: ___:___		LOCAL:	
Hospitalares			Não hospitalares		
1 – Odontologia – entrada do efluente no hospital		9 - correço Anhanduí			
2 - Unidade coronariana; Enfermaria de clínica médica; Enfermaria pediátrica e Unidade de Terapia Intensiva		10 - centro da cidade			
3 - Pronto Atendimento Médico		11 - bairro Moreninha			
4 - Clínica Cirurgia		12 - indústria da região			
5 - Central de Esterilização de Materiais		13 – reitoria/UFMS (Águas guar.)			
6 - Laboratório Hospitalar		14 – Saída efluente hospital (Águas guar.)			
7 - Enfermaria de ginecologia e obstetrícia					
8 - Saída do efluente do Hospital - Setor de manutenção					

SEMEIO EM ÁGAR MACCONKEY:

Data: ___/___/___	Hora: ___:___	Incubação a 37°C
--------------------------	----------------------	-------------------------

LEITURA INCUBAÇÃO:

Data: ___/___/___		Hora: ___:___	
Tipo colônia	Quantidade	Tipo colônia	Quantidade

CULTIVO EM ÁGAR SELETIVO PARA KPC. Data: ___/___/___ / **Incubação a 37°C**

LEITURA ÁGAR KPC: Data: ___/___/___			Hora: ___:___		
Tipo colônia no MC	Cor da colônia no Ágar Seletivo	Provável identificação			

APÊNDICE B – Relação de bactérias identificadas e resultados

Data coleta	Local	N da amostra	Identificação no Vitek	Presença gene KPC	M/PM	IPM	ERT	AMI	AMC	ATM	GAZ	CPM	CRO	CIP	PIT	GEN	CZA	C/T	MDR/XDR/PAN
08/09/2021	Pronto Atendimento Médico	A1L3	Enterobacter cloacae complex	POS	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	XDR
08/09/2021	Clínica Cirurgia	A1L4	Enterobacter cloacae complex	POS	R	R	R	NT	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	XDR
08/09/2021	Saída do efluente do Hospital	A1L8	Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae	POS	R	R	R	NR	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	XDR
08/09/2021	Saída do efluente do Hospital	A1L8	Klebsiella pneumoniae ssp ozaenae	POS	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	S	S	XDR
29/10/2021	UCO; Enfermaria de clínica médica e pediátrica e UTI	A2L2	Klebsiella oxytoca	POS	R	R	R	NT	R	I	I	I	R	S	R	R	S	S	MDR
29/10/2021	UCO; Enfermaria de clínica médica e pediátrica e UTI	A2L2	Citrobacter farmeri	POS	R	NT	R	S	R	R	I	S	R	R	R	R	S	R	MDR
29/10/2021	Clínica Cirurgia	A2L4	Kluyvera intermedia	POS	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	XDR
29/10/2021	Clínica Cirurgia	A2L4	Klebsiella pneumoniae ssp ozaenae	POS	R	R	R	NT	R	R	R	I	R	S	R	S	S	R	MDR
19/11/2021	Saída do efluente do Hospital	A3L14	Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae	POS	R	NT	R	R	R	R	R	I	R	S	R	S	S	R	MDR
03/12/2021	Saída do efluente do Hospital	A4L8	Citrobacter farmeri	POS	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	XDR
07/01/2022	Saída do efluente do Hospital	A5L14	Enterobacter cloacae complex	POS	R	NT	R	NT	R	R	I	I	R	R	R	R	S	S	XDR
11/02/2022	Pronto Atendimento Médico	A6L3	Enterobacter cloacae complex	POS	R	NT	R	NT	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	XDR
11/02/2022	Pronto Atendimento Médico	A6L3	Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae	POS	R	NT	R	NT	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	PAN
11/02/2022	Saída do efluente do Hospital	A6L8	Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae	POS	R	NT	R	NT	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	XDR
11/02/2022	Saída do efluente do Hospital	A6L8	Klebsiella oxytoca	POS	R	NT	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	PAN
11/02/2022	Saída do efluente do Hospital	A6L14	Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae	POS	R	NT	R	R	R	R	I	R	S	R	S	R	S	R	MDR

ANEXO 1 – Autorização do Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian


**RESOLUÇÃO Nº 48, DE 21 DE JULHO DE 2021**

O COLEGIADO EXECUTIVO DO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO “MARIA APARECIDA PEDROSSIAN” DA FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL, no uso de suas atribuições legais e regimentais, nos termos do art. 6º da Lei nº 12.550, de 15 de dezembro de 2011, dos arts. 60, 61 e 62 do Regimento Interno da Ebserh e dos arts. 6º, 7º e 8º do Regimento Interno do Humap-UFMS, conforme reunião ordinária realizada no dia 21 de julho de 2021, **RESOLVE:**

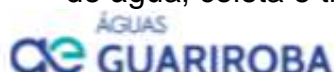
Art. 1º - Aprovar os projetos de pesquisa abaixo relacionados:

Protocolo GEP 31/2021

- a) Título do projeto: Caracterização de enterobactérias multidroga resistente isoladas de efluente hospitalar e não hospitalar em Campo Grande/MS
 - b) Pesquisador: Denise Leme Di Raimo Gonçalves
 - c) Orientador: Marilene Rodrigues Chang
 - d) Categoria: Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste - UFMS
- a) Período: julho de 2021 a março de 2023
 - b) Financiamento: próprio
 - c) Local de execução: CCIH, DLIH e LAC
 - d) CAAE: Não se aplica


CLÁUDIO CÉSAR DA SILVA

ANEXO 2 – Autorização para coleta da concessionária responsável pelos serviços de água, coleta e tratamento de efluente de Campo Grande, MS



Campo Grande - MS, 24 de setembro de 2021.

Carta n. 2139/2021

Protocolo n. 2082/2021

Ao Ilmo. Profa. Dra.

Marilene Rodrigues Chang

Docente do Programa de Pós-Graduação Pós – Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região

Centro – Oeste, FAMED/UFMS

Rua Ricardo Brandão, nº 1.600 – Bairro Jatiúka Park, Campo Grande/MS

Ref.: Em atendimento a Carta nº 01/2021 – Laboratório de Pesquisa Microbiológicas/ FACFAN/UFMS.

Prezada Profa. Dra,

ÁGUAS GUARIROBA S.A., Concessionária dos Serviços Públicos de Abastecimento de Água Potável e de Esgotamento Sanitário do Município de Campo Grande (MS) (Águas Guariroba ou Concessionária), por intermédio da sua Diretoria, informa o que segue.

Em atenção a solicitação feita através da Carta nº 01/2021 – Laboratório de Pesquisa Microbiológicas/ FACFAN/UFMS, vimos informar que a empresa Águas Guariroba, através do setor de Manutenção de Esgoto se disponibiliza a fornecer as informações e acompanhar a visita para a coleta no ponto que atende a necessidade descrita no ofício em questão. Para isso disponibilizamos os contatos, a seguir, para agendamento prévio de 24 horas antes da data da visita:

José Ricardo: (67) 99295 – 8358

Maycon Rodrigues: (67) 99818 -8508

Certos de podermos contar com a vossa valiosa atenção, colocamo-nos à disposição para quaisquer esclarecimentos que se façam necessários.

Reiteramos, por oportuno, votos de elevada estima e distinta consideração.

Atenciosamente,

Rodrigo Moraes de Souza
Rodrigo Moraes de Souza
Gerente de Serviços

Themis Oliveira
Themis de Oliveira
Diretor Presidente

ANEXO 3 – Procedimento para extração de DNA in house

Extração DNA Triton in house



Category Experimental Procedures

Author James Venturini

Version 1

Labels: genomic DNA isolation DNA

Material

Tampão de extração.
Beads de vidro ou zircônio.
Proteinase-K.
Fenol:Clorofórmio:Álcool Isoamílico (25:24:1).
Frasco para descarte de Fenol:Clorofórmio:Álcool Isoamílico.
isopropanol.
Acetato de amônio 5M.
Etanol 70%.
Água ultrapura.
Microtubo para maceração.
Microtubo de 1.5ml.
Ponteiras para micropipeta P1000.
Ponteiras para micropipeta P200.
Ponteiras para micropipeta P20.
EPI.
Gel de agarose.
Tampão TBE 1x.
Corante para eletroforese (geired).
Papel alumínio.

Equipamentos

Macerador.
Termostato.
Centrífuga de microtubos.
Vórtex.
Conjunto de micropipetas (P1000, P200, P20).
Cabine de segurança.
Cuba de Eletroforese.

Tampão de extração

Fonte: Sepúlveda et al. (2017). <https://doi.org/10.1128/mBio.01339-17>

1mM EDTA
10mM Tris (pH 8.0)
1% SDS
2% Triton X-100
100 mM NaCl

Amostras

Para culturas de fungos, utilizar cerca de 1 alça de material.

Método de Extração

DIA 1

1. Adicionar a amostra num microtubo de maceração contendo as beads e 200uL de água ultrapura.
2. Levantar ao macerador por 3 ciclos de 60 segundos, com intervalo de 30 segundos entre os ciclos.
3. Dar um spin nos microtubos antes de abrir.
4. Adicionar 500uL de tampão de extração e 20uL de Proteinase-K.
5. Vórtex por 30 segundos.
6. Incubar no Termobloco, a 65°C por 1hora, com agitação dos tubos a cada 20 minutos.
7. Dar um spin nos microtubos antes de abrir.
8. Adicionar 500uL de Fenol:Clorofórmio:Álcool Isoamílico (25:24:1).
9. Vórtex por 30 segundos.
10. Centrifugar a 12000 rpm por 15 minutos.
11. Transferir o sobrenadante para um microtubo de 1.5ml contendo 500uL de Isopropanol e 50uL de Acetato de amônio 5M.
12. Misturar o microtubo gentilmente por inversão.
13. Manter em freezer -20°C overnight.

DIA 2

1. Centrifugar a 12000 rpm por 20 minutos.
2. Descartar o sobrenadante e manter o pellet.
3. Adicionar 500uL de Etanol 70%.
4. Centrifugar a 12000 rpm por 5 minutos.
5. Descartar o sobrenadante e manter o pellet.
6. Dar um spin nos microtubos e retirar o Etanol excedente com uma ponteira de 20uL.
7. Evaporar o Etanol residual no termobloco a 37°C mantendo os microtubos abertos.
8. Eluir com 100uL de Água ultrapura.
9. Armazenar em freezer -20°C para uso imediato, ou freezer -80°C para uso a longo prazo.

Eletroforese

Para conferência do sucesso da extração, realizar uma eletroforese em gel de agarose 1%.

Em uma placa de 96 poços coberta com papel alumínio misturar 3uL da amostra de DNA e 3uL do corante de eletroforese.

Aplicar a amostra corada no gel de agarose com uma pipeta de 10uL.

Configuração: 100V, 300mA, 1hora.

Observação

Para quantificação em Nanodrop deve-se tratar as amostras com RNase.

Attachments

No file attachments

This procedure was originally created by James Venturini

 Powered by eLabNext