



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MICROBIANA**

PÂMELA MARIA DE OLIVEIRA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS DE *Klebsiella pneumoniae*
RESISTENTES A CARBAPENEM RECUPERADOS DE ESTAÇÕES DE
TRATAMENTO DE ESGOTO NO DISTRITO FEDERAL**

BRASÍLIA, DF

2020

PÂMELA MARIA DE OLIVEIRA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS DE *Klebsiella pneumoniae*
RESISTENTES A CARBAPENEM RECUPERADOS DE ESTAÇÕES DE
TRATAMENTO DE ESGOTO NO DISTRITO FEDERAL**

Dissertação apresentada como requisito para
conclusão do curso de Mestrado em Biologia
Microbiana da Universidade de Brasília.

Orientador: Prof.^a. Larissa Fernandes Matos

Coorientador: Prof. Dr. Alex Leite Pereira

BRASÍLIA, DF

2020

PÂMELA MARIA DE OLIVEIRA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS DE *Klebsiella pneumoniae*
RESISTENTES A CARBAPENEM RECUPERADOS DE ESTAÇÕES DE
TRATAMENTO DE ESGOTO NO DISTRITO FEDERAL**

BANCA EXAMINADORA

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

Prof^a. Dr^a. Cynthia Maria Kyaw
(IB/Universidade de Brasília)

Prof^a. Dr^a. Fabiana Brandão Alves da Silva
(FS/Universidade de Brasília)

BRASÍLIA- DF, 2020

Aos meus pais Hilariana e Paulo,

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela oportunidade da vida, pelos desafios, pela família, pelos amigos. Por ser onipresente em cada detalhe e dar sentido a tudo.

Aos meus pais, Hilariana e Paulo, por todo apoio e por sempre acreditarem em mim, sem vocês nada disso seria possível. Obrigada por serem esses pais sempre presentes, que me educaram e ensinaram valores preciosos. Agradeço aos meus irmãos, Lucas e Gabriel, pelo apoio e amizade. Amo vocês!

Ao meu namorado, Diego, por me motivar e inspirar sempre. Obrigada por ser meu parceiro em tudo, por todo amor, compreensão e por me fazer feliz.

A minha prima, Morgana, por ser sempre leve e doce. Minha irmã de coração. Obrigada pelas conversas e risadas.

Ao meu orientador Alex pela oportunidade de desenvolver um projeto tão importante, por acreditar em mim e me dar todo apoio. Obrigada pela paciência, ensinamentos, conversas e por ter esse dom de ensinar. Quem tem você como professor, orientador, ou simplesmente amigo, tem sorte.

Agradeço grandemente a professora Larissa pelo apoio, prestatividade e pela confiança.

Agradeço aos amigos que fiz no amado e querido “lab 2” que me ensinaram, ajudaram e tornaram meus dias muito mais leves: Flaviane, Daniely, Danielly, Jéssica, Fabi, Érica, Laura, Fernanda e Verônica. Obrigada pela amizade e por toda ajuda!

Agradeço a equipe da FCE que zela pelos laboratórios, desde as meninas da limpeza Denise e Marilene, técnicos Elias, Nara, Lauro, Fred, Fernanda até as moças que controlam o acesso aos laboratórios Helena e Vilene.

Agradeço a equipe do LACEN-DF por todo apoio: Célio, Everton, Agenor, James, Eli, Lilian, Oswaldo e Lizandra. Agradeço em especial ao Célio pela confiança e por toda ajuda.

Agradeço a FCE/UnB que foi minha segunda casa nesses dois anos. Foi o lugar onde tive oportunidade única de me desenvolver e ter contato com pessoas incríveis.

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho.

RESUMO

A disseminação ambiental de *K. pneumoniae* resistente a carbapenem (carba-R) é relatada globalmente e representa uma ameaça à saúde pública. Isolados de *K. pneumoniae* carba-R recuperados de estações de tratamento de esgoto (ETE) foram caracterizados quanto a suscetibilidade a antimicrobianos, a presença de genes de carbapenemases (*bla_{KPC}*, *bla_{VIM}*, *bla_{IMP}*, *bla_{OXA-48}* e *bla_{NDM}*) e complexos clonais (CC). Foram recuperados 154 isolados de *K. pneumoniae* carba-R, a maioria (55,8%) recuperada de amostras de esgoto bruto. Não foram recuperados isolados de *K. pneumoniae* carba-R em amostras de água coletadas a montante das ETEs. Os isolados apresentaram frequência de resistência superior a 99% para β-lactâmicos, 90% para quinolonas e 48% para aminoglicosídeos. *bla_{KPC}* foi detectado em 98 isolados (63,6%); seguido de *bla_{NDM}* em 54 isolados (35,1%). Os genes *bla_{VIM}*, *bla_{IMP}* e *bla_{OXA-48}* não foram detectados. Isolados de *K. pneumoniae* portando *bla_{KPC}* ou *bla_{NDM}* (*bla_{KPC/NDM}*) foram recuperados de 91% das ETEs. Em 45% das ETEs foram detectados isolados *bla_{KPC/NDM}* a jusante da ETE. O CC11 foi frequentemente (47%) detectado em cepas de *K. pneumoniae* portando *bla_{KPC/NDM}*, seguido do CC15 (9,8%). Este estudo mostra que o esgoto é um importante reservatório para clones epidêmicos (CC11 e CC15) de *K. pneumoniae* portando *bla_{KPC/NDM}*, e que ETEs contribuem para dispersão ambiental destes isolados.

Palavras-chave: *K. pneumoniae*, carbapenemase, estação de tratamento de esgoto

ABSTRACT

The environmental spread of carbapenem-resistant (carba-R) *K. pneumoniae* is globally reported and threatens the public health. Isolates of *K. pneumoniae* carba-R recovered from sewage treatment plants (STP) were characterized for the susceptibility to antimicrobials, the presence of carbapenemase genes (*bla_{KPC}*, *bla_{VIM}*, *bla_{IMP}*, *bla_{OXA-48}* e *bla_{NDM}*) and clonal complexes (CC). One hundred and fifty four isolates of *K. pneumoniae* carba-R were recovered, most of them (55.8%) recovered from raw sewage samples. No *K. pneumoniae* carba-R isolate was recovered from water samples collected upstream from the STPs. The isolates showed frequency of resistance higher than 99% to β -lactams, 90% to quinolones and 48% to aminoglycosides. *bla_{KPC}* was detected in 98 isolates (63.6%); followed by *bla_{NDM}* in 54 isolates (35.1%). The genes *bla_{VIM}*, *bla_{IMP}* and *bla_{OXA-48}* not detected. Isolates of *K. pneumoniae* carrying *bla_{KPC}* or *bla_{NDM}* (*bla_{KPC/NDM}*) were recovered from 91% of the STPs. In 45% of the STPs, isolates *bla_{KPC/NDM}* were detected downstream from the STPs. CC11 was frequently (47%) detected in *K. pneumoniae* strains carrying *bla_{KPC/NDM}*, followed by CC15 (9.8%). This study shows that sewage is a concerning reservoir of epidemic clones (CC11 and CC15) of *K. pneumoniae* carrying *bla_{KPC/NDM}* and that STPs contribute for spreading these isolates into environment.

Keywords: *K. pneumoniae*, carbapenemase, sewage treatment plants

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS.....	10
LISTA DE TABELAS	11
LISTA DE ABREVIÇÕES E SÍMBOLOS	12
1. INTRODUÇÃO	13
1.1. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	13
1.2. β -lactâmicos	13
1.2.1 Carbapenem.....	14
1.3. Resistência a β -lactâmicos.....	15
1.4 Resistência a carbapenem	18
1.5 Dispersão da resistência a carbapenem	20
1.5.1 Linhagens genética associadas à dispersão de <i>bla</i> _{KPC} e <i>bla</i> _{NDM}	22
1.5.2 <i>Tn4401</i> como principal elemento carreador de <i>bla</i> _{KPC}	25
1.6. Resistência a polimixina e a tigeciclina	25
1.7. Disseminação ambiental da resistência a carbapenem	27
2. JUSTIFICATIVA.....	31
3. OBJETIVOS.....	32
3.1. Geral.....	32
3.2. Específicos	32
4. METODOLOGIA	33
4.1. Coleta das amostras	33
4.2. Isolados bacterianos	38
4.3. Identificação bacteriana.....	38
4.4. Teste de suscetibilidade a antimicrobianos	38
4.5. Detecção molecular de genes de carbapenemases e do transposon <i>Tn4401</i> por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	39
4.6. Detecção molecular de genes <i>mcr</i> e <i>tetX</i> por meio de PCR quantitativo (qPCR)	44
4.7. Sequenciamento genético de alelos <i>bla</i> _{KPC} e <i>bla</i> _{NDM}	45
4.8. Tipagem por sequenciamento de múltiplos <i>loci</i> (MLST)	45
4.9. Análise filogenética e construção do dendrograma	45
4.10. Análise de dados	46

4.10.1	Análise estatística	46
4.10.2	Categorização das ETEs em função do perfil de demanda	46
4.11.	Financiamento	46
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1.	Ocorrência de BGN carba-R em amostras de água e esgoto	47
5.2.	Ocorrência de <i>K. pneumoniae</i> em meio a BGN carba-R.....	48
5.3.	Perfil de suscetibilidade dos isolados de <i>K. pneumoniae</i> carba-R	50
5.4.	Frequência de genes de carbapenemases em isolados de <i>K. pneumoniae</i> carba- R.....	53
5.5.	Sequenciamento genético de <i>bla_{KPC}</i> e <i>bla_{NDM}</i>	59
5.6.	Ocorrência de <i>Tn4401</i> em isolados de <i>K. pneumoniae</i> positivos para <i>bla_{KPC}</i>	59
5.7.	Frequência de genes de resistência a polimixina e a tigeciclina	60
5.8.	Tipos de sequência (ST) e complexos clonais (CC) em cepas ambientais de <i>K. pneumoniae</i> carba-R	60
5.9.	Análise filogenética de isolados clínicos e ambientais de <i>K. pneumoniae</i> carba-R	63
6.	CONCLUSÃO	67
7.	PERSPECTIVAS.....	68
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

Figura 1. Estrutura química da tienamicina e do imipenem

Figura 2. A resistência a β -lactâmicos é multifatorial e conduzida por vários mecanismos

Figura 3. Hidrólise do anel β -lactâmico por ação de β -lactamases.

Figura 4. Mecanismos de hidrólise de β -lactâmicos por serina- β -lactamases e metalo- β -lactamases

Figura 5. Relato inicial e padrão epidemiológico da ocorrência de bactérias produtoras de KPC em diferentes países

Figura 6. Representação do posicionamento referente às ETEs dos pontos de coleta das amostras

Figura 7. Culturas positivas para BGN carba-R e isolamento de *K. pneumoniae* nas amostras de água e esgoto

Figura 8. Quadro com perfil de suscetibilidade e ocorrência de *bla*_{KPC} e *bla*_{NDM} em isolados ambientais de *K. pneumoniae* carba-R

Figura 9. Dendrograma demonstrando a relação filogenética entre cepas ambientais e clínicas de *K. pneumoniae* carba-R

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Perfil alélico do ST ancestral 11 e demais integrantes do complexo clonal 11

Tabela 2. Carbapenemases adquiridas em bactérias recuperadas de fontes não-humanas

Tabela 3. Estações de Tratamento de Esgoto e parâmetros de demanda associados

Tabela 4. Lista dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados e condições de PCR

Tabela 5. Lista de oligonucleotídeos iniciadores e sondas de hidrólise utilizados para qPCR

Tabela 6. Categorização das ETEs em função dos parâmetros de demanda

Tabela 7. Frequência de resistência dos isolados de *K. pneumoniae* carba-R

Tabela 8. Frequência de distribuição de isolados *K. pneumoniae* positivos para genes *bla* nas amostras analisadas

Tabela 9. Distribuição dos isolados de *K. pneumoniae* carba-R portando *bla*_{KPC} ou *bla*_{NDM} em função do tipo de amostra e ETEs

Tabela 10. Análise de frequência dos BGN_{KPC/NDM} em função dos parâmetros associados às ETEs

Tabela 11. Perfil alélico, tipo de sequência (ST), complexo clonal (CC) e gene *bla* associados a cepas ambientais de *K. pneumoniae* carba-R

LISTA DE ABREVIações E SÍMBOLOS

AJ – Água coletada a jusante do ponto de despejo de esgoto	ST – <i>Sequence type</i>
AM – Água coletada a montante do ponto de despejo de esgoto	TSB – Caldo Soja Trypticaseína
BGN – Bacilo Gram negativo	TAE - Tris-acetato-EDTA
<i>bla</i> – β -lactamase	VIM - <i>Verona integron–encoded metallo-β- lactamase</i>
CC – Complexo clonal	μ L – microlitro
CLSI - <i>The Clinical And Laboratory Standards Institute</i>	
dNTP – Desoxirribonucleotídeos trifosfato	
EB – Esgoto Bruto	
ESBL – β -lactamase de espectro estendido	
ET – Esgoto Tratado	
ETE – Estação de Tratamento de Esgoto	
IMP – Imipenemase	
KPC - <i>Klebsiella pneumoniae carbapenemase</i>	
LPS - Lipopolissacarídeo	
MALDI-TOF - <i>Matrix Associated Laser Desorption-Ionization - Time of Flight</i>	
<i>mcr</i> – <i>mobilized colistin resistance</i>	
NDM - <i>New Delhi metallo-β-lactamase</i>	
OXA - <i>Oxacillin-hydrolyzing</i>	
PCR – Reação em Cadeia da Polimerase	
PFGE – <i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i>	
qPCR – Reação em Cadeira da polimerase quantitativa	

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Klebsiella pneumoniae*

A espécie *Klebsiella pneumoniae* compreende bactérias Gram negativas produtoras de cápsula (glicocálice), da família das enterobactérias, encontradas em solo, água, vegetação e, de forma fixa ou transiente, no trato intestinal e orofaringe de seres humanos (BAGLEY, 1985). Isolados desta espécie são importantes patógenos hospitalares sendo comumente recuperados de pneumonia, infecções do trato urinário e septicemia. Grupos de risco como neonatos, idosos e imunodeprimidos são os principais afetados por infecções oportunistas causadas por esta espécie (KONEMAN et al., 2008; MARTIN; BACHMAN, 2018). *K. pneumoniae* se tornou um dos principais agentes etiológicos de infecções hospitalares nas últimas décadas e sua importância como patógeno nosocomial atualmente é incontestável (MORADIGARAVAND et al., 2017).

1.2 β -lactâmicos

Na era pré-antibiótico, infecções bacterianas ganhavam proporções epidêmicas e causavam a morte de milhares de pessoas (MOHR, 2016). Em meados dos anos 1900, numa época conhecida como “a idade de ouro dos antibióticos”, vários antimicrobianos foram descobertos. Uma das primeiras classes descobertas foram os β -lactâmicos, em meados de 1928, por Alexander Fleming. Em seus estudos, Fleming notou que uma substância produzida pelo fungo *Penicillium notatum* inibia o crescimento de bactérias. Mais tarde, essa mesma substância foi denominada penicilina, sendo produzida em larga escala a partir dos anos 1940, o que foi um marco na história da medicina moderna (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012; MOHR, 2016).

β -lactâmicos compartilham um grupo funcional comum, o anel β -lactâmico, que é o responsável pelo efeito bactericida. β -lactâmicos agem impedindo a síntese da parede celular bacteriana ao se ligar e inibir proteínas de ligação à penicilina (PBPs). As PBPs têm a função de catalizar as reações de transpeptidação na formação do peptidoglicano, componente essencial da parede celular. Sem a ação das PBPs, a célula bacteriana perde a capacidade de manter sua integridade física e sofre lise por ruptura osmótica (CHO; UEHARA; BERNHARDT, 2014).

Com a introdução e uso em larga escala da penicilina na terapêutica, mecanismos de resistência a β -lactâmicos emergiram, gerando demanda por

antibacterianos mais eficazes. Em meados de 1960, a resistência a β -lactâmicos causada pela produção de β -lactamases começou a emergir, pondo em risco o sucesso terapêutico da penicilina. Nesse cenário, novos representantes da classe β -lactâmicos com diferentes espectros de ação foram descobertos, desenvolvidos ou aprimorados molecularmente, sendo aos poucos inseridos no mercado. β -lactâmicos são classificados em quatro grupos: penicilinas, cefalosporinas, monobactams e carbapenens (ESSACK, 2001). Antibióticos β -lactâmicos são amplamente utilizados no tratamento de infecções bacterianas devido sua eficácia e segurança clínica, conferida pela ação específica sobre PBP's bacterianas (BUSH; BRADFORD, 2016).

1.2.1 Carbapenem

Os carbapenens são derivados da tienamicina, produto natural produzido pela espécie Gram positiva *Streptomyces cattleya*. A tienamicina, descoberta em meados de 1978, exibia ampla atividade antibacteriana, porém era quimicamente instável. Apesar disso, a tienamicina funcionou como composto-modelo para síntese dos demais carbapenens, que compartilham do seu núcleo carbapenêmico (PAPP-WALLACE et al., 2011). A síntese do primeiro derivado, denominado imipenem, resultou em um produto com estabilidade e propriedades antibacterianas significativamente superior à tienamicina (Figura 1) (KAHAN et al., 1983).

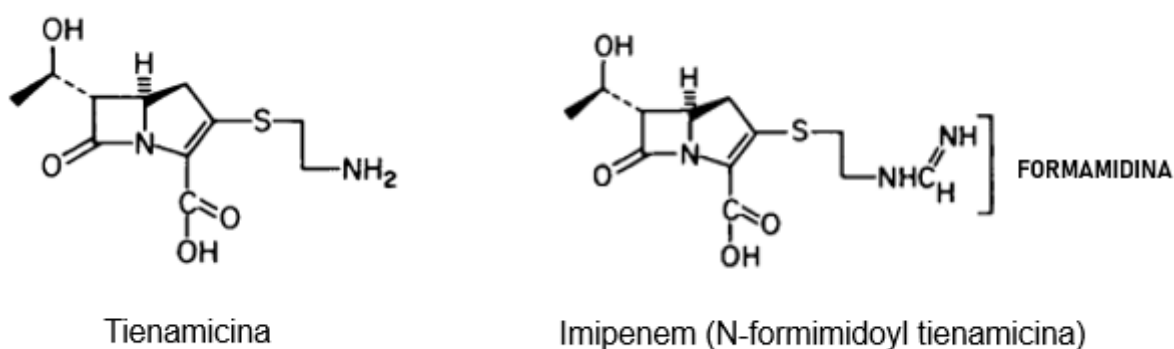


Figura 1. Estrutura química da tienamicina e do imipenem (Adaptado de KAHAN, 1983).

Os carbapenens foram o último grupo de antibióticos β -lactâmicos a serem lançados e, dentre os β -lactâmicos, possuem o maior espectro de atividade com ação contra bactérias Gram negativas e Gram positivas. Além disso, são estáveis contra a

ação da maioria das β -lactamases, incluindo β -lactamases de espectro estendido (ESBL), que são capazes de hidrolisar penicilinas e cefalosporinas de 1ª a 3ª geração (NICOLETTI; RUSSO; BONFIGLIO, 2002). Para exercer sua ação bactericida em Gram negativos, os carbapenens devem alcançar o espaço periplasmático entre a membrana externa e a membrana citoplasmática. Este trânsito ocorre através de canais presentes na membrana, denominados porinas. Acredita-se que a capacidade de atravessar esses canais, somada a alta afinidade a PBPs e resistência a ampla gama de β -lactamases fundamentam o amplo espectro de atividade deste grupo de antibióticos. E em virtude do amplo espectro de ação, carbapenens são de uso exclusivo hospitalar, reservados como antibióticos de último recurso para o tratamento de infecções graves, frequentemente causadas por bactérias multirresistentes (NICOLAU, 2007; NICOLETTI; RUSSO; BONFIGLIO, 2002).

1.3 Resistência a β -lactâmicos

Estudos mostram que a resistência antimicrobiana precede o uso de antibióticos (PERRY; WAGLECHNER; WRIGHT, 2016). D'Costa et al. (2011) relataram a presença de genes de resistência a β -lactâmicos, glicopeptídeos e tetraciclinas em amostras datadas de 30.000 anos de pergelissolo (tipo de solo constituído por terra, gelo e rochas permanentemente congelados). Os mecanismos de resistência representam alternativas de defesa que as bactérias possuem para sobreviver e competir contra diversos tipos de ameaças em seus diversos habitats. Apesar dos mecanismos de resistência serem originalmente estratégias naturais de sobrevivência e competitividade entre microrganismos, a pressão seletiva e artificial criada pelo uso de agentes antimicrobianos está, de forma gradual e contínua, selecionando e disseminando bactérias portadoras de mecanismos de resistência altamente sofisticados (BAQUERO; ALVAREZ-ORTEGA; MARTINEZ, 2009; MARTÍNEZ; COQUE; BAQUERO, 2014).

A resistência a β -lactâmicos em bactérias Gram negativas ocorre por diversos mecanismos: inativação mediada por enzimas; diminuição da permeabilidade da membrana externa por mutação, perda de expressão ou substituição de porinas; ou expressão de bombas de efluxo (Figura 2) (ARZANLOU; CHAI; VENTER, 2017).

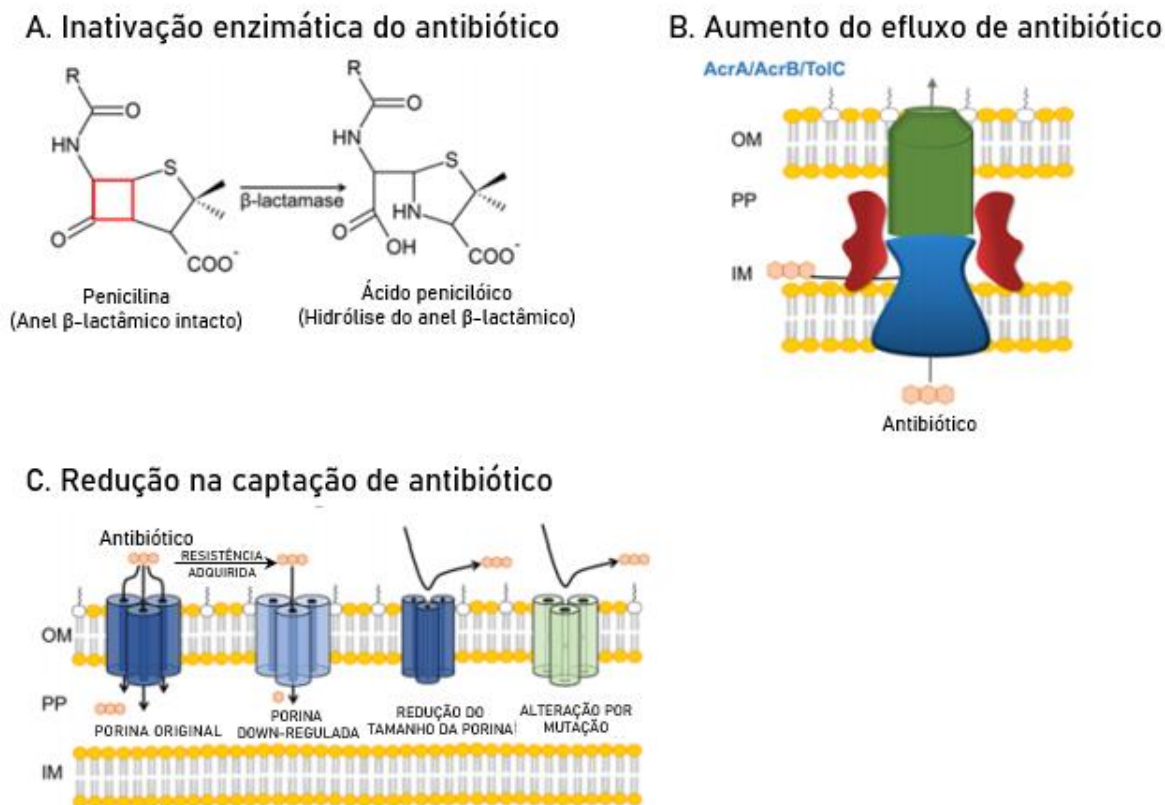


Figura 2. A resistência a β -lactâmicos é multifatorial e conduzida por vários mecanismos. (A) Inativação enzimática de antibióticos: As enzimas β -lactamases desativam o antibiótico por hidrólise do anel β -lactâmico. (B) Aumento do efluxo de antibióticos: representação esquemática de uma bomba de efluxo multidrogas. OM é a membrana externa, PP é o espaço periplasmático e IM é a membrana interna. (C) Diminuição da captação de antibióticos: representação esquemática dos mecanismos de resistência relacionados a canais denominados porinas (Adaptado de ARZANLOU; CHAI; VENTER, 2017).

Dentre os mecanismos de evasão a antibióticos, os enzimáticos são os mais relatados em enterobactérias, sendo que o principal mecanismo de resistência a β -lactâmicos ocorre pela ação de β -lactamases (BUSH; FISHER, 2011). β -lactamases são enzimas que catalisam a hidrólise da ligação amida do anel β -lactâmico, anulando assim, a ação antibacteriana do antibiótico (Figura 3). β -lactamases podem ser produzidas tanto por bactérias Gram positivas quanto Gram negativas, porém são predominantemente mais descritas entre estas últimas. Em Gram negativos, β -lactamases localizam-se e acumulam-se estrategicamente no espaço periplasmático,

o que torna este mecanismo de resistência muito eficaz neste grupo de bactérias (CITRI, 1971). Os genes que codificam estas enzimas são comumente denominados de *bla* e seguidos da denominação da enzima específica, como por exemplo *bla_{KPC}* (MUNITA; ARIAS, 2016).

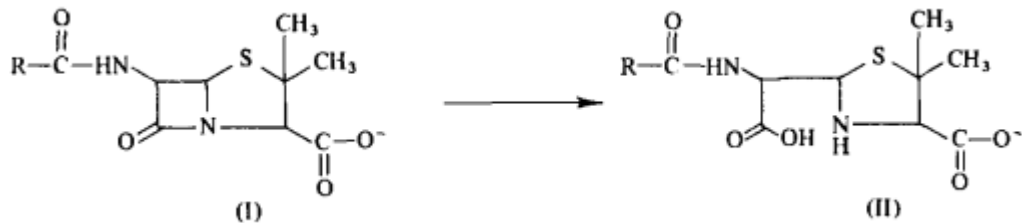


Figura 3. Hidrólise do anel β -lactâmico por ação de β -lactamases. I. Estrutura da penicilina. II. Estrutura do ácido penicilóico, produto da ação da β -lactamase (Adaptado CITRI, 1971).

Do ponto de vista estrutural, β -lactamases são classificadas em quatro principais classes (A, B, C e D) (AMBLER, 1980). As classes A, C e D agrupam enzimas denominadas “serina- β -lactamases”, as quais dispõem de um aminoácido serina em seu sítio ativo que ataca a ligação amida presente no anel β -lactâmico (Figura 4). A classe B corresponde a enzimas do tipo “metalo- β -lactamases” que dependem de íons divalentes, geralmente zinco, como cofator para sua atividade hidrolítica (Figura 4) (BUSH, 2018).

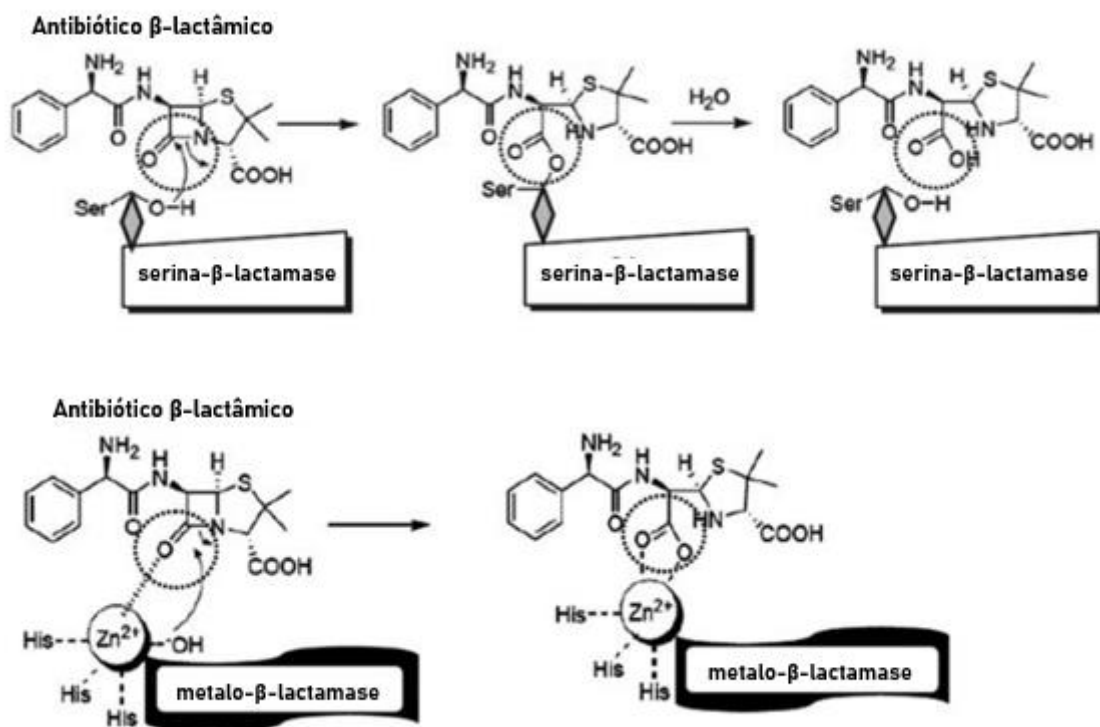


Figura 4. Mecanismos de hidrólise de β-lactâmicos por serina-β-lactamases e metalo-β-lactamases (Adaptado SACHA et al., 2008).

β-lactamases são conhecidas desde a descoberta da penicilina (ABRAHAM; CHAIN, 1940), porém grande interesse médico em torno deste assunto só veio à tona nos anos de 1980 com o relato de um tipo especial de β-lactamases com amplo espectro de ação, conhecida por ESBL (β-lactamase de espectro estendido) (RODRÍGUEZ-BANO; PASCUAL, 2008). Após a introdução de cefalosporinas de terceira geração para uso clínico no início dos anos 80, isolados produtores de ESBL começaram a ser detectados e caracterizados (JACOBY; MEDEIROS, 1991; GHAFOURIAN et al., 2015). Cepas produtoras de ESBL têm importância clínica pois são resistentes a um conjunto considerável de β-lactâmicos, incluindo as cefalosporinas de 3^a geração, como ceftazidima, ceftriaxona e cefotaxime; bem como, cefalosporinas de 2^a e 1^a gerações além de penicilinas (AMELIA et al., 2016).

1.4 Resistência a carbapenem

A disseminação de cepas produtoras de ESBL provocou aumento considerável do uso de carbapenem, promovendo nova seleção de bactérias resistentes (GHAFOURIAN et al., 2015; RODRÍGUEZ-BANO; PASCUAL, 2008). Isolados

produtores de carbapenemases emergiram após disseminação de ESBL em ambiente hospitalar. Carbapenemases são as β -lactamases mais versáteis devido ao seu amplo espectro de ação, sendo capazes de hidrolisar uma ampla gama de β -lactâmicos, incluindo carbapenens, cefalosporinas e penicilinas (QUEENAN; BUSH, 2007). Até um certo período, a expressão de carbapenemases restringia-se a genes cromossomais em espécies como *Stenotrophomonas maltophilia* e *Aeromonas spp* (SANCHEZ; HERNANDEZ; MARTINEZ, 2009; IACONIS; SANDERS, 1990). Porém, genes de carbapenemase extracromossomais, mobilizados em elementos genéticos móveis como plasmídeos, emergiram progressivamente. Este fenômeno provocou uma rápida disseminação de carbapenemases, inclusive em escala global (NORDMANN; DORTET; POIREL, 2012; QUEENAN; BUSH, 2007).

Carbapenemases codificadas por genes plasmidiais ganharam destaque pelo envolvimento em surtos hospitalares em diversas regiões do mundo, dentre elas destacam-se IMP (*imipenemase*), VIM (*Verona integron-encoded metallo- β -lactamase*), NDM (*New Delhi metallo- β -lactamase*), OXA-48 (*oxacillin-hydrolyzing*) e KPC (*Klebsiella pneumoniae carbapenemase*) (QUEENAN; BUSH, 2007). Estas são também as carbapenemases mais comumente encontradas em enterobactérias. Os genes que codificam essas carbapenemases estão localizados principalmente em plasmídeos e associados a várias estruturas genéticas móveis (sequências de inserção, integrons e transposons), facilitando ainda mais a disseminação (NORDMANN; DORTET; POIREL, 2012; JEAN et al., 2015). As primeiras IMP-1, VIM-1 e NDM-1 são classificadas na classe B de Ambler, KPC faz parte da classe A e OXA-48 pertence à classe D. Gradualmente têm sido descritas variantes destas enzimas, só de KPC, por exemplo, já foram relatadas mais de 20 variantes (ALBIGER et al., 2015; TZOUVELEKIS et al., 2012).

Cabe ressaltar que, apesar da resistência a carbapenem em enterobactérias estar associada principalmente à produção de carbapenemases, outros mecanismos alternativos podem estar envolvidos: alterações na permeabilidade da membrana externa mediada pela perda de porinas ou regulação positiva dos sistemas de efluxo juntamente com hiperprodução de β -lactamases AmpC ou β -lactamases de espectro estendido (ESBLs) (PITOUT; NORDMANN; POIREL, 2015).

1.5 Dispersão da resistência a carbapenem

Até o final dos anos 1990, a resistência a carbapenem em enterobactérias não era algo comum (NICOLETTI; RUSSO; BONFIGLIO, 2002). Um estudo epidemiológico, realizado entre 1997 a 2001, analisou o perfil de susceptibilidade antimicrobiana de isolados de enterobactérias recuperados de hospitais de quatro regiões do mundo: Ásia, Europa, América Latina e América do Norte. Do total de 48.440 isolados, 99,9% eram suscetíveis aos carbapenens meropenem e imipenem (SADER, BIEDENBACH, JONES, 2003).

O primeiro relato de isolado bacteriano produtor de KPC data do final da década de 1990, identificado em um isolado de *K. pneumoniae* recuperado de paciente hospitalizado na Carolina do Norte, Estados Unidos. Chamou atenção o fato de que a cepa apresentava resistência a todos os β -lactâmicos, inclusive aos carbapenens imipenem e meropenem. Além disso, exibia resistência a outras classes de antimicrobianos como aminoglicosídeos, além de cloranfenicol e sulfazotrim (YIGIT et al., 2001).

Uma rápida e extensa disseminação de *K. pneumoniae* produtora de KPC foi notada na costa leste dos Estados Unidos após o primeiro relato. Logo em 2004, ocorreram os primeiros surtos de bactérias produtoras de KPC, envolvendo vários hospitais de Nova York (QUEENAN; BUSH, 2007; WOODFORD et al., 2004). Além disso, outras espécies de enterobactérias como *Salmonella enterica*, *Enterobacter sp.* e *Klebsiella oxytoca* produtoras de KPC também foram relatadas (MIRIAGOU et al., 2003; YIGIT et al., 2003; HOSSAIN et al., 2004). A rápida dispersão de *bla*_{KPC} demonstrou alta capacidade de transferência desse gene entre espécies de enterobactérias, especialmente na espécie *K. pneumoniae*.

Fora dos Estados Unidos, *K. pneumoniae* produtora de KPC foi relatada pela primeira vez em 2005 na França, em caso que provavelmente teve origem em Nova York (NAAS et al., 2005). Em 2006, na América do Sul, a disseminação foi inicialmente relatada na Colômbia (VILLEGAS et al., 2006). Posteriormente, o primeiro surto de *K. pneumoniae* portando *bla*_{KPC} fora dos Estados Unidos, aconteceu em Israel (SAMRA et al., 2007). Outros países como China e Grécia também relataram isolados de *K. pneumoniae* portadores de *bla*_{KPC} (CUZON et al., 2007; WEI et al., 2006). No Brasil, o primeiro caso foi reportado em 2006 descrevendo quatro cepas de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenem isoladas de pacientes internados em uma unidade de

terapia intensiva (UTI) no estado de Pernambuco. Todas as cepas mostraram resistência a cefalosporina de 3ª geração e carbapenens e, além de KPC, todas possuíam as enzimas ESBL CTX-M-2, TEM-1 e SHV-11 (MONTEIRO et al., 2008).

Em pouco tempo, algumas regiões do mundo que reportavam casos esporádicos de bactérias produtoras de KPC, passaram a ser locais endêmicos. A figura 5 mostra a distribuição mundial de KPC e destaca o ano dos primeiros relatos em algumas regiões. A propagação endêmica foi relatada nos EUA, China, Itália, Polónia, Grécia, Israel, Brasil, Argentina, Colômbia e Taiwan (MUNOZ-PRICE et al., 2013).

A emergência mundial de isolados de enterobactérias resistentes a carbapenem (ERC) representa uma ameaça significativa ao manejo de infecções nosocomiais. Atualmente, isolados de *K. pneumoniae* produtores de KPC já são frequentemente identificados entre patógenos nosocomiais (*Centers for Disease Control and Prevention*). As opções terapêuticas disponíveis para o tratamento de infecções graves provocadas por esses isolados, muitas vezes, se restringem basicamente à tigeciclina e às polimixinas (TZOUVELEKIS et al., 2012).

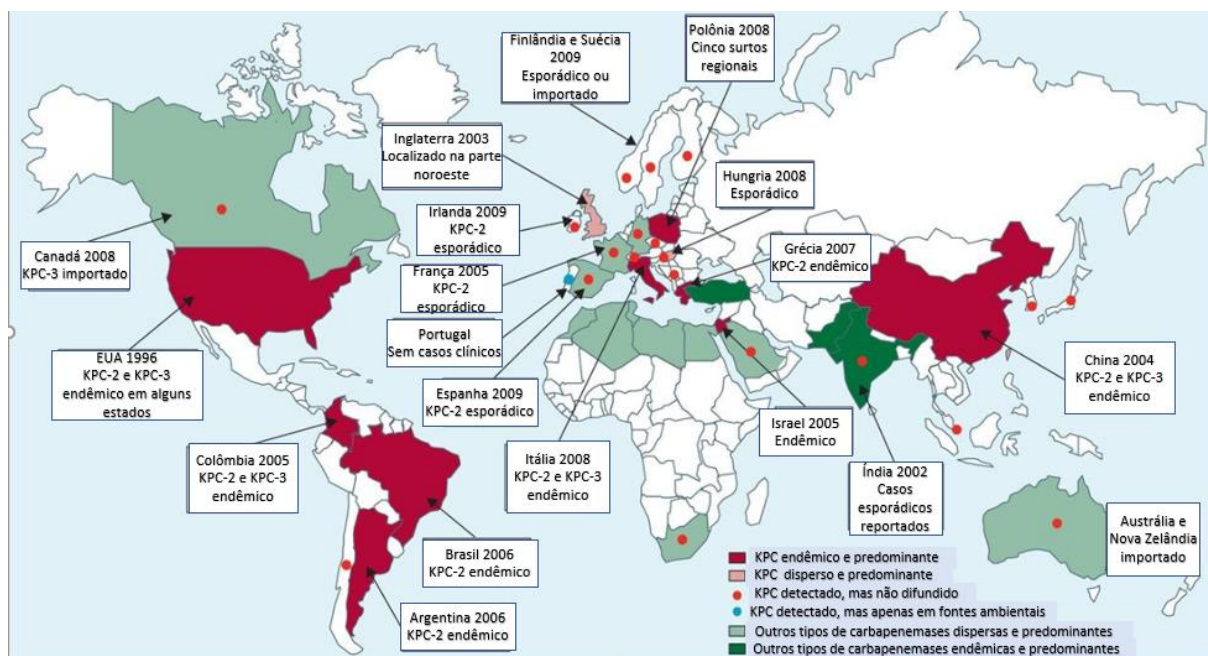


Figura 5. Relato inicial e padrão epidemiológico da ocorrência de bactérias produtoras de KPC em diferentes países (Adaptado de MUNOZ-PRICE et al., 2013)

O primeiro relato da metalo- β -lactamase NDM, ocorreu em 2008 na Suécia, em um paciente de origem indiana que havia adquirido, em internação prévia na Índia,

cepas de *K. pneumoniae* e *E. coli* resistentes a carbapenem (YONG et al., 2009). O gene *bla*_{NDM} mostrou-se facilmente transmissível entre as diferentes espécies de Gram negativos, disseminando-se em muitos países em um curto espaço de tempo. Hoje, produtores de NDM representam uma preocupação constante no âmbito de saúde pública (MUNITA; ARIAS, 2016). No Brasil, a primeira cepa produtora de NDM foi isolada em 2013 no Rio Grande do Sul (CARVALHO-ASSEF et al., 2013). Diferentemente de enterobactérias produtoras de KPC, que geralmente são restritas a ambiente hospitalar, a disseminação de isolados produtores de NDM em ambiente comunitário tem sido evidenciada (WALSH et al., 2011). Pesquisadores perceberam que pacientes infectados por bactérias produtoras de NDM não tinham histórico de internação hospitalar, sugerindo que os isolados resistentes eram de origem comunitária. Posteriormente foi comprovada a presença de *bla*_{NDM} em isolados de amostras de água de torneira e de infiltrações na cidade Nova Deli (Índia), confirmando a disseminação de NDM no ambiente (WALSH et al., 2011). Causando grande preocupação, isolados portando *bla*_{NDM} foram reconhecidos como uma fonte de infecções associadas à comunidade (SAIKIA et al., 2016).

Além KPC e NDM, outras carbapenemases de relevância clínica como VIM, IMP e OXA-48, foram relatados em enterobactérias em todo o mundo, inclusive no Brasil (JEAN et al., 2015). Em 1991, no Japão, houve a descrição pela primeira vez de cepas da família *Enterobacteriaceae* produtoras de IMP e, aproximadamente 10 anos mais tarde, relatou-se VIM na Coreia do Sul (DORTET, L.; CUZON, G.; NORDMANN, 2013). A enzima OXA-48, β -lactamase denominada oxacilinase capaz de hidrolisar oxacilina e também carbapenems, é originária da espécie *Shewanella* spp. e foi detectada pela primeira vez em *K. pneumoniae* na Turquia em 2003 (POIREL et al., 2003; TACÃO et al., 2018). Apesar de isolados portando *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} e *bla*_{OXA-48} estarem associados a surtos em diversas regiões do planeta, cabe ressaltar que os genes *bla*_{KPC} e *bla*_{NDM} tem uma disseminação maior e estão associados a eventos epidêmicos.

1.5.1 Linhagens genéticas de *K. pneumoniae* associadas à dispersão de *bla*_{KPC} e *bla*_{NDM}

Técnicas de tipagem baseadas em sequenciamento são hoje, amplamente utilizadas, pois possibilitam a reprodução e comparação dos resultados. Isso é

possível pela padronização da metodologia, interpretação dos resultados, bem como o armazenamento dos dados em um banco de dados mundial de sequências. Na análise de linhagens genéticas de *K. pneumoniae* envolvidas na disseminação de KPC, a tipagem por sequenciamento de múltiplos *loci* (MLST) é um dos métodos corriqueiramente utilizados (WOODFORD; TURTON; LIVERMORE, 2011). O método está embasado na variabilidade alélica de sete genes essenciais: *rpoB* (sub-unidade beta da RNA polimerase B), *gapA* (gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase), *mdh* (malato desidrogenase), *pgi* (fosfoglicose isomerase), *phoE* (fosforina E), *infB* (fator 2 de início da tradução) e *tonB* (transdutor de energia periplasmática). As combinações de 7 alelos formam um perfil alélico que determina linhagens genéticas específicas, conhecidas como tipo de sequência (*sequence type* - ST) (DIANCOURT et al., 2005).

Linhagens bacterianas de potencial epidêmico são uma fonte importante de propagação de elementos genéticos associados a resistência a antimicrobianos como plasmídeos, transposons e integrons. Esses clones têm distribuição global e mostram capacidade aumentada de colonizar, disseminar e persistir em uma variedade de habitats. Os clones epidêmicos são capazes de fornecer plataformas viáveis para a manutenção e propagação de genes de resistência e têm desempenhado um papel essencial na recente emergência mundial da resistência a múltiplas drogas entre bactérias Gram negativas, especialmente as enterobactérias (MATHERS; PEIRANO; PITOUT, 2015).

O gene *bla_{KPC}* tem sido detectado em mais de 100 diferentes STs de *K. pneumoniae*, porém, a dispersão desse gene não só nos EUA, como em várias regiões do mundo, foi impulsionada pelo predomínio global de clones de alto risco como o ST11 e ST258, que participam do mesmo complexo clonal (CC) (PITOUT; NORDMANN; POIREL, 2015; MUNOZ-PRICE et al., 2013). Complexo clonal consiste de ST ancestrais e seus variantes relacionados de único *locus* (*single locus variant* – SLV) ou duplo *loci* (*double loci variant* – DLV) (WOODFORD; TURTON; LIVERMORE, 2011). O CC11 agrupa clones de ocorrência global, epidêmicos e de predomínio hospitalar como os STs 11, 258, 340 e 437 (Tabela 1). No Brasil, a disseminação de *bla_{KPC-2}* também foi impulsionada por clones do CC11, principalmente os STs 11 e 437 (SEKI et al., 2011; ANDRADE et al., 2011; PEREIRA et al., 2012). A Tabela 1 mostra o perfil alélico dos STs pertencentes ao CC11.

Tabela 1. Perfil alélico do ST ancestral(*) 11 e demais integrantes do complexo clonal 11

ST	gapA	infB	mdh	pgi	phoE	rpoB	tonB
11*	3	3	1	1	1	1	4
258	3	3	1	1	1	1	79
270	3	3	1	1	1	1	23
340	3	3	1	1	1	1	18
437	3	3	1	1	1	1	31
524	3	1	1	1	1	1	4
572	3	3	1	1	1	1	143
690	2	3	1	1	1	1	4
731	3	3	1	83	1	1	4
747	3	3	1	1	1	68	4
751	3	3	1	1	1	46	4
757	3	3	1	1	1	1	22
833	3	3	1	1	1	1	12
855	3	3	1	1	1	1	26
859	3	3	1	1	1	1	1
864	3	3	1	1	1	1	2
895	3	3	1	1	1	1	42
1080	3	3	1	1	164	1	4
1264	3	3	1	1	1	1	39
1326	3	3	1	1	1	1	16
1384	16	3	1	1	1	1	4
1460	4	3	1	1	1	1	4
1560	3	3	138	1	1	1	4
1640	3	3	1	1	1	9	4
1668	3	3	1	1	1	1	106

Fonte: Instituto Pasteur (<https://bigsd.b.pasteur.fr/klebsiella/klebsiella.html>)

Sendo assim, a característica pandêmica do ST258 (CC11) desempenhou papel relevante na disseminação global de KPC através da transmissão horizontal. Cepas de *K. pneumoniae* de ST258 (CC11) produtoras de KPC tornaram-se um dos patógenos bacterianos multirresistentes mais bem adaptados em ambientes de assistência médica em todo o mundo (BOWERS et al., 2015).

Ao contrário de *bla*_{KPC}, cuja disseminação global se deve em grande parte ao complexo clonal 11, cepas de *K. pneumoniae* positivas para *bla*_{NDM} estão distribuídas em maior número de STs sem linhagens predominantes, sugerindo que não há clones de potencial epidêmico associada a *K. pneumoniae* positiva para *bla*_{NDM} (GISKE et al., 2012; WU et al., 2019). Apesar disso, os tipos de sequência ST11 (CC11); ST14 e

ST15 do CC15; e ST147 do CC147 são linhagens frequentemente positivas para *bla*_{NDM} e foram encontradas em vários continentes (GISKE et al., 2012).

1.5.2 Tn4401 como principal elemento carreador de *bla*_{KPC}

No intuito de investigar mais a fundo a pandemia de infecções hospitalares causadas por isolados bacterianos portando *bla*_{KPC}, estruturas genéticas que circundam o gene foram caracterizadas em cepas de *K. pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* recuperadas dos EUA, Colômbia e Grécia. Um novo tipo de transposon, o Tn4401, derivado da família Tn3, foi identificado como elemento responsável por carrear o gene *bla*_{KPC} em todos os isolados testados. Três isoformas de Tn4401 (a, b e c) são conhecidas e esses subtipos têm diferentes deleções a montante de *bla*_{KPC} que conferem diferentes regiões promotoras ao gene (NAAS et al., 2012). Além disso, a identificação de Tn4401 ocorre em diferentes *loci* e em diferentes plasmídeos indicando um processo de transposição frequente e dinâmico (NAAS et al., 2008).

Tn4401 foi identificado em isolados de diferentes origens geográficas e de diferentes STs de *K. pneumoniae*, além de em outras enterobactérias e em *P. aeruginosa*. (NAAS et al., 2008; ANDRADE et al., 2011; CUZON et al., 2010). Cuzon et al. (2010) relatou que todos os 16 isolados de *K. pneumoniae* produtores de KPC de 5 diferentes países, incluindo o Brasil, portavam o elemento genético Tn4401. Estes fatos mostram que a aquisição do gene *bla*_{KPC} associado a Tn4401 sustenta a disseminação mundial desse gene (NAAS et al., 2012).

1.6 Resistência a polimixina e a tigeciclina

A expansão global da resistência a carbapenem, restringiu consideravelmente as opções terapêuticas dificultando o manejo de infecções causadas por bactérias multirresistentes. Nesse contexto, as polimixinas emergiram como uma alternativa ao uso de carbapenens em ambiente hospitalar, apesar de sua nefrotoxicidade (FALAGAS; KASIAKOU; SARAVOLATZ, 2005).

As polimixinas são um grupo de antimicrobianos polipeptídicos catiônicos consistindo em cinco compostos quimicamente distintos, classificados de A a E. Apenas as polimixinas B e E (colistina) têm sido utilizadas na terapêutica. Esses antibióticos possuem amplo espectro de ação contra bactérias Gram negativas, incluindo a maioria das espécies da família *Enterobacteriaceae* (GOVIL et al., 2009). O

mecanismo de ação envolve a interação dos polipeptídeos catiônicos presentes na estrutura química da polimixina com moléculas de lipopolissacarídeos (LPS) aniônicos presentes na membrana externa de bactérias Gram negativas. Essa interação leva o deslocamento de cálcio (Ca^{2+}) e magnésio (Mg^{2+}), que estabilizam o LPS, causando assim o desarranjo da membrana celular. O resultado é uma ruptura da integridade da membrana externa com aumento da permeabilidade, extravazamento do conteúdo periplasmático e consequente morte da bactéria (GOVIL et al., 2009).

O aumento do uso de polimixinas impulsionou a seleção e emergência de mecanismos de resistência. A resistência a polimixina estava, até então, atrelada a mutações cromossômicas, não havendo relatos de resistência mediada por elementos genéticos móveis. Porém, em 2016 na China, um projeto rotineiro de vigilância de resistência antimicrobiana, observou um rápido aumento de resistência a colistina em cepas de *Escherichia coli* recuperadas de animais de corte. Durante investigação genética dessas cepas, descobriram um determinante de resistência a colistina mobilizado por plasmídeo denominado *mcr-1*, que exibia alta taxa de transferência *in vitro* entre cepas de *E. coli* (LIU et al., 2016). O gene *mcr-1* codifica uma fosfoetanolamina transferase que modifica a carga elétrica líquida do lipopolissacarídeo (LPS) pela adição de um grupamento fosfoetanolamina ao lipídeo A, reduzindo assim, a afinidade da colistina ao LPS e levando a resistência (LIU et al., 2016; SUN et al., 2018). Pouco tempo após esse primeiro relato, *mcr-1* foi reportado em mais de 20 países em isolados de amostras clínicas e não-clínicas (BARON et al., 2016). Já foram descritos oito alelos de *mcr*. Em estudo recente no Distrito Federal - Brasil, as variantes *mcr-1* foram detectadas em isolados clínicos de *K. pneumoniae* (SILVA, 2019).

Além das polimixinas, a tigeciclina também tem sido utilizada como alternativa terapêutica em infecções por isolados bacterianos resistentes a carbapenem (SOULI et al., 2006; KUMARASAMY et al., 2010; RODRÍGUEZ-BAÑO et al., 2018). Introduzida da prática médica em 2005, a tigeciclina é um análogo sintético das tetraciclinas e como estas, se liga reversivelmente a subunidade 30S do ribossomo bacteriano, inibindo a síntese de proteínas (SHAKIL; AKRAM; KHAN, 2008). A resistência à tigeciclina emergiu nos últimos anos e já foi relatada em isolados clínicos multirresistentes (LI et al., 2016; ZHANG et al., 2018). O gene *tet(X)* mobilizado em plasmídeo foi relacionado a altos níveis de resistência a tigeciclina em *E. coli*. *tet(X)*

codifica uma monooxigenase dependente de flavina, que hidroxila o substrato de tigeciclina, resultando em um composto instável. Além de exibir atividade contra a tigeciclina, a monooxigenase codificada por *Tet(X)*, em teste *in vitro*, inativou todas as tetraciclinas (SUN et al., 2019; VOLKERS et al., 2011).

1.7 Disseminação ambiental da resistência a carbapenem

Enterobactérias produtoras de carbapenemases são predominantemente associadas a instituições de saúde. Apesar disso, relatórios sobre sua ocorrência em matrizes ambientais são cada vez mais frequentes (WOODFORD et al., 2013). A resistência a carbapenem tem sido observada em diversos habitats aquáticos incluindo rios, córregos, lagoas e, principalmente, esgoto doméstico e hospitalar (CAUMO, 2010). Nos últimos anos, o papel do meio ambiente como importante fonte e via de disseminação de resistência tem sido cada vez mais reconhecido (BENGTSSON-PALME; KRISTIANSSON; LARSSON, 2017).

Relatos da ocorrência de enterobactérias produtoras de carbapenemase no ambiente provavelmente começaram a partir de 2005, quando nos EUA um estudo identificou 29 isolados resistentes ao imipenem, em 7 dos 16 rios norte-americanos amostrados entre 1999 e 2001. Vinte e duas das 29 cepas foram identificadas como *Enterobacter asburiae* e portavam o gene de carbapenemase IMI-2 (ASH; MAUCK; MORGAN, 2002; AUBRON et al., 2005).

Em sequência, outros relatos de enterobactérias produtoras de carbapenemases em ambientes aquáticos foram feitos, com isolados recuperados em estações de tratamento de esgoto (ETE) na Áustria, Alemanha, Brasil e China; e de rios e lagos na Suíça, Portugal, Brasil e Vietnã (Tabela 2) (ISOZUMI et al., 2012; ZURFLUH et al., 2013; ZHANG; LÜ; ZONG, 2012; OLIVEIRA et al., 2013; POIREL et al., 2011; GALLER et al., 2014). Em 2009, por meio de análise metagenômica do lodo ativado e do esgoto tratado de uma ETE na Alemanha, foram identificados mais de 100 genes de resistência, incluindo os determinantes de resistência a carbapenem *bla_{IMP}*, *bla_{VIM}* e *bla_{OXA-48}* (SZCZEPANOWSKI et al., 2009). Porém, a pesquisa de genes de resistência por essa abordagem tem valor limitado por conta da ocorrência natural de algumas enzimas em determinadas espécies bacterianas saprófitas, como por exemplo a ocorrência de *bla_{OXA-48}* em isolados do gênero *Shewanella*, que estão comumente presentes em sedimentos de lagos (WOODFORD et al., 2013).

Tabela 2. Carbapenemases adquiridas em bactérias recuperadas de fontes não-humanas (Adaptado de WOODFORD et al., 2013)

Enzima	Espécies	Fonte	País	Ano	Referência
KPC (classe A)	Múltiplos gêneros	Esgoto hospitalar, efluente	Brasil	2011/2013	(PICÃO et al., 2013) (CHAGAS et al., 2011)
	<i>E.coli</i>	Rio	Portugal	2012	(POIREL et al., 2011)
IMI (classe A)	<i>Citrobacter freundii</i> , <i>Enterobacter cloacae</i>	Esgoto hospitalar, efluente	China	2012	(ZHANG; LÜ; ZONG, 2012)
	<i>Enterobacter asburiae</i>	Rios	EUA	2005	(AUBRON et al., 2005)
VIM (classe B)	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Rio, esgoto	Portugal	2005	(QUINTEIRA; FERREIRA; PEIXE, 2005; QUINTEIRA; PEIXE, 2006)
	Amplicons PCR	Esgoto, efluente	Alemanha	2009	(SZCZEPANOWSKI et al., 2009)
	<i>E.coli</i> , <i>S.enterica</i> subsp. <i>Enterica Infantis</i>	Fazendas de suínos e aves, moscas, ratos, estrume.	Alemanha	2012/2013	(FISCHER et al., 2012; FISCHER et al., 2013)
	<i>K.pneumoniae</i> , <i>Helicobacter pylori</i> <i>K.pneumoniae</i>	Rio Rio	Tunísia Suíça	2013 2013	(CHOUCHANI et al., 2012) (ZURFLUH et al., 2013)
IMP (classe B)	Amplicons PCR	Esgoto, efluente	Alemanha	2009	(SZCZEPANOWSKI et al., 2009)
	<i>K.pneumoniae</i>	Rio	Tunísia	2013	(CHOUCHANI et al., 2012)
OXA-48 (classe D)	Amplicons PCR	Esgoto, efluente	Alemanha	2009	(SZCZEPANOWSKI et al., 2009)
	<i>E.coli</i> , <i>K.pneumoniae</i>	Cachorro	Alemanha	2013	(STOLLE et al., 2013)
NDM (classe B)	Múltiplos gêneros	Água	Índia	2011	(WALSH et al., 2011)
	<i>K.pneumoniae</i>	Rio	Vietnã	2012	(ISOZUMI et al., 2012)
	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	Aves	China	2012	(WANG et al., 2012)
	<i>A.baumannii</i>	Porco	China	2013	(ZHANG et al., 2013)
	<i>E.coli</i>	Cachorro/gato	EUA	2013	(SHAHEEN; NAYAK; BOOTHE, 2013)
	<i>S.enterica</i> subsp. <i>Enterica</i> serovar <i>Carvallis</i>	Papagaio Negro	Alemanha	2013	(FISCHER et al., 2013)
	<i>A.baumannii</i>	Água, esgoto hospitalar	China	2013	(ZHANG et al., 2013)

Recentemente no leste da Inglaterra, isolados de enterobactérias resistentes a carbapenem foram detectadas em quatro ETEs localizadas a jusante de hospitais. Os isolados portavam diferentes genes de carbapenemases como *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA-48} e *bla*_{IMP}, além de genes ESBL (LUDDEN et al., 2017). Na Irlanda, cepas de *E. coli* e *K. pneumoniae* produtoras de NDM foram recuperadas de estação de tratamento de esgoto, córregos e mar. Análises de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE, do inglês *pulsed field gel electrophoresis*) mostraram que os isolados de *E. coli* obtidos das amostras de água doce e esgoto eram indistinguíveis de um isolado clínico submetido ao Serviço Nacional de Laboratório de Referência de Enterobactérias Produtoras de Carbapenemase (CPERLS). O mesmo ocorreu na análise com *K. pneumoniae* isoladas de esgoto e água do mar que se mostraram 83% e 97% semelhantes a uma cepa isolada de amostras clínicas (MAHON et al., 2017).

No Brasil, durante os últimos anos, vários relatos de *K. pneumoniae* produtoras de KPC isoladas de pacientes hospitalizados foram relatadas e, até então essas bactérias estavam restritas a ambiente hospitalar. Porém, em 2008 no Rio de Janeiro, duas cepas de *K. pneumoniae* foram isoladas de estação de tratamento de esgoto hospitalar. Ambas as cepas eram resistentes a todas as cefalosporinas e carbapenens

e, além de *bla*_{KPC}, possuíam os genes *bla*_{TEM} e *bla*_{SHV} (CHAGAS et al., 2011). Já em 2011, três isolados de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenem foram recuperados do rio Tietê e rio Pinheiros, durante pesquisa de vigilância local em rios de áreas urbanas a sudeste do Brasil. O Tietê é um dos principais rios da região, percorrendo o estado de São Paulo de leste a oeste por cerca de 1100 km, enquanto o rio Pinheiros é um afluente do rio Tietê que percorre 25 km pela cidade de São Paulo, a maior e mais populosa área metropolitana no Brasil. Os isolados rastreados portavam o gene *bla*_{KPC-2} e pertenciam ao CC11 (OLIVEIRA et al., 2013). A detecção de clones de alto risco de *K. pneumoniae* produtoras de KPC-2 em rios urbanos demonstra que a disseminação ambiental de bactérias multirresistentes está em curso no Brasil (OLIVEIRA et al., 2013; CHAGAS et al., 2011). O transposon *Tn4401* era o elemento genético carreador de *bla*_{KPC-2} em isolados de enterobactérias recuperadas de esgoto hospitalar e de uma ETE, em outra pesquisa realizada em São Paulo (PICÃO et al., 2013).

O ambiente aquático além de ser um meio potencial de disseminação de bactérias resistentes, também pode funcionar como via pelo qual genes de resistência são introduzidos no ecossistema alterando a microbiota ambiental (WASEEM; WILLIAMS; JAMEEL; HASHSHAM, 2018). Além disso, matrizes aquáticas geralmente recebem águas residuais tratadas ou não-tratadas contendo poluentes como antibióticos e metais pesados de esgoto hospitalar. A presença destes poluentes pode aumentar a seleção e taxa de troca de genes de resistência entre espécies bacterianas ambientais (saprófitas) e patogênicas de interesse clínico (MARTINS et al., 2014). A concentração de antibióticos em ambientes naturais também é fator importante para a ocorrência de resistência bacteriana. Ambientes em contato com poluentes de indústrias farmacêuticas ou esgoto hospitalar, tendem a apresentar concentrações maiores de antimicrobianos (GULLBERG et al., 2011). Além disso, mesmo em ambientes com concentrações muito baixas de antibióticos, a manutenção e a seleção de bactérias resistentes ocorrem (GULLBERG et al., 2011).

Como visto, o esgoto é potencial fonte de disseminação não só de bactérias resistentes, mas também de genes de resistência para o ambiente comunitário (YANG et al., 2016). Estações de tratamento de esgoto (ETE) são responsáveis pelo tratamento e devolução para o ambiente de águas residuais advindas de uso doméstico, hospitalar e industrial; concorrendo para a proteção do ambiente,

especialmente de matrizes aquáticas. A remoção de matéria orgânica, poluentes químicos e microrganismos indesejáveis do esgoto usando processos físicos e químicos foi um avanço tecnológico imprescindível que possibilitou a devolução de água limpa para o ambiente (MANAIA et al., 2018). O tratamento de esgotos é dividido em tratamento preliminar e tratamento a nível primário, secundário e terciário. No tratamento preliminar os resíduos maiores são retidos através de grades e peneiras. Já no tratamento a nível primário os sólidos em suspensão são sedimentados e à medida que se acumulam no fundo do decantador, formam o lodo primário. Em seguida, no tratamento a nível secundário, os microrganismos irão utilizar a matéria orgânica, convertendo-a em gás carbônico e água. No nível terciário são removidos poluentes específicos como os micronutrientes fósforo e nitrogênio (MANAIA et al., 2018). No Brasil as estações de tratamento de esgoto não seguem um padrão e podem variar quanto aos níveis e tipos de tratamento empregados. O índice de atendimento urbano do sistema de esgotamento sanitário do DF é de 92,8%, conforme dados estatísticos da Pesquisa Distrital por Amostra de Domicílios – PDAD 2018. Apesar disso, a baixa cobertura de esgotamento sanitário ainda é realidade de muitos estados brasileiros e pode impactar diretamente na questão de disseminação de enterobactérias produtoras de carbapenemases para o ambiente (OLIVEIRA et al., 2013; CHAGAS et al., 2011).

A ocorrência de isolados de *K. pneumoniae* produtores de carbapenemases, em especial KPC, fora de ambiente hospitalar é preocupante, pois evidencia a disseminação desses microrganismos multirresistentes para o ambiente. A baixa eficácia ou a falta de tratamento de esgoto, especialmente esgoto hospitalar, pode facilitar esse processo (LUDDEN et al., 2017). Com base nesse contexto, foi realizado um estudo de detecção e caracterização molecular de isolados de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenem no âmbito das estações de tratamento que compõe o sistema de esgotamento sanitário do Distrito Federal. A caracterização de possíveis isolados é de suma importância para avaliar possível disseminação de bactérias multirresistentes de predomínio hospitalar no ambiente. Numa época em que a evolução e a disseminação da resistência antimicrobiana não são acompanhadas pelo desenvolvimento de novos antimicrobianos, controlar a disseminação de bactérias resistentes aos antimicrobianos é absolutamente necessário.

2 JUSTIFICATIVA

A disseminação mundial de cepas produtoras de carbapenemases, principalmente KPC, é hoje uma das grandes preocupações em saúde pública pela significativa redução de opções terapêuticas. *Klebsiella pneumoniae* do complexo clonal 11 tornou-se um dos patógenos bacterianos multirresistentes mais “bem-sucedidos” em ambiente hospitalar e tem sido responsável pela dispersão de *bla*_{KPC} ao redor do mundo (BOWERS et al., 2015). Em meio a esse cenário epidemiológico já bem estabelecido, inclusive em hospitais brasileiros (FARIA-JUNIOR, 2016), o trabalho visa a detecção e caracterização de isolados ambientais de *K. pneumoniae* resistente a carbapenem em amostras água e esgoto. Além disso, há pouca informação sobre a frequência de cepas de *K. pneumoniae* multirresistentes em fontes ambientais no Brasil, especialmente no Distrito Federal.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar a ocorrência e realizar caracterização fenotípica e molecular de isolados de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a carbapenem (carba-R) recuperados em Estações de Tratamento de Esgoto (ETE) no DF.

3.2. Objetivos Específicos

1. Obtenção da coleção de isolados de *Klebsiella pneumoniae* carba-R recuperados de amostras de esgoto e água em ETES do DF;
2. Avaliar o perfil de suscetibilidade a antimicrobianos dos isolados ambientais de *K. pneumoniae* carba-R;
3. Descrever a frequência dos genes de resistência a carbapenem *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{VIM}*, *bla_{IMP}* e *bla_{OXA-48}*, dos genes de resistência a polimixina *mcr 1*, *mcr-2*, *mcr-3* e do gene de resistência a tigeciclina *tetx*;
4. Detecção do transposon *Tn440* em isolados positivos para *bla_{KPC}*;
5. Realizar sequenciamento genético dos genes *bla_{KPC}* e *bla_{NDM}* e definição de alelos;
6. Definição de linhagens genéticas por meio do MLST e posterior análise da relação filogenética (construção de um dendograma) dos isolados ambientais de *K. pneumoniae* carba-R.

4. METODOLOGIA

4.1. Coleta das amostras

Amostras de água e esgoto foram coletadas em doze estações de tratamento de esgoto (ETEs) que compõem o sistema de esgotamento sanitário do Distrito Federal (DF) (Tabela 3). De cada ETE coletou-se quatro tipos de amostras: esgoto bruto (EB); esgoto tratado (ET); amostras de água à jusante (AJ) e à montante (AM) do local de despejo de esgoto tratado, ao longo do curso d'água receptor (Figura 6). Em cada ponto de amostragem, o procedimento de coleta consistiu em recolher amostra de água ou esgoto em tubos plásticos estéreis de 50mL. Logo após coletadas, as amostras foram encaminhadas ao laboratório da Universidade de Brasília – Faculdade de Ceilândia e conservadas entre 2 a 8°C, sendo processadas em até 24 horas.



Figura 6. Representação do posicionamento referente às ETEs dos pontos de coleta das amostras

As coletas foram realizadas em três períodos de 2017 - julho, agosto e outubro e dois períodos de 2018 - março e abril -, totalizando 240 amostras coletadas (20 amostras de água ou esgoto por ETE). As ETEs sondadas foram Alagado, Brasília Sul, Brasília Norte, Brazlândia, Gama, Paranoá, Planaltina, Recanto das Emas, Riacho Fundo, São Sebastião, Sobradinho e Vale do Amanhecer (Tabela 3). Cabe ressaltar, que em relação às ETEs Brasília Sul e Brasília Norte, cujo corpo receptor é o lago Paranoá, não há referência clara de ponto à montante ou à jusante do despejo de esgoto tratado, sendo assim, amostras de água coletadas foram consideradas à

jusante do despejo de esgoto. Parâmetros de demanda associados às ETEs estão listados na Tabela 3.

Tabela 3. Estações de Tratamento de Esgoto e parâmetros de demanda associados

Estação de tratamento de esgoto	Regiões atendidas	Corpo d`água receptor	Nível de tratamento	PERFIL DE DEMANDA				
				Nº de economias ativas ¹	Vazão média (L/s)	Nº Hospitais Regionais atendidos ²	Nº de internações (Jan-Ago 2017)	Participação da agricultura como trabalho formal ³ (%)
Alagado	Santa Maria	Rio Alagado	Terciário	21818	80	1	3010	0,56%
Brasília Norte	Vila varjão, Asa Norte, Vila Planalto, Lago Norte, área central de Brasília, Vila estrutural e Torto.	Lago Paranoá	Terciário	63412	450	6	13430	0,83%
Brasília Sul	Asa Sul, Núcleo Bandeirante, Asa Sul, área central de Brasília, Octogonal, Cruzeiro, Sudoeste, Guará I e II, Riacho Fundo I, S.I.A, Águas Claras, Candangolândia, Cidade do Automóvel, e Setor de Inflamáveis	Lago Paranoá	Terciário	187421	1319	16	29103	0,53%
Brazlândia	Brazlândia	Rio Verde (Goiás)	Secundário	14373	41	1	2738	11,12%

Tabela 3. Estações de Tratamento de Esgoto e parâmetros de demanda associados (continuação)

Estação de tratamento de esgoto	Regiões atendidas	Corpo d'água receptor	Nível de tratamento	PERFIL DE DEMANDA				
				Número de economias ativas ¹	Vazão média (L/s)	Nº Hospitais Regionais atendidos	Nº de internações (Jan-Ago 2017) ²	Participação da agricultura como trabalho formal ³ (%)
Gama	Gama	Riberão Ponte Alta	Terciário	45254	187	2	8500	1,55%
Paranoá	Paranoá e Itapuã	Rio Paranoá	Terciário	33919	100	1	5607	8,32%
Planaltina	Planaltina	Riberão Mestre D'Armas	Secundário	35899	154	1	6149	9%
Recanto das Emas	Riacho Fundo II e Recanto das Emas	Córrego Vargem da Benção	Secundário	53949	184	0	0	2,47%
Riacho Fundo	Riacho Fundo I	Riacho Fundo	Terciário	13079	46	0	0	0,26%
São Sebastião	São Sebastião	Riberão Santo Antônio da Papuda	Secundário	22595	131	1	258	0,59%

Tabela 3. Estações de Tratamento de Esgoto e parâmetros de demanda associados (continuação)

Estação de tratamento de esgoto	Regiões atendidas	Corpo d`água receptor	Nível de tratamento	PERFIL DE DEMANDA				
				Número de economias ativas ¹	Vazão média (L/s)	Nº Hospitais Regionais atendidos	Nº de internações (Jan-Ago 2017) ²	Participação da agricultura como trabalho formal ³ (%)
Sobradinho	Sobradinho e expansões	Riberão Sobradinho	Secundário	26003	77	1	4561	1,31%
Vale do Amanhecer	Vale do Amanhecer	Rio São Sebastião	Secundário	4401	18	0	0	0

¹ – Refere-se ao número de residências usuárias da rede de esgoto de cada região atendida pela ETE (Fonte: Companhia de Saneamento Básico do Distrito Federal, CAESB).

² – Refere-se ao número de internações nos hospitais presentes nas regiões atendidas pela ETE (Fonte: Ministério da Saúde - Sistema de Informações Hospitalares do SUS (SIH/SUS)).

³ – Refere-se a participação percentual da agricultura nos vínculos formais de trabalho por regiões atendidas pelas ETE (Fonte: CODEPLAN/GEDEG).

4.2. Isolados bacterianos

Para verificar a ocorrência de bacilos Gram negativos resistentes a carbapenem (BGN carba-R), as amostras de água e esgoto foram inoculadas em caldo de enriquecimento contendo inibidores para crescimento de bactérias Gram negativas sensíveis a carbapenem e bactérias Gram positivas. Foram inoculados 500 µL de cada amostra coletada, devidamente homogeneizada, em 4mL de caldo tripcaseína, enriquecido com ertapenem (2,5 mg/L) e vancomicina (7,5mg/L) em concentrações inibitórias para seleção de resistência segundo o Instituto de Padrões para Laboratoriais Clínicos (CLSI, 2019). Após incubação a 37°C por 24 horas, verificou-se o crescimento de BGN carba-R através da turbidez do meio. As culturas que obtiveram crescimento foram semeadas (1 µL) em meio cromogênico seletivo para bacilos Gram negativos produtores de β -lactamases de Espectro Estendido - ESBL (CromolD® ESBL Biomerieux). Após incubação (37°C por 24 horas), isolados presuntivos de *Klebsiella pneumoniae* carba-R, assim como outros BGN carba-R, foram recuperados. Um quantitativo máximo de 3 colônias de cada grupo presuntivo foi recuperado de cada cultivo em placa. Os isolados foram preservados em ágar nutriente acondicionado em frascos hermeticamente fechados e armazenados (temperatura ambiente) para os estudos moleculares e fenotípicos.

4.3. Identificação Bacteriana

A identificação dos isolados foi realizada no Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal (LACEN-DF) utilizando o sistema de identificação bacteriana por espectrometria de massa (MALDI TOF VITEK® MS – bioMérieux). Os isolados foram cultivados em ágar Mueller Hinton e incubadas por 24 horas em estufa a 37 °C. Os procedimentos para identificação foram realizados conforme as instruções do fabricante. A cepa *E. coli* ATCC™ (do inglês, *American Type Culture Collection*) 8739 foi utilizada como controle positivo. O banco de dados para identificação de espécies clínicas utilizado foi o Myla®. Os isolados de BGN carba-R foram identificados a nível de espécie ou gênero. Todos os isolados identificados como espécie *Klebsiella pneumoniae* apresentaram probabilidade >90%.

4.4. Teste de suscetibilidade a antimicrobianos

O perfil de susceptibilidade a antimicrobianos foi realizado pelo método de disco-difusão de Kirby e Bauer (BAUER, 1966). Os isolados foram cultivados em ágar

MacConkey em semeio por esgotamento para a obtenção de colônias isoladas. Em seguida, foi preparada uma suspensão bacteriana em solução salina com a densidade equivalente ao padrão de turbidez 0,5 da escala de McFarland ($\approx 1-2 \times 10^8$ CFU/mL). Utilizando um swab de algodão estéril inoculou-se superfície de ágar Mueller-Hinton cátió-ajustado (150x20mm) com a suspensão bacteriana. Logo em seguida, um suporte contendo 15 discos de antibióticos com concentrações definidas (Polisensidisc 15 - DME®) foi posicionado no centro da placa. Os antimicrobianos testados foram: amicacina; amoxicilina/ácido clavulânico; ácido nalidíxico; cefazolina; cefepime; ceftriaxona; ciprofloxacina; gentamicina; meropenem; sulfametoxazol/trimetoprim; norfloxacin; nitrofurantoína; fosfomicina; levofloxacin. Após 18h em estufa a 36,5°, os halos formados foram medidos. A interpretação clínica dos resultados de susceptibilidade (sensível, intermediário ou resistente) foi baseada nos pontos de corte do CLSI (CLSI, 2019). Os isolados com interpretação clínica como “resistente” ou “intermediário” foram considerados não-suscetíveis.

4.5. Detecção molecular de genes de carbapenemases e do transposon *Tn4401* por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Reações de PCR foram utilizadas para caracterização molecular da resistência a carbapenem (Tabela 4). As culturas mantidas em ágar nutriente foram recuperadas em caldo Luria Bertani (LB) e incubadas a 37° por 24 horas. Para extração do DNA, 1 mL de cultura bacteriana foi centrifugado (3.000 g/ 3 min), o sobrenadante descartado e o precipitado celular ressuspense em 1 mL de água deionizada. A suspensão celular foi novamente centrifugada (3.000 g/ 3 min), o sobrenadante descartado e o sedimento celular ressuspense com 1 mL de TRIS 10 mM (pH 8,0). A suspensão foi incubada em banho-maria a 100 °C por 15 minutos e posteriormente centrifugada (11.000 rpm/ 3 min). O sobrenadante (600 µL) foi utilizado como fonte de DNA total para as reações de amplificação. Os ensaios de PCR foram realizados com DNA polimerase de *Thermus aquaticus* (Sigma-Aldrich) em volume final de 30 µL (23 µL do mix e 7 µL de DNA a 29±3ng/µL) seguindo protocolo de reação definido pelo fabricante. Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1%, preparada em tampão TAE (Tris-acetato-EDTA) 1X pH 8,2. A visualização dos *amplicons* foi feita por transiluminação de luz ultravioleta (UV) após coloração em banho (15 min.) de brometo de etídio (1µg/mL). Os oligonucleotídeos

iniciadores utilizados para detecção dos genes *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{VIM}*, *bla_{IMP}*, *bla_{OXA-48}* e *Tn4401* estão listados abaixo na tabela 4.

Tabela 4. Lista dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados e condições de PCR

Gene	Descrição do Locus	Alvo GenBank (posição)	Alelos detectáveis	Sequência (5' - 3')	Tamanho fragmento (pb)	Temp. anelam (°C)	Referência
<i>bla_{KPC}</i>	Serina-β-lactamase	KC344543.1 (1226..2107)	<i>bla_{KPC}</i> -1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11,12, 13	F - TGTCACTGTATCGCCGTC	1011	58	YIGIT et al., 2001
				R - CTCAGTGCTCTACAGAAAACC			
<i>bla_{NDM}</i>	Metalo-β-lactamase	MN816233.1 (167..979)	<i>bla_{NDM}</i> -1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8.	F - GGTTTGGCGATCTGGTTTTTC	512	57	FARIA-JUNIOR, 2016
				R - GGCCTTGCTGTCCTTGATC			
<i>bla_{VIM}</i>	Metalo-β-lactamase	MF344563 (279755..280086)	<i>bla_{VIM}</i> -1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 10, 11, 12,13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 23, 24, 25, 27, 28, 31, 33, 34.	F - GATGGTGTTTGGTCGCATATC	332	56	FARIA-JUNIOR, 2016
				R - CTCGATGAGAGTCCTTCTAGAG			
<i>bla_{IMP}</i>	Metalo-β-lactamase	NG_049222.1 (101..841)	<i>bla_{IMP}</i> -2, 5, 8, 13,19, 20, 24, 33, 37 <i>bla_{IMP}</i> -1, 2, 8, 14,14 ^a ,19,20,24	F1 - CATTTCATAGCGACAGCAC	309 440	55	FARIA-JUNIOR, 2016
				F2 - AACACGGTTTGGTGGTTCTT			
				R - GGACTTTGGCCAAGCTTCTA			
<i>bla_{OXA-48}</i>	Oxacilinase	MH523449.1 (4410..5207)	<i>bla_{OXA-48}</i> -48, 54, 181, 162, 163, 199	F - GCGTGGTTAAGGATGAACAC	440	56	FARIA-JUNIOR, 2016
				R - ATCATCAAGTTCAACCCAACC			

Tabela 4. Lista dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados e condições de PCR (continuação)

Gene	Descrição do Locus	Alvo GenBank (posição)	Alelos detectáveis	Sequência (5' - 3')	Tamanho fragmento (pb)	Temp. anelam (°C)	Referência
<i>Tn4401</i>	Transposon	KC344543.1 (737..1387)	-	F - GAAGATGCCAAGGTCAATGC	651	57	Iniciadores desenhados neste estudo
				R - GGCACGGCAAATGACTA			
<i>rpoB</i>	Sub-unidade beta da RNA polimerase B	CP031817.1 (4,881,629..4,882,348)	-	F -GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTA CCGCTGTCTGAGATTACGC	720	55	
				R - TTGTGAGCGGATAACAATTTTC AGAACGGGTGTACTTGGTCA			
<i>gapA</i>	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase	CP031817.1 (3,030,465..3,031,042)	-	F -GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTA GACGGTCATCTGGTCGTTAAC	578	55	
				R - TTGTGAGCGGATAACAATTTTC TCGTAGGACGCTGCTTTTTTC			
<i>mdh</i>	Malato desidrogenase	CP031817.1 (495,522..496,225)	-	F - GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTA CTCGTTGTACGACATCGCTC	704	55	
				R - TTGTGAGCGGATAACAATTTTC AGAAGAAACGCGCATAGTGG			

Tabela 4. Lista dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados e condições de PCR (continuação)

Gene	Descrição do Locus	Alvo GenBank (posição)	Alelos detectáveis	Sequência (5' - 3')	Tamanho fragmento (pb)	Temp. anelam (°C)	Referência
<i>pgi</i>	Fosfoglicose isomerase	CP031817.1 (4,822,151..4,822,779)	-	F - GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTA AACTTCTTCGGTGCGGAAAC	629	55	Iniciadores desenhados neste estudo
				R - TTGTGAGCGGATAACAATTTTC CTGTCGTGGCTGCTAACTTC			
<i>phoE</i>	Fosforina E	CP031817.1 (4,007,021..4,007,507)	-	F - GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTA CCGTGAAGCGAAGAAACAGAA	487	55	
				R - TTGTGAGCGGATAACAATTTTC GTCATCGTTGATGCCGAGTTT			
<i>infB</i>	Fator de iniciação da tradução 2	CP031817.1 (561,744..562,150)	-	F - GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTA GGGTGGTATTACCCAGCACA	407	55	
				R - TTGTGAGCGGATAACAATTTTC GCTCAAGAACTTCAGCCTGC			
<i>tonB</i>	Transdutor de energia periplasmática	CP031817.1 (2,061,444..2,061,916)	-	F - GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTA GACGCAGCCGATAGAGATCA	473	55	
				R - TTGTGAGCGGATAACAATTTTC GCAGATTATCAATGCGGCCA			

4.6. Detecção molecular de genes *mcr* e *tetx* por meio de PCR quantitativo (qPCR)

A presença dos genes de resistência a polimixina, *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, e de resistência a tigeciclina, *tetX*, foi investigada por PCR quantitativo (qPCR) utilizando o termociclador QuantStudio 3 Applied Biosystems. As amostras de DNA foram purificadas com o kit *ReliaPrep DNA Clean-Up and Concentration System* (Promega). Todos os ensaios de qPCR foram implementados em placas de 96 poços com um volume final de 20 µL de mistura de reação (*GoTaq® Probe qPCR Master Mix* – Promega) seguindo protocolo do fabricante. Controles positivos e negativos, contendo todos os componentes da mistura de reação excetuando o DNA molde, foram usados em cada corrida de qPCR. Os oligonucleotídeos iniciadores e sonda de hidrólise foram desenhados utilizando a plataforma BLAST do banco de dados NCBI (do inglês, *National Center for Biotechnology Information*) (Tabela 5).

Tabela 5. Lista de oligonucleotídeos iniciadores e sondas de hidrólise utilizados para qPCR

Gene	Descrição do locus	Sequência (5'-3')	Alvo GenBank (posição)	Ref.
<i>mcr-1</i>	Fosfoetanolamina transferase	F - GGGTGTGCTACCAAGTTTGCTT	LC427672.1 (396...559)	Este estudo
		R - TATGCACGCGAAAGAAACTGGC		
		FAM - GCGCTGATTTTACTGCCTGTGGTG - BHQ1		
<i>mcr-2</i>		F - TGATGGGTGCTATGCTACTG	NG_051171.1 (270...363)	
		R – GTCACCGCACCCATAATCA		
		FAM - GTCGTGCTGTTATCCTATCGCTAT - BHQ1		
<i>mcr-3</i>		F - GAGCTCACCAACACCTATGA	NG_056184.1 (1231...1352)	
		R - TGATCGGAGACGTAGAGCA		
		FAM - CACCATCCGCTACACCGATTTTC - BHQ1		
<i>tetx</i>	F - GTCGCTAACCTACAAAAGATGA	NG_065852.1 (818...957)		
	R - GATGAATGGAAAAACCAAACGCA			
	FAM -CACGAATCAGTTCTTTGTAGCGTTC - BHQ1			

4.7. Sequenciamento genético de alelos *bla_{KPC}* e *bla_{NDM}*

O sequenciamento dos genes *bla_{KPC}* e *bla_{NDM}* foi realizado utilizando o sistema de reação *BigDye Terminator Cycle Sequencing v3.1* (Applied Biosystems) seguido protocolo fornecido pelo fabricante. A reação de sequenciamento foi purificada com o sistema *BigDye Xterminator* (Applied Biosystems) e, logo em seguida, analisada na plataforma de eletroforese capilar 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems®). As sequências obtidas foram identificadas pelo programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), pelo alinhamento e comparação com sequências disponíveis no banco de dados GenBank® (BENSON et al., 2012).

4.8. Tipagem por sequenciamento de múltiplos *loci* (MLST)

O MLST foi realizado de acordo com protocolo de Diancurt e colaboradores (2005), com alterações pontuais. O protocolo estabelece o sequenciamento de 7 *loci* para definição do tipo de sequência (ST): *rpoB*, *gapA*, *mdh*, *pgi*, *phoE*, *infB* e *tonB* (Tabela 4). Primeiramente foram realizadas amplificações para o conjunto de alvos descritos seguindo protocolo padronizado pelo instituto Pasteur (<https://bigsd.b.pasteur.fr/>). As reações do sequenciamento (BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing) foram feitas com o iniciador F universal. A análise do produto das reações foi feita através do sequenciador Genetic Analyzers 3500. As sequências geradas foram editadas no programa BioEdit (*Sequence Alignment Editor*). As sequências obtidas dos *loci* foram submetidas ao banco de dados do Instituto Pasteur para definição do tipo de sequência (ST) (<https://bigsd.b.pasteur.fr/klebsiella/klebsiella.html>).

4.9. Análise filogenética e construção do dendrograma

Para a análise filogenética de isolados ambientais e clínicos de *K. pneumoniae* carba-R, foi selecionada uma coleção de 50 cepas *K. pneumoniae* carba-R recuperadas de amostras clínicas em hospitais de Brasília, previamente caracterizada em estudo anterior (SILVA, 2019). Para construção do dendrograma foi utilizada uma sequência concatenada de 2.598 pares de base formada pelas sequências de seis genes essenciais: *rpoB*; *gap*; *mdh*; *pgi*; *phoE*; *infB*. O dendrograma foi construído no programa MEGAX, aplicando o método de agrupamento UPGMA. As porcentagens (teste de bootstrap) de árvores replicadas (1000 repetições) nos quais os táxons

associados se agruparam são mostradas próximas as ramificações. O dendrograma foi editado no programa ITOL v4 (<https://itol.embl.de/>) (LETUNIC; BORK, 2019).

4.10. Análise de dados

4.10.1. Análise Estatística

As análises estatísticas foram processadas no programa SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences® – IBM®*) versão 20. Para verificar possíveis associações estatísticas na distribuição da frequência foi utilizado o teste exato de Fisher. Resultados com valor de p menor ou igual a 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

4.10.2. Categorização das ETEs em função do perfil de demanda

Para análises de correlação da ocorrência de isolados de *K. pneumoniae* carbapenemase, as ETEs foram categorizadas em função de seus parâmetros de demanda. Os dados foram categorizados em três intervalos de valores: vazão (1- <100 L/s; 2 – 100 a 500 L/s; 3 – >500 L/s); número de internações (1 – <1000; 2 – 1.000 a 15.000 ; 3 – >15.000); número de hospitais (1 – 0; 2 – 1; 3 – $1 < x \leq 16$); número de economias ativas (1 – <2.000; 2 – 2.000 a 100.000; 3 – >100.000); participação da agricultura como trabalho formal (1 – <1%; 2 – 1% a 5%; 3 – >5%) (Tabela 6).

Tabela 6. Categorização das ETEs em função dos parâmetros de demanda

Categorias	Vazão (L/s)	Nº Economias Ativas	Nº Hospitais	Nº Internações	Trabalho com Agricultura	Área de Granja (m ²)
1	<100	<20000	0	<1000	<1%	<10.000
2	100-500	20000-100000	=1	1000 - 15000	1% -5%	>10.000
3	>500	>100000	>1≤16	>15000	>5%	

4.11. Financiamento

O trabalho contou com o apoio financeiro da FAP-DF por meio do edital de fomento FAP-DF 05/2016 “Demanda Induzida – Água” (processo – 193.000.713/2016).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Ocorrência de BGN carba-R em amostras de água e esgoto

Um total de 240 amostras de água e esgoto foram coletadas ao longo do estudo. A presença de bacilos Gram negativos resistentes a carbapenem (BGN carba-R) foi avaliada. Culturas de BGN carba-R foram detectadas em 81,6% (196/240) das amostras. A análise da distribuição de culturas de BGN carba-R por tipo de amostra mostrou que 100% (60/60) das amostras de esgoto bruto (EB) produziram culturas de BGN carba-R (Figura 7-A). Além disso, foi observado que a frequência de culturas de BGN carba-R manteve-se alta nas amostras de esgoto tratado (ET) (91,6% - 55/60) e nas amostras de água “à jusante” (AJ) (82,9% - 58/70). Em contrapartida, a frequência de culturas de BGN carba-R em amostras de água “à montante” (AM) foi menor: 46% (23/50). Análise estatística por Qui-quadrado mostrou que a distribuição de culturas de BGN carba-R foi estatisticamente diferente ($p < 0,05$) quando comparadas o grupo de amostras AM com o grupo de amostras EB, ET ou AJ.

Tem sido demonstrado que o esgoto funciona como potencial fonte de disseminação de bactérias resistentes a antimicrobianos de amplo espectro (HOELLE et al., 2019; HALLER et al., 2018; LUDDEN et al., 2017; ZURFLUH et al., 2017). Conforme hipótese desenhada neste estudo, na qual amostras AM representam condição ambiental possivelmente menos impactada pelo esgoto, os resultados sugerem que BGN carba-R presentes no esgoto bruto sobrevivem ao tratamento da ETE e alcançam o ambiente. Já foi demonstrado que processos de tratamento de esgoto podem não impedir a liberação de enterobactérias resistentes a carbapenem para o ambiente, fato que contribui para a contaminação de rios e lagos, terras agrícolas e cadeia produtiva da pesca; além de representar potencial risco de contaminação de seres humanos (LUDDEN et al., 2017).

A distribuição de culturas de BGN carba-R entre as ETEs também foi analisada (Figura 7-B). Para cada ETE coletou-se 20 amostras de água ou esgoto. A frequência de distribuição de culturas de BGN carba-R entre as ETEs mostrou-se estatisticamente diferente ($p < 0,05$). As ETEs Brasília Sul e Brazlândia apresentaram todas as amostras positivas para BGN carba-R (100% - 20/20). E, por outro lado, as ETEs Vale do Amanhecer (65% - 13/20) e Brasília Norte (70% - 14/20) apresentaram menor frequência de culturas positivas para BGN carba-R.

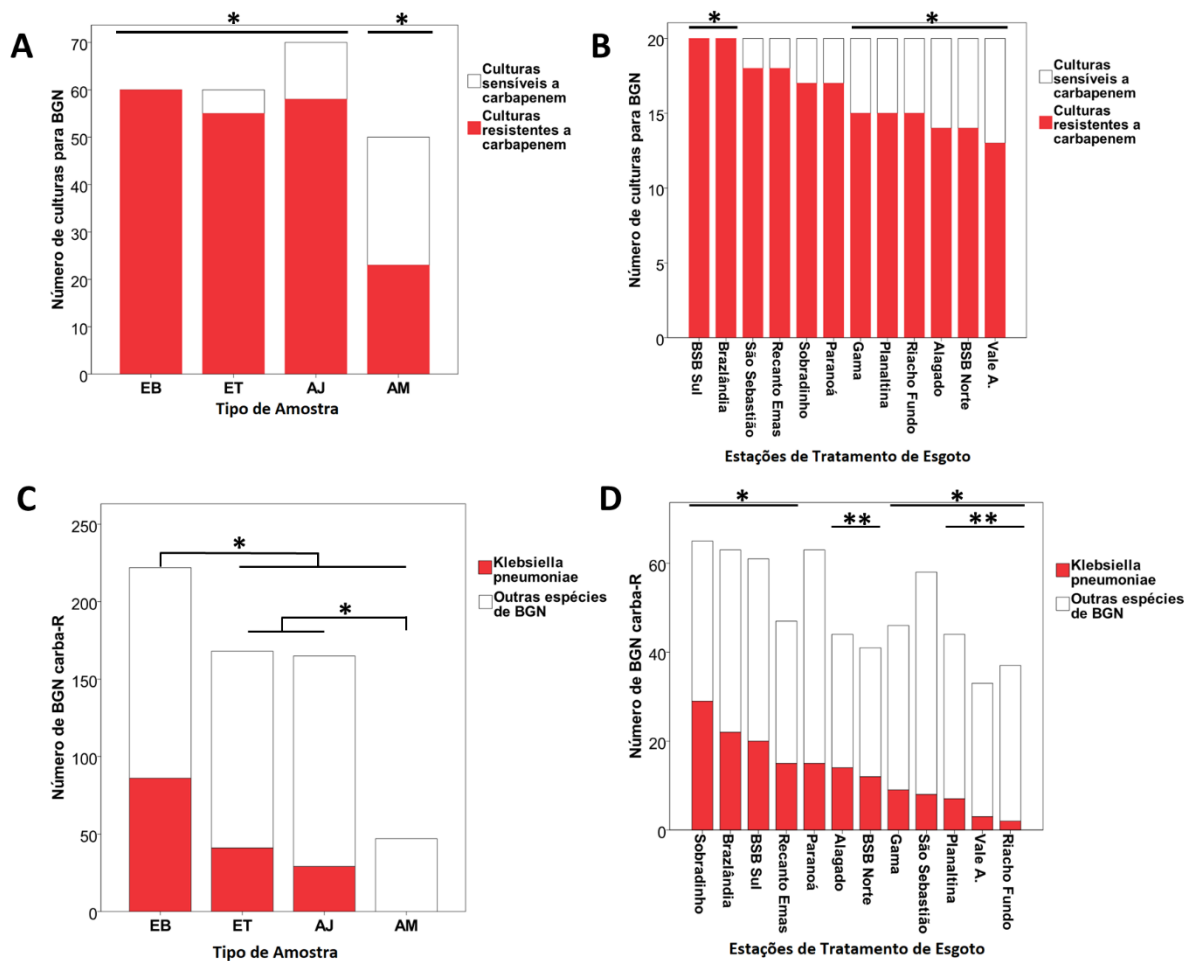


Figura 7. Culturas positivas para BGN carba-R e isolamento de *K. pneumoniae* nas amostras de água e esgoto. Frequência de culturas de BGN carba-R por tipo de amostra (A) e por ETE (B). Frequência de isolados *K. pneumoniae* e outros BGN carba-R recuperados por tipo de amostra (C) e por ETE (D). Marcações com asterisco indicam distribuição desigual ($p < 0,05$) para comparação entre os grupos assinalados.

5.2 Ocorrência de *K. pneumoniae* em meio a BGN carba-R

Do total de culturas de BGN carba-R, foram isolados 602 bacilos Gram negativos carba-R. Dentre as espécies recuperadas houve predomínio de saprófitas ambientais intrinsecamente resistentes a carbapenem. As espécies ou gêneros predominantes foram *Pseudomonas spp.* (47%), sendo a espécie *P. putida* a mais frequente (34,5%); *Klebsiella pneumoniae* (25,6%); *Enterobacter spp.* (9,6%); *Acinetobacter spp.* (6,8%); *Aeromonas spp.* (3,7%); *Stenotrophomonas maltophilia* (3,3%). Estudos demonstram que isolados ambientais de *P. putida* são

predominantemente resistentes a antibióticos β -lactâmicos, incluindo carbapenens, em função da ocorrência de bombas de efluxo e múltiplos genes cromossomais de β -lactamases. *P. putida* é considerada um reservatório ambiental para a resistência a β -lactâmicos (MOLINA et al., 2014; KITTINGER et al., 2016; MEIRELES et al., 2013; KIEBOOM; BONT, 2001). De forma semelhante, a susceptibilidade reduzida de isolados ambientais *S. maltophilia* aos antimicrobianos é associada a fatores intrínsecos de resistência comuns aos isolados de *S. maltophilia*, como baixa permeabilidade de membrana externa, presença de bombas de efluxo e expressão β -lactamases (ZHANG; LI; POOLE, 2000; SANCHEZ; HERNANDEZ; MARTINEZ, 2009). Apesar de *K. pneumoniae* ser intrinsecamente resistente à ampicilina devido a presença da penicilinase SHV-1 em seu cromossomo, não é comum a ocorrência de isolados ambientais de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenem (SINGH; TSERING; POONIA, 2014). Estudos têm mostrado que isolados ambientais de *K. pneumoniae* são significativamente mais suscetíveis a antibióticos do que isolados clínicos (MATSEN; SPINDLER; BLOSSER, 1974; SINGH; TSERING; POONIA, 2014).

Do total de BGN carba-R recuperados, 154 (25,6%) isolados correspondiam a espécie *K. pneumoniae*. A distribuição de *K. pneumoniae* carba-R por tipo de amostra foi estatisticamente diferente ($p < 0,05$) e mostrou o grupo de amostras EB como principal fonte de recuperação desta espécie (Figura 7-C). As amostras EB, ET e AJ responderam, respectivamente, por 55,8%, 25,3% e 18,8% do total de isolados de *K. pneumoniae* carba-R. Em contraposição, isolados de *K. pneumoniae* carba-R não foram recuperados do grupo de amostras AM, indicando não ser comum a ocorrência deste tipo de isolado em corpos d'água. A ausência de isolados de *K. pneumoniae* carba-R em pontos anteriores ao despejo de esgoto tratado (grupo de amostras AM) associada à presença de isolados de *K. pneumoniae* carba-R nos pontos a jusante (grupo de amostras AJ) indicam o esgoto bruto como principal fonte da disseminação desses isolados para o ambiente. Estudo com desenho amostral semelhante ao nosso também relatou a ausência *K. pneumoniae* carba-R em locais à montante do despejo de esgoto o que ressalta o impacto do esgoto, ainda que após tratamento, em matrizes ambientais (LEPUSCHITZ et al. 2019).

A frequência de isolados de *K. pneumoniae* carba-R por ETE foi analisado (Fig.7-D). Foram recuperados isolados de todas as ETEs sondadas, porém a ETE Sobradinho contribuiu com a maior proporção de isolados, 18,2% (28/154); e foi

seguida da ETE Brazlândia com 14,3% (22/154) e da ETE Brasília Sul com 12,3% (19/154) dos isolados. Contrariamente, as ETEs Riacho Fundo e Vale do Amanhecer exibiram as menores frequências de isolamento contribuindo com apenas 1,3% (2/154) e 1,9% (3/154) dos isolados de *K. pneumoniae* carba-R, respectivamente. A distribuição de isolados de *K. pneumoniae* carba-R entre as ETEs foi estatisticamente diferente ($p < 0,05$) na comparação entre grupos (Figura 7-D), demonstrando maior importância de algumas ETEs para a dispersão ambiental de *K. pneumoniae* carba-R.

5.3. Perfil de suscetibilidade de isolados de *K. pneumoniae* carba-R

O perfil de suscetibilidade a antimicrobianos foi estabelecido em 102 (66,2%) dos 154 isolados de *K. pneumoniae* carba-R e está representado na Figura 8. De acordo com a definição de Magiorakos et al. (2012), um isolado multirresistente (MDR, do inglês *multidrug-resistant*) apresenta não-suscetibilidade a pelo menos um agente de três ou mais classes de antimicrobianos. Neste estudo, todos os isolados de *K. pneumoniae* carba-R foram classificados como MDR, sendo que 82,3% (84/102) dos isolados apresentaram não-suscetibilidade a 9 dos 12 antimicrobianos testados. Com relação aos aminoglicosídeos testados, 29,4% (30/102) dos isolados apresentaram não susceptibilidade a amicacina e gentamicina simultaneamente. A não-suscetibilidade aos aminoglicosídeos amicacina e gentamicina ocorreu frequentemente (45,1% - 46/102) de forma excludente. Apesar da resistência detectada, aminoglicosídeos se mantêm como importante alternativa de controle para *K. pneumoniae* carba-R. Foi observado que 70,6% (72/102) dos isolados permaneciam suscetíveis a amicacina ou gentamicina (Figura 8). Este fato reforça a necessidade de teste de susceptibilidade que contemple os dois antimicrobianos. Além disso, 90,2% (92/102) dos isolados apresentaram não suscetibilidade a quinolonas (ciprofloxacino, levofloxacino e ácido nalidíxico).

Os isolados ambientais de *K. pneumoniae* carba-R exibiram alta frequência de resistência não só a β -lactâmicos como também a outras classes de antimicrobianos como as quinolonas (91 a 96%) e inibidor da via folato (93,1%) (Tabela 7). Como mencionado anteriormente, menor frequência de resistência foi observada contra os antimicrobianos amicacina (33,3% - 34/102) e gentamicina (46,0% - 47/102). Aminoglicosídeos costumam manter atividade contra *K. pneumoniae* produtora de carbapenemase e, por conta dessa tendência, têm sido utilizados na clínica, em

monoterapia ou combinação, para tratar infecções por produtores de KPC (PITOUT; NORDMANN; POIREL, 2015).

Espera-se que isolados ambientais de *K. pneumoniae* sejam significativamente mais suscetíveis a antibióticos do que isolados clínicos recuperados em ambiente hospitalar (MATSEN; SPINDLER, BLOSSER, 1974; SINGH; TSERING; POONIA, 2014). Diferente de ambientes comunitários e suas matrizes ambientais, o ambiente hospitalar exerce elevada pressão seletiva, advinda da dispensação e consumo concentrados de antibióticos, fato que favorece a seleção de cepas resistentes em ambiente hospitalar (KOLÁR; URBÁNEK; LÁTAL, 2001). A ocorrência de isolados de *K. pneumoniae* MDR em recursos hídricos é preocupante pelo potencial impacto em saúde pública em virtude do risco de infecções comunitárias por isolados MDR (VAN DUIN; PATERSON, 2016).

Tabela 7. Frequência de resistência dos isolados de *K. pneumoniae* carba-R (n = 102)

CATEGORIA	ANTIMICROBIANO	NÃO-SUSCETÍVEIS	
		N	%
Penicilinas + inibidor de β -lactamase	Amoxicilina-Ácido Clavulânico	102	100%
Cefalosporina 1ª Geração	Cefazolina	102	100%
Cefalosporina 3ª Geração	Ceftriaxona	101	99,02%
Cefalosporina 4ª Geração	Cefepime	101	99,02%
Carbapenem	Meropenem	102	100%
Aminoglicosídeo	Gentamicina	50	49,01%
	Amicacina	56	54,90%
Fluoroquinolona	Ciprofloxacino	98	96,07%
	Levofloxacino	93	91,17%
	Ácido Nalidíxico	96	94,11%
Nitrofurano	Nitrofurantoína	70	68,62%
Inibidor da síntese de folato	Sulfazotrim	95	93,13%

Isolados	Antimicrobianos testados												Presença de		Não suscetibilidade	
	MIPM	CZ	AMC	CRO	CPM	CIP	LEV	NAL	SUT	NIT	GEN	AM	<i>bla</i> _{KPC}	<i>bla</i> _{NDM}	AMINO	QUINO
237.5													+			
241.4													+			
229.6													+			
81.5														+		
245.2														+		
297.1														+		
232.3													+			
241.6													+			
161.5														+		
126.1														+		
217.3														+		
217.1														+		
162.1													+			
49.3													+			
289.2													+			
289.3													+			
169.1													+			
169.2													+			
265.3													+			
49.1													+			
301.3													+			
165.5													+			
163.1													+			
163.2													+			
262.1													+			
262.2													+			
297.2													+			
297.3													+			
229.5													+			
278.3													+			
232.1													+			
230.1													+			
286.5													+			
137.5													+			
253.1													+			
253.2													+			
93.1													+			
270.2													+			
260.1													+			
273.3													+			
164.3													+			
164.1													+			
94.2													+			
258.5													+			
260.2													+			
245.1													+			
306.6													+			
69.1													+			
164.2													+			
145.3													+			
301.2													+			
126.2													+			
270.1													+			
229.4													+			
230.2													+			
230.3													+			
232.2													+			
53.3													+			
285.3													+			
54.3													+			
144.2													+			
174.2													+			
206.1													+			
229.7													+			
241.5													+			
45.3													+			
294.2													+			
294.1													+			
125.1													+			
126.3													+			
233.6													+			
245.3													+			
280.2													+			
142.1													+			
137.4													+			
137.6													+			
149.5													+			
149.4													+			
174.1													+			
149.6													+			
173.3													+			
237.6													+			
142.3													+			
128.3													+			
77.4													+			
269.2													+			
173.4													+			
71.1													+			
142.2													+			
71.3													+			
293.3													+			
144.1													+			
269.3													+			
109.1													+			
221.2													+			
221.3													+			
293.2													+			
280.1													+			
165.4													+			
233.5													+			
145.4													+			
185.1													+			

Figura 8. Quadro com perfil de suscetibilidade e ocorrência de *bla*_{KPC} e *bla*_{NDM} em isolados ambientais de *K. pneumoniae* carba-R (n = 102). Eixo horizontal: isolados *K. pneumoniae* carba-R; Eixo vertical: perfil de susceptibilidade a antimicrobianos; detecção molecular dos genes *bla*_{KPC} e *bla*_{NDM}; AMINO: não-suscetibilidade a aminoglicosídeos (gentamicina e amicacina); QUINO: não-suscetibilidade a quinolonas (ciprofloxacino, levofloxacino e ácido nalidíxico). As cores representam: vermelho- resistente; amarelo- intermediário; verde- sensível. Siglas: MPM: meropenem; CFZ: cefazolina; AMC: amoxicilina+clavulanato; CRO: ceftriaxona; CPM: cefepime; CIP: ciprofloxacino; LEV: levofloxacino; NAL: ácido nalidíxico; SUT: sulfazotrim; NIT: nitrofurantoína; GEN: gentamicina; AMI: amicacina;

5.4. Frequência de genes de carbapenemases em isolados de *K. pneumoniae* carba-R

Todos os isolados de *K. pneumoniae* carba-R (n = 154) foram testados quanto à presença dos genes de carbapenemases *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP} e *bla*_{OXA-48}. Um quantitativo de 143 (92,85%) isolados foi positivo para pelo menos um dos genes *bla* testados; enquanto 11 isolados (7,1%) não portavam nenhum dos genes. Isolados de *K. pneumoniae* negativos para todas as carbapenemases testadas podem portar outros genes de carbapenemases que não foram testados ou outros determinantes genéticos combinados que conferem resistência a carbapenem. O gene *bla*_{KPC} foi detectado em 98 isolados (63,6%); seguido de *bla*_{NDM} presente em 54 isolados (35,1%). Nove isolados (5,8%) de *K. pneumoniae* carba-R portavam simultaneamente *bla*_{KPC} e *bla*_{NDM}. No Brasil, este parece ser o primeiro relato de isolados ambientais de *K. pneumoniae*, recuperados de esgoto, portando simultaneamente genes de carbapenemases KPC e NDM. Os genes *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP} e *bla*_{OXA-48} não foram detectados nos isolados analisados.

A distribuição de isolados de *K. pneumoniae* carba-R portando *bla*_{KPC} ou *bla*_{NDM} por tipo de amostra foi avaliada (tabela 8). Cabe lembrar que nenhum isolado *K. pneumoniae* carba-R foi recuperado do grupo de amostras AM e, portanto, este tipo de amostra não consta nas análises que seguem. O gene *bla*_{KPC} foi detectado em 60,4% (52/86) dos isolados recuperados de EB, em 71,8% (28/39) dos isolados de ET, e em 62% (18/29) dos isolados de AJ. Em relação ao gene *bla*_{NDM}, este foi detectado em 34,9% (30/86) dos isolados recuperados de EB, em 35,9% (14/39) dos isolados de ET, e em 34,5% (10/29) dos isolados de AJ. Não foi encontrada correlação

significativa ($p>0,05$) na distribuição de isolados portando *bla_{KPC}* ou *bla_{NDM}* em função dos tipos de amostras (EB, ET e AJ).

O gene *bla_{KPC}* tem sido reportado principalmente em isolados recuperados de amostras clínicas, em ambiente hospitalar. Entretanto, *bla_{KPC}* já foi identificado em isolados recuperados de matrizes ambientais tais como rede de esgotos, águas de rios urbanos, além de águas costeiras recreacionais (MONTEZZI et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2013; YANG et al., 2016). Apesar da emergência de isolados produtores de NDM ter ocorrido em ambiente comunitário, a disseminação mundial aconteceu principalmente em ambientes hospitalares, com relatos em todo o mundo inclusive em hospitais de cidades brasileiras como Brasília (WALSH et al., 2011; CARVALHO-ASSEF et al., 2013; FARIA-JUNIOR, 2016). Assim como ocorre com *bla_{KPC}*, a ocorrência de *K. pneumoniae* positiva para *bla_{NDM}* em matrizes ambientais tem sido descrita, apesar dos isolados serem de predomínio hospitalar (CAMPANA et al., 2017). De forma contrária, a co-ocorrência de *bla_{KPC}* e *bla_{NDM}* tem sido relatada em isolados de casos clínicos (XU et al., 2020; TEKELI ET AL., 2020).

A presença de isolados de *K. pneumoniae* portando *bla_{KPC}* ou *bla_{NDM}* em matrizes ambientais é preocupante, e traz à tona a capacidade de sobrevivência e disseminação ambiental de espécies bacterianas clinicamente relevantes e multirresistentes. Além do mais, estudos consideram *K. pneumoniae* um rico reservatório e importante disseminador de genes de resistência de espécies ambientais (WYRES; HOLT, 2018). A presença destes isolados no ambiente facilita a transferência horizontal de genes de resistência entre espécies ambientais e clínicas alterando o resistoma original de habitats aquáticos (MARTÍNEZ; COQUE; BAQUERO, 2014).

Tabela 8. Frequência de distribuição de isolados *K. pneumoniae* positivos para genes *bla* nas amostras analisadas

GENE	Positividade Geral		TIPO DE AMOSTRA COLETADA						Valor <i>p</i>
	Contagem (N= 154)	%	EB		ET		AJ		
			Contagem (N= 86)	%	Contagem (N= 39)	%	Contagem (N= 29)	%	
<i>bla_{KPC}</i>	98	63,6	52	60,4	28	71,8	18	62	0,457
<i>bla_{NDM}</i>	54	35	30	34,9	14	35,9	10	35,4	0,991

A distribuição de isolados de *K. pneumoniae* carba-R portando *bla_{KPC}* ou *bla_{KNDM}* (*bla_{KPC/NDM}*) por tipo de amostra e ETE foi analisado (Tabela 9). Isolados positivos para *bla_{KPC/NDM}* (n = 143) foram recuperados de 11 das 12 ETEs analisadas; a exceção foi a ETE Riacho Fundo. ETE Sobradinho (16,0% – 23/143), seguida de Brazlândia (15,3% - 22/143) e Brasília Sul (13,2% - 19/143) apresentaram as maiores frequências de recuperação de isolados *bla_{KPC/NDM}*. Ao mesmo tempo, observou-se que em cinco das ETEs analisadas isolados *bla_{KPC/NDM}* foram recuperados de todos os tipos de amostras (EB, ET e AJ), indicando que isolados portando *bla_{KPC/NDM}* sobrevivem ao tratamento de esgoto e contaminam o ambiente em pelo menos 45% das ETEs. Por outro lado, os isolados *bla_{KPC/NDM}* detectados nas ETEs Gama, Planaltina, Brasília Norte e Vale do amanhecer concentraram-se exclusivamente em EB (Tabela 9). De forma geral, observou-se que a maioria dos isolados de *K. pneumoniae* carba-R *bla_{KPC/NDM}* concentraram-se em esgoto bruto, endossando sua importância na disseminação ambiental destes isolados multirresistentes (LUDDEN et al., 2017).

Tabela 9. Distribuição dos isolados de *K. pneumoniae* carba-R portando *bla*_{KPC} ou *bla*_{NDM} em função do tipo de amostra e ETEs

Estação de Tratamento de Esgoto	Isolados portando <i>bla</i> _{KPC} ou <i>bla</i> _{NDM}		
	EB % (N)	ET % (N)	AJ % (N)
Sobradinho (n=23)	30,4% (7/23)	34,8% (8/23)	34,8% (8/23)
Brazlândia (n=22)	36,4% (8/22)	36,4% (8/22)	27,3% (6/22)
Brasília Sul (n=19)	47,4% (9/19)	10,5% (2/19)	42,1% (8/19)
Paranoá (n=15)	13,3% (2/15)	60% (9/15)	26,7% (4/15)
Recanto das Emas(n=15)	46,7% (7/15)	53,3% (8/15)	-
Alagado (n=12)	75% (9/12)	16,7% (2/12)	16,7% (2/12)
Brasília Norte (n=11)	100% (11/11)	-	-
Gama(n=9)	100% (9/9)	-	-
Planaltina (n=7)	100% (7/7)	-	-
São Sebastião (n=8)	87,5% (7/8)	12,5% (1/8)	-
Vale do Amanhecer (n=2)	100% (2/2)	-	-
Riacho Fundo (n=0)	0% (0/0)	-	-

Ações antrópicas refletidas pela presença de hospitais, pecuária, densidade populacional elevada influenciam na composição microbiológica do esgoto e podem funcionar como fonte de isolados bacterianos multirresistentes de importância clínica (LUDDEN et al., 2017; SANDERSON, 2018; HALLER et al., 2018). Tendo este cenário em vista, e na tentativa de evidenciar associações entre a ocorrência de *K. pneumoniae* carba-R e parâmetros de demanda associados às ETEs, foi selecionada para análise estatística uma coleção de 141 isolados de BGN carba-R (40 isolados *K. pneumoniae* e 101 BGN de diversas espécies) todos caracterizados quanto à presença dos genes de carbapenemases *bla*_{KPC} e *bla*_{NDM}. Dentre os 101 isolados de BGN selecionados, 18 (17,8%) portavam *bla*_{KPC} ou *bla*_{NDM}. Já entre os 40 isolados de *K. pneumoniae*, 38 (95%) portavam algum dos dois genes. Estes dados indicam que em *K. pneumoniae* o principal mecanismo de resistência a carbapenem ocorre pela

ação de carbapenemases, já em outras espécies de BGN (principalmente espécies saprófitas intrinsecamente resistentes a carbapenem) este não é o mecanismo de resistência predominante.

A ocorrência de BGN positivos para *bla_{KPC/NDM}* foi estatisticamente associada ao número de hospitais e internações; ao volume de tratamento (vazão) e número de economias ativas atendidos pelas ETEs (Tabela 10). De forma semelhante, a ocorrência de *K. pneumoniae* portando *bla_{KPC/NDM}* foi associada ao número de internações, ao volume de tratamento e ao número de economias ativas atendidos pelas ETEs. Não foi encontrada correlação estatística com aspectos associados a agricultura ou criação de animais. As análises estatísticas descritas sugerem que a ocorrência de isolados de BGN e *K. pneumoniae* portadores de *bla_{KPC/NDM}* é influenciada por aspectos hospitalares e comunitários.

O esgoto hospitalar tem notória importância como fonte de enterobactérias portando genes de carbapenemases (ZHANG; LU; ZONG, 2012; PICÃO et al., 2013; HALLER et al., 2018; CAHILL et al., 2019). Estudos frequentemente relacionam o esgoto hospitalar com a disseminação ambiental (matrizes aquáticas) de *K. pneumoniae* portando genes de carbapenemases (LUDDEN et al., 2017; MAHON et al., 2017). Os hospitais são locais críticos para a emergência e propagação de bactérias resistentes a antibióticos e fornecem oportunidade única para cepas bacterianas interagirem, proliferarem e infectarem populações vulneráveis (CERCEO et al., 2016; BITTERMAN et al., 2016). Além de funcionar como reservatório de bactérias multirresistentes, o esgoto hospitalar pode conter antimicrobianos, metais pesados e desinfetantes (MARTINS et al., 2014; OBERLÉ et al., 2012). Esses compostos exercem pressão seletiva favorecendo a persistência de isolados bacterianos resistentes a antimicrobianos, mesmo quando presentes em concentrações muito baixas (GULLBERG et al., 2011).

Apesar do ambiente hospitalar ter papel notório na resistência antimicrobiana, aspectos comunitários (como densidade populacional) também são importantes na disseminação de resistência antimicrobiana para o ambiente (SANDERSON, 2018). Em uma região sem instalações médicas, estudo mostrou que o nível de resistência a antimicrobianos estava relacionado com o nível de ocupação do território (SANDERSON, 2018).

Tabela 10. Análise de frequência dos BGN_{KPC/NDM} em função dos parâmetros associados às ETEs

Parâmetros associados a ETE	BGN _{KPC/NDM} pos. vs. BGN _{KPC/NDM} neg.	Valor <i>p</i>	K.p _{KPC/NDM} vs. BGN carba-R	Valor <i>p</i>
Nº de Hospitais				
0	5/27 (18,5)	p=0,032	4/27 (14,8)	p=0,106
=1	36/84 (42,9)	Linear=0,021	22/84 (26,2)	Linear=0,037
>1≤16	15/30 (50)		12/30 (40)	
Nº de Internações				
<1000	10/46 (21,7)	p=0,001	9/46(19,6)	p=0,020
1000 - 15000	40/88 (45,5)	Linear=0,000	24/88(27,3)	Linear=0,026
>15000	7/6 (85,7)		5/7(71,4)	
Volume de tratamento (vazão - L/s)				
<100	22/57 (38,6)	p=0,043	13/57 (22,8)	p=0,030
100-500	28/77(36,4)	Linear=0,295	20/77(26,0)	Linear=0,097
>500	6/7 (85,7)		5/7(71,4)	
Nº Economias Ativas				
<20000	5/28 (17,9)	p=0,002	4/28(14,3)	p=0,011
20000-100000	45/106 (42,5)	Linear=0,001	29/106 (27,4)	Linear=0,009
>100000	6/7 (85,7)		5/7(71,4)	
Trabalho com Agricultura				
<1%	20/65 (30,8)	p=0,052	16/65(24,6)	p=0,421
1% -5%	22/40 (55)	Linear=0,253	14/40 (35)	Linear= 1,000
>5%	14/36 (38,9)		8/36(22,2)	
Granja (m²)				
<10.000	38/105 (36,2)	p=0,169	28/105 (26,7)	p=1,000
>10.000	18/36 (50)	Linear=0,169	10/36 (27,8)	Linear=1,000

Legenda: BGN_{KPC/NDM} pos. indica BGN positivos para os genes *bla*_{KPC} ou *bla*_{NDM};
 BGN_{KPC/NDM} neg. indica BGN negativos para um dos dois genes;
 K.p_{KPC/NDM} indica K. pneumoniae positiva para um dos dois genes;
 BGN carba-R indica todo BGN resistente a carbapenem com exceção de K.p_{KPC/NDM}.

5.5. Sequenciamento genético de *bla_{KPC}* e *bla_{NDM}*

Das 98 cepas que portavam o gene *bla_{KPC}*, 95 tiveram o gene sequenciado. Dessas, 97,9% (93/95) possuíam o alelo *bla_{KPC-2}* e 2,1% (2/95) *bla_{KPC-3}*. Adicionalmente, genes *bla_{NDM}* de 52 das 54 cepas positivas também foram sequenciados. Todos os *amplicons* sequenciados correspondiam ao alelo *bla_{NDM-1}*.

Em contexto clínico, sabe-se que a variante *bla_{KPC-2}* é a mais frequente em cepas de enterobactérias em qualquer região do planeta, incluindo Brasil (PITOUT; NORDMANN; POIREL, 2015; WALTHER-RASMUSSEN; HOIBY, 2007; PEREIRA et al., 2012). Em estações de tratamento de esgoto hospitalar, a ocorrência de *K. pneumoniae* positiva para *bla_{KPC-2}* foi inicialmente reportada no Brasil em 2011 (CHAGAS et al., 2011). Na China, o esgoto é associado a ocorrência do gene *bla_{KPC-2}* em águas superficiais de rios; e seu tratamento é associado ao enriquecimento dos níveis de resistência a jusante do rio receptor (YANG et al., 2017).

O alelo *bla_{KPC-3}* ganhou atenção nos últimos anos pois impacta diretamente em novas terapias. Isolados positivos para *bla_{KPC-3}* são resistentes à ceftazidima-avibactam, antimicrobiano recentemente inserido na clínica como alternativa para tratamento de infecções por isolados resistentes a carbapenem (SHIELDS et al., 2016) Relatos de *K. pneumoniae* portador de *bla_{KPC-3}* recuperada de estações de tratamento de esgoto já foram feitos no Brasil e Itália (PERILLI et al., 2013; TEIXEIRA et al., 2020).

Entre os 24 alelos de *bla_{NDM}*, *bla_{NDM-1}* tem o maior espectro de hospedeiros identificado até o momento e foi encontrado em várias espécies bacterianas pertencentes a 11 famílias. O alelo NDM-1 é o mais comum em cepas de *K. pneumoniae* (KAZMIERCZAK et al., 2015).

5.6 Ocorrência do transposon *Tn4401* em isolados de *K. pneumoniae* positivos para *bla_{KPC}*

No sentido de investigar a disseminação mundial de *K. pneumoniae* portadora de *bla_{KPC}*, vários estudos esmiuçaram o ambiente genético em torno desse gene. Uma das evidências encontradas foi a presença universal de um transposon carreador de *bla_{KPC}*, o *Tn4401* (NAAS et al., 2008). Dado este fato, as cepas ambientais foram testadas quanto a presença de *Tn4401* e em 100% (n=98) das cepas portando *bla_{KPC}*, o transposon *Tn4401* foi detectado. Sendo assim, pode-se afirmar que nas cepas de *K. pneumoniae* carba-R deste estudo, o elemento genético responsável pela

dispersão do gene *bla_{KPC}* é *Tn4401*. *Tn4401* já foi relatado em cepas de *K. pneumoniae* positivas para *bla_{KPC}* isoladas de matrizes ambientais (OLIVEIRA et al., 2013; PERILLI et al., 2013; PICÃO et al., 2013). Deste modo, os resultados reforçam a importância de *Tn4401* para disseminação de *bla_{KPC}*, independentemente da fonte de isolamento das cepas (amostras clínicas ou matrizes ambientais).

5.7 Frequência de genes de resistência a polimixina e tigeciclina

Na prática médica, os antimicrobianos tigeciclina e polimixina são, muitas vezes, o último recurso terapêutico para infecção por cepa de *K. pneumoniae carba-R* (FRITZENWANKER et al., 201; RODRÍGUEZ-BAÑO et al., 2018). Diante disso, a fim de sondar a resistência a esses antimicrobianos de último recurso, 121 cepas de *K. pneumoniae carba-R* da coleção (n = 154) foram testadas quanto à presença de genes de resistência a polimixina (*mcr-1*, *mcr-2* e *mcr-3*) e a tigeciclina (*tetX*).

Dentre os genes de resistência a polimixina testados, duas cepas (1,6% - 2/121) foram positivas para *mcr-2*. Além disso, ambas as cepas também portavam *bla_{KPC}*. Este parece ser o primeiro relato de cepas ambientais positivas para *bla_{KPC}* e *mcr-2* recuperadas do esgoto no Brasil. A co-ocorrência dos genes *bla_{KPC}* e *mcr* é preocupante pois em ambiente nosocomial poucas opções terapêuticas permanecem ativas contra a *K. pneumoniae* produtora de KPC resistente à polimixina (ANTOCHEVIS et al., 2018). O gene *tetX*, determinante de resistência a tigeciclina, não foi detectado nas cepas analisadas. No Brasil, não foram encontrados relatos de casos de cepas clínicas portando *tetX*.

5.8 Tipos de sequência (ST) e complexos clonais (CC) em cepas ambientais de *K. pneumoniae carba-R*

Perfis alélicos, tipos de sequência (ST) e complexos clonais (CC) foram determinados em 51 cepas de *K. pneumoniae carba-R* (Tabela 11). Os STs identificados foram agrupados em seus respectivos CCs compreendendo o ST ancestral e seus variantes de único *locus* (SLV) ou de duplo *loci* (DLV). O perfil alélico foi completamente definido em 42 cepas com definição de ST em 34 cepas [ST11 (n = 13); ST340 (n = 7); ST15 (n = 4); ST784 (n = 2); ST2703 (n = 2); ST17 (n=1); ST147 (n = 1); ST273 (n = 1); ST735 (n = 1); ST855 (n = 1); ST1642 (n = 1)] (Tabela 11). Para oito cepas, os perfis alélicos definidos não possuíam registro no banco de dados de MLST do Instituto Pasteur. Além do mais, nove cepas não apresentaram amplificação

para o *locus mdh*, e foram definidas como SLV (n = 5) e DLV (n = 3); além do mais para uma das cepas não foi possível determinar ST (Tabela 11).

No geral, 13 CC foram detectados (CC11, CC15, CC17, CC2703, CC1224, CC1859, CC3036, CC147, CC438, CC735, CC1584, CC1642, CC3539) dentre as 51 cepas analisadas. Cepas de *K. pneumoniae* carba-R de CC11 (ST11, ST340 e ST855) (47%) foram predominantes, e foram seguidas de cepas do CC15 (9,8%), CC17(5,8%) e CC2703 (5,8%). Dos CCs identificados aqui em isolados ambientais, 6 (46,1%) CCs (CC11, 15, 17, 147, 1224 e 2703) têm sido envolvidos em casos esporádicos de infecção hospitalar bem como surtos hospitalares (ZHANG et al. 2017; NAVON-VENEZIA; KONDRATYEVA; CARATTOLI, 2017). Apesar de não possuir a capacidade epidêmica de cepas do C11, os CC15, CC147 e CC17 são identificados em cepas de infecções nosocomiais sendo considerados linhagens clinicamente importantes (RODRIGUES et al., 2014; MARKOVSKA et al., 2017; PROTONOTARIOU et al., 2018). O CC11 é frequentemente detectado em cepas de infecções nosocomiais que predominantemente portam *bla_{KPC}* (SEKI et al., 2011; NICOLETTI et al., 2012; PEREIRA et al., 2012; TOLENTINO et al., 2019). Neste estudo, 95,8% (23/24) das cepas pertencentes ao CC11 também portavam *bla_{KPC}* (Tabela 11). Além disso, cepas do CC11 foram detectadas em todas as ETEs avaliadas, com exceção da ETE São Sebastião. Isto evidencia a disseminação de cepas do CC11 carba-R em matrizes ambientais do Distrito Federal. Além do mais, estes resultados revelam que parte considerável de cepas ambientais de *K. pneumoniae* carba-R pertencem a linhagens genéticas de notório potencial epidêmico (CC11) (MATHERS; PEIRANO; PITOUT, 2015). Ao contrário da predominância de *bla_{KPC}* em cepas pertencentes ao CC11, 100% (5/5) das cepas de *K. pneumoniae* carba-R do CC15 portavam *bla_{NDM}*. Apesar de não haver linhagem predominante na disseminação de *bla_{NDM}*, cepas pertencentes ao CC15 (ST14, ST15) são relatadas na literatura como um dos tipos mais comuns em *K. pneumoniae* portando *bla_{NDM}* (POIREL et al., 2010; GISKE et al., 2012). O CC2703 também já foi relatado em cepas clínicas de *K. pneumoniae* em estudo realizado em hospitais de Brasília (SILVA, 2019). Ademais, não encontramos na literatura relatos sobre os demais CC detectados.

Tabela 11. Perfil alélico, tipo de sequência (ST), complexo clonal (CC) e gene *bla* associados a cepas ambientais de *K. pneumoniae* carba-R

Isolado	ETE ⁴	Alelos <i>bla</i>	<i>rpoB</i>	<i>gapA</i>	<i>mdh</i>	<i>pgi</i>	<i>phoE</i>	<i>infB</i>	<i>tonB</i>	ST	CC
133.3	Alagado	NDM-1	1	3	1	1	1	3	4	11	11
241.6	Alagado	KPC-3	1	3	1	1	1	3	4	11	11
229.6	Brazlândia	KPC-2	1	3	1	1	1	3	4	11	11
49.1	BSB Norte	KPC-2	1	3	1	1	1	3	4	11	11
273.3	BSB Sul	KPC-2	1	3	1	1	1	3	4	11	11
69.1	BSB Sul	KPC-2	1	3	1	1	1	3	4	11	11
261.1	Paranoá	KPC-2	1	3	1	1	1	3	4	11	11
261.2	Paranoá	KPC-2	1	3	1	1	1	3	4	11	11
262.1	Paranoá	KPC-2	1	3	1	1	1	3	4	11	11
306.4	Paranoá	KPC-2+NDM-1	1	3	1	1	1	3	4	11	11
289.1	Planaltina	KPC-2	1	3	1	1	1	3	4	11	11
285.3	Rec. Emas	KPC-2	1	3	1	1	1	3	4	11	11
53.3	Rec. Emas	KPC-2	1	3	1	1	1	3	4	11	11
229.4	Brazlândia	KPC-2	1	3	1	1	1	3	18	340	11
229.5	Brazlândia	KPC-2	1	3	1	1	1	3	18	340	11
237.4	BSB Norte	-	1	3	1	1	1	3	18	340	11
297.3	Gama	KPC-2	1	3	1	1	1	3	18	340	11
297.2	Gama	KPC-2	1	3	1	1	1	3	18	340	11
77.4	São Sebas. ⁴	KPC-2	1	3	1	1	1	3	18	340	11
265.2	Vale A. ⁴	-	1	3	1	1	1	3	18	340	11
237.5	BSB Norte	KPC-2	1	3	1	1	1	3	26	855	11
169.1	Brazlândia	KPC-2	1	3	1	1	1	3	272	SR ²	11
49.3	BSB Norte	KPC-2	1	3	1	1	324	3	4	SR ²	11
306.5	Paranoá	KPC-2+NDM-1	1	3	1	1	1	3	512	SR ²	11
237.6	BSB Norte	NDM-1	1	1	1	1	1	1	1	15	15
81.5	Planaltina	NDM-1	1	1	1	1	1	1	1	15	15
173.3	Rec. Emas	NDM-1	1	1	1	1	1	1	1	15	15
253.1	São Sebas. ⁴	NDM-1	1	1	1	1	1	1	1	15	15
149.5	Gama	NDM-1	1	1	1	1	1	1	504	SR ²	15
265.1	Vale A. ⁴	KPC-2	4	2	1	1	4	1	4	17	17
145.3	BSB Norte	KPC-2+NDM-1	5	2	1	1	27	1	4	784	17
145.4	BSB Norte	KPC-2+NDM-1	5	2	1	1	27	1	4	784	17
301.1	BSB Norte	KPC-2	4	3	6	1	7	4	38	147	147
142.1	Paranoá	NDM-1	4	3	6	1	7	4	4	273	147
125.1	Sobradinho	NDM-1	4	3	6	7	1	4	512	SR ²	438
293.3	Alagado	KPC-2+NDM-1	21	17	28	20	113	19	166	735	735
71.2	BSB Sul	NDM-1	38	18	NA ¹	63	142	67	106	DLV-ST1224	1224
71.3	BSB Sul	NDM-1	38	18	NA ¹	63	142	67	106	DLV-ST1224	1224
45.1	Brazlândia	KPC-2+MCR-2	13	18	NA ¹	16	25	22	165	SLV-ST1584	1584
269.1	Sobradinho	KPC-2	18	50	147	20	150	19	272	1642	1642
46.4	Brazlândia	KPC-2+MCR-2	37	18	NA ¹	108	98	22	227	SLV-ST1859	1859
46.5	Brazlândia	KPC-2	37	18	NA ¹	108	98	22	227	SLV-ST1859	1859
294.1	Alagado	KPC-2+NDM-1	8	2	11	1	9	1	24	2703	2703

Tabela 11. Perfil alélico, tipo de sequência (ST), complexo clonal (CC) e gene *bla* associados a cepas ambientais de *K. pneumoniae* carba-R (continuação)

Isolado	ETE ⁴	Alelos <i>bla</i>	<i>rpoB</i>	<i>gapA</i>	<i>mdh</i>	<i>pgi</i>	<i>phoE</i>	<i>infB</i>	<i>tonB</i>	ST	CC
161.5	BSB Sul	NDM-1	8	2	11	1	9	1	24	2703	2703
294.2	Alagado	KPC-2+NDM-1	8	4	11	1	9	1	24	SR	2703
221.1	BSB Sul	KPC-2	1	42	NA ¹	16	32	22	411	DLV-ST3026	3036
109.1	BSB Sul	KPC-2	13	42	NA ¹	16	32	22	411	SLV-ST3026	3036
257.1	Sobradinho	-	105	20	NA ¹	223	193	23	286	SLV-ST3539	3539
293.1	Alagado	KPC-2+NDM-1	18	50	53	20	187	19	148	SR ²	ND ³
293.2	Alagado	KPC-2+NDM-1	18	50	282	20	187	19	148	SR ²	ND ³
71.1	BSB Sul	NDM-1	38	12	NA ¹	63	142	67	106	ND ³	ND ³

¹ Alelo não amplificado

² Perfil alélico sem registro

³ ST/CC não determinado

⁴ Vale do Amanhecer/São Sebastião

5.9 Análise filogenética de isolados clínicos e ambientais de *K. pneumoniae* carba-R

A fim de evidenciar possível relação filogenética entre cepas clínicas e ambientais de *K. pneumoniae* carba-R, um dendrograma foi construído com base no alinhamento de sequências concatenadas (2.598 pares de base) de seis genes essenciais (*rpoB*; *gap*; *mdh*; *pgi*; *phoE*; *infB*) (Figura 9). No total foram selecionadas 90 cepas para a construção da árvore filogenética: 40 cepas ambientais de *K. pneumoniae* deste estudo e uma coleção de 50 cepas *K. pneumoniae* carba-R recuperadas de amostras clínicas de hospitais brasileiros previamente caracterizada em estudo anterior (SILVA, 2019). O dendrograma ainda reuniu características fenotípicas (resistência a todos aminoglicosídeos ou quinolonas testados) e genotípica (positividade dos genes *bla_{KPC}* ou *bla_{NDM}*) que reforçam o agrupamento dos clados (Figura 9).

De 13 CCs dispostos no dendrograma, 5 (38,4%) CC (11, 15, 17, 147 e 2703) foram compartilhados entre cepas ambientais e clínicas de *K. pneumoniae* carba-R. Cepas pertencentes ao CC11 (n = 47) foram predominantemente (47/90 - 52,2%) compartilhados entre cepas clínicas (n = 24) e ambientais (n = 23). Diferentemente, para outros complexos clonais não foi verificada distribuição tão equânime em função do ambiente de recuperação das cepas. Outras 16 cepas (17,8%) pertenciam ao CC2703 sendo 3 cepas ambientais e 13 clínicas. A ocorrência de Kp carba-R do CC11

em matrizes ambientais já foi relatada no Brasil, mostrando que a disseminação comunitária de cepas carba-R de potencial epidêmicos está em curso no Brasil (OLIVEIRA et al., 2013; CERDEIRA; et al., 2017; NASCIMENTO et al., 2017)

Dentre os agrupamentos gerados no dendrograma, 4 clados (com valor de bootstrap variando de 65 a 74) agruparam cepas clínicas e ambientais de *K. pneumoniae* carba-R. Cepas destes clados corresponderam a 31% (18 cepas clínicas e 10 ambientais) do total de cepas analisadas. O clado 1 (com valor de bootstrap 74) reuniu cepas clínicas e ambientais do CC15, todas (n=7) com resistência a quinolonas (levofloxacino, ácido nalidíxo e ciprofloxacino) e positivas para *bla*_{NDM}. Por sua vez, o clado 2 (com valor de bootstrap 69) agrupou um maior número de cepas ambientais e clínicas (n=15) caracterizadas, em sua maioria (73,3%), por pertencer ao CC2703, ser resistente a aminoglicosídeos (amicacina e gentamicina) e portar *bla*_{NDM}. Os clados 3 e 4 (ambos com bootstrap de 67) foram caracterizados, respectivamente, por agrupar cepas positivas para *bla*_{KPC}; e por agrupar cepas positivas para *bla*_{NDM} resistentes a quinolonas.

Clados com valores de bootstrap acima de 80 agruparam apenas cepas clínicas (bootstrap de 87) ou cepas ambientais (bootstrap de 100) (Figura 9).

As comparações genômicas de *K. pneumoniae* de diversas fontes são raras, contudo mostram evidências de que cepas ambientais e nosocomiais espalham-se por diferentes ramos filogenéticos; mas que em alguns casos, cepas de fontes diferentes compartilham mesmo clado, sugerindo que algumas linhagens são competentes para sobreviver a habitats diferentes (RUNCHAROEN et al., 2017). Estudo de análise genômica realizado na Áustria mostrou que cepas ambientais e clínicas de *K. pneumoniae* compartilhavam *clusters* (LEPUSCHITZ et al. 2019). Além disso, apresentavam semelhantes perfis de resistência antimicrobiana, mesmo conjunto de genes de virulência e mesmo conteúdo de plasmídeos (LEPUSCHITZ et al. 2019). Corroborando estes achados, estudo mostrou que cepas de *K. pneumoniae*, incluindo aquelas reconhecidas como patógenos hospitalares de distribuição global, podem alcançar e proliferar em vários habitats, proporcionando oportunidade de troca genética com uma ampla gama de espécies bacterianas (WYRES; HOLT, 2018).

K. pneumoniae carba-R de CC11 tem notável habilidade de adaptação em ambiente nosocomial, além de notória capacidade de transportar diferentes classes de carbapenemases (KPC, NDM, OXA-48, VIM, NDM) (WOODFORD; TURTON;

LIVERMORE, 2011). Nesse cenário, a ocorrência em matrizes ambientais de cepas de *K. pneumoniae* de CC11 portando genes de carbapenemases mostra a capacidade de adaptação dessa linhagem e alerta sobre a disseminação ambiental de cepas com potencial risco para a saúde pública.

Este é o primeiro estudo que relatou a ocorrência de *K. pneumoniae* portando *bla_{KPC/NDM}* em corpos d'água no Distrito Federal. A demonstração da ocorrência de isolados de *K. pneumoniae* multirresistentes no esgoto confirma que este é um reservatório complexo e diverso que contribui para a disseminação da resistência. A ocorrência de isolados multirresistentes de importância clínica no ambiente representa um risco potencialmente grave para a saúde humana (BERENDONK et al., 2015). Sabe-se que uma infecção humana por isolados de *K. pneumoniae* com o perfil de resistência semelhante ao identificado em isolados neste estudo seria um desafio para o tratamento com os medicamentos disponíveis. Além do mais, é difícil dimensionar a extensão do uso da água pela população assim como os possíveis impactos. O lago Paranoá, por exemplo, está localizado na região central do Distrito Federal e ocupa uma área de 48 km². É um dos principais pontos turísticos de Brasília sendo utilizado em práticas recreativa, incluindo pesca, pela população. Mas não só o lago Paranoá, como outros corpos d'água de menor volume presentes no DF são ligados a estações de tratamento de esgoto e utilizados para recreação

Apenas poucos países preconizam o tratamento primário de esgoto hospitalar antes da sua descarga na rede principal de esgoto (HOCQUET; MULLER; BERTRAND, 2016). Atualmente nenhuma regulamentação nacional no Brasil estipula o tratamento do esgoto hospitalar e, isso pode estar contribuindo para a disseminação de isolados bacterianos multirresistentes de importância clínica. Além de bactérias multirresistentes os esgotos hospitalares contêm metais pesados, desinfetantes e antimicrobianos que favorecem a permanência de isolados resistentes e oferecem ambiente propício para transferência horizontal de genes de resistência (BERENDONK et al., 2015). É necessário o desenvolvimento de tecnologias e implementação de medidas em relação ao esgoto que reduzam a contaminação ambiental por bactérias multirresistentes de importância clínica assim como de contaminantes que exercem pressão seletiva.

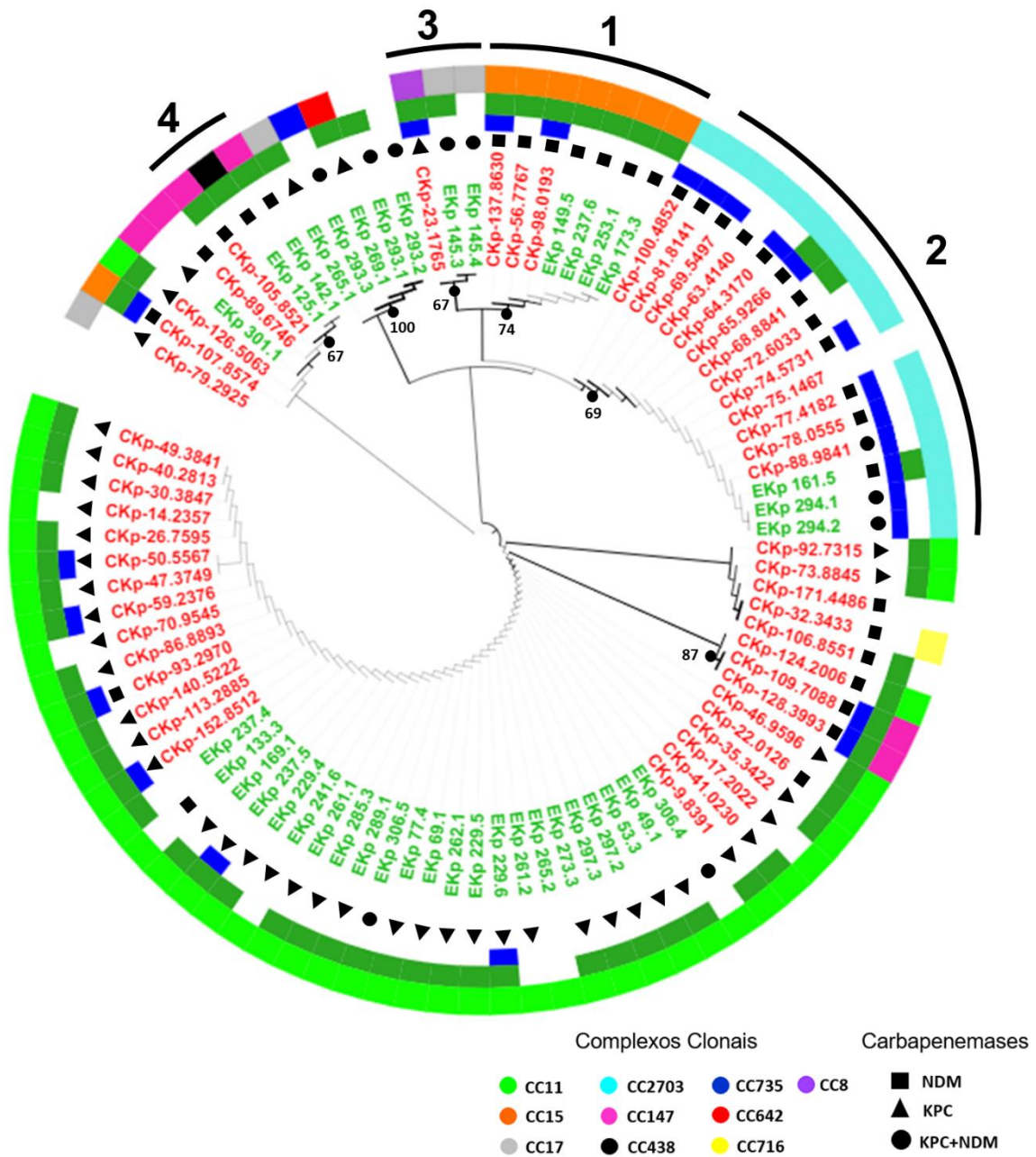


Figura 9. Dendrograma demonstrando a relação filogenética entre cepas ambientais e clínicas de *K. pneumoniae* carba-R. Legendas: “EKp” - cepas ambientais; “CKp” – cepas clínicas; linha interna azul indica resistência a aminoglicosídeos (amicacina e gentamicina); linha intermediária verde-escuro indica resistência a quinolonas (levofloxacina, ciprofloxacina e ácido nalidíxo); linha externa indica complexos clonais.

6. CONCLUSÃO

O estudo avaliou a ocorrência de *K. pneumoniae* resistente a carbapenem em matrizes ambientais (água e esgoto) associadas a estações de tratamento de esgoto localizadas no Distrito Federal. O esgoto é a principal fonte de isolamento de *K. pneumoniae* portando *bla*_{KPC} ou *bla*_{NDM} (*bla*_{KPC/NDM}). Corroborando este fato, *K. pneumoniae* portando *bla*_{KPC/NDM} não ocorre em matrizes ambientais não impactadas por esgoto. A ocorrência de *K. pneumoniae* portando *bla*_{KPC/NDM} no esgoto foi estatisticamente associada a demandas hospitalares (número de internações) e comunitárias (volume de tratamento de esgoto e número de residências atendidas pelo sistema de tratamento) atendidas pelas ETEs. Além disso, a disseminação de *K. pneumoniae* portando *bla*_{KPC/NDM} para corpos d'água ocorre em pelo menos 45% das estações de tratamento de esgoto analisadas. Cepas de *K. pneumoniae* de potencial epidêmico (complexos clonais 11, 15 e 147) conduzem predominantemente a disseminação ambiental de *bla*_{KPC/NDM}. A ocorrência de linhagens epidêmicas de *K. pneumoniae* portando *bla*_{KPC/NDM} em matrizes aquáticas demonstra o potencial de sobrevivência dessas cepas no ambiente.

7. PERSPECTIVAS

- Submeter para verificação do Instituto Pasteur, dados de sequenciamento abordando perfis alélicos identificados em isolados de *K. pneumoniae* e que não possuem registro no banco de dados de MLST;
- Ampliar o número de pontos testados nos corpos d'água aceptores de esgoto para avaliar a extensão da dispersão de *K. pneumoniae* carba-R provocada pelas ETEs;
- Ampliar o perfil de susceptibilidade testado em cepas ambientais de *K. pneumoniae* carba-R;
- Comparar complexos clonais em isolados ambientais e clínicos de *K. pneumoniae* suscetíveis e resistentes a carbapenem.

8.REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ABRAHAM, E.; CHAIN, E. An Enzyme from Bacteria able to Destroy Penicillin. **Nature**, v. 146, n. 837, dec. 1940.

ALBINGER, B. et al. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Europe: assessment by national experts from 38 countries, May 2015. **Eurosurveillance**, v. 20, n. 45, nov. 2015.

AMBLER, R. P. The Structure of β -Lactamases. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 289, n. 1036, p. 321-331, 1980.

AMELIA, A.; NUGROHO, A.; HARIJANTO, P. N. Diagnosis and Management of Infections Caused by *Enterobacteriaceae* Producing Extended-Spectrum β -Lactamase. Department of Internal Medicine, University of Sam Ratulangi, Indonesia, **Acta Med Indones**, 2016.

ANDRADE, L. N. et al. Dissemination of blaKPC-2 by the Spread of *Klebsiella pneumoniae* Clonal Complex 258 Clones (ST258, ST11, ST437) and Plasmids (IncFII, IncN, IncL/M) among Enterobacteriaceae Species in Brazil. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 55, n. 7, p.3579-3583, maio. 2011.

ANTOCHEVIS, L. C. et al. KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates from Brazilian hospitals: What (still) remains active?. **Journal Of Global Antimicrobial Resistance**, [s.l.], v. 15, p.173-177, dez. 2018.

ARZANLOU, M.; CHAI, W.; VENTER, H. Intrinsic, adaptive and acquired antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria. **Essays In Biochemistry**, v. 61, n. 1, p.49-59, 28 fev. 2017.

ASH, R. J.; MAUCK, B.; MORGAN, M. Antibiotic Resistance of Gram-Negative Bacteria in Rivers, United States. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 7, p.713-715, jul. 2002.

AUBRON, C. et al. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae, U.S. Rivers. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 2, p.260-264, fev. 2005.

BAGLEY, S. T. Habitat association of Klebsiella species. *Infection Control*, vol. 6, n. 2, p. 52-58, fev. 1985.

BAQUERO, F.; ALVAREZ-ORTEGA, C.; MARTINEZ, J. L. Ecology and evolution of antibiotic resistance. ***Environmental Microbiology Reports***, v. 1, n. 6, p.469-476, dez. 2009.

BARON, S. et al. Molecular mechanisms of polymyxin resistance: knowns and unknowns. ***International Journal Of Antimicrobial Agents***, v. 48, n. 6, p.583-591, dez. 2016.

BAUER, A. W. et al. Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method. ***American Journal of Clinical Pathology***, p493–496, 1966.

BENGTSSON-PALME, J.; KRISTIANSSON, E.; LARSSON, D. G. J. Environmental factors influencing the development and spread of antibiotic resistance. ***Fems Microbiology Reviews***, v. 42, n. 1, p.327-345, 24 out. 2017.

BENSON, D. A. et al. GenBank. ***Nucleic Acids Research***, v. 41, n. 1, p.36-42, 26 nov. 2012.

BITTERMAN, R. et al. Systematic review of antibiotic consumption in acute care hospitals. ***Clinical Microbiology And Infection***, v. 22, n. 6, p.7-19, jun. 2016.

BOWERS, J. R. et al. Genomic Analysis of the Emergence and Rapid Global Dissemination of the Clonal Group 258 Klebsiella pneumoniae Pandemic. ***Plos One***, v. 10, n. 7, p.327-345, jul. 2015.

BUSH, K.; BRADFORD, P. A. β -Lactams and β -Lactamase Inhibitors: An Overview. ***Cold Spring Harbor Perspectives In Medicine***, v. 6, n. 8, p.247-345, 21 jun. 2016.

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

BUSH, K. Past and Present Perspectives on β -Lactamases. ***Antimicrobial Agents And Chemotherapy***, v. 62, n. 10, p.327-345, 30 jul. 2018.

CAHILL, N. et al. Hospital effluent: A reservoir for carbapenemase-producing Enterobacterales? ***Science Of The Total Environment***, v. 672, p.618-624, jul. 2019.

CAMPANA, E. H. et al. NDM-producing *Klebsiella pneumoniae* ST11 goes to the beach. **International Journal Of Antimicrobial Agents**, v. 49, n. 1, p.119-121, jan. 2017.

CARVALHO-ASSEF, A. P. D. et al. Isolation of NDM-producing *Providencia rettgeri* in Brazil. **Journal Of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 12, p.2956-2957, 18 jul. 2013.

CAUMO, K. et. al. Resistência bacteriana no meio ambiente e implicações na clínica hospitalar, v. 6, n. 1, 2017.

CERCEO, E. et al. Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacterial Infections in the Hospital Setting: Overview, Implications for Clinical Practice, and Emerging Treatment Options. **Microbial Drug Resistance**, v. 22, n. 5, p.412-431, jul. 2016.

CERDEIRA, L. et al. Draft genome sequence of an environmental multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* ST340/CC258 harbouring blaCTX-M-15 and blaKPC-2 genes. **Journal Of Global Antimicrobial Resistance**, v. 8, p.108-109, mar. 2017.

CHAGAS, T. P. G. et al. Occurrence of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in hospital wastewater. **Journal Of Hospital Infection**, v. 77, n. 3, p.281-305, mar. 2011.

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

CITRI, N. 2 Penicillinase and Other β -Lactamases. **Hydrolysis**, p.23-46, 1971.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 29 ed. CLSI document M100-S29. Clinical and La, Wayne, PA, USA, 2019.

CUZON, G. et al. Plasmid-Mediated Carbapenem-Hydrolyzing β -Lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* Isolate from Greece. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 52, n. 2, p.796-797, 3 dez. 2007.

CUZON, G. et al. Worldwide Diversity of *Klebsiella pneumoniae* That Produce β -Lactamase blaKPC-2 Gene1. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 9, p.1349-1356, set. 2010.

D'COSTA, V. M. et al. Antibiotic resistance is ancient. **Nature**, v. 477, n. 7365, p.457-461, 31 ago. 2011.

DIANCOURT, L. et al. Multilocus Sequence Typing of *Klebsiella pneumoniae* Nosocomial Isolates. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 8, p.4178-4182, 1 ago. 2005.

DORTET, L.; CUZON, G.; NORDMANN, P. Dissemination of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in France, 2012. **Journal Of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, n. 3, p.623-627, 24 nov. 2013.

ESSACK, S. Y. The development of beta-lactam antibiotics in response to the evolution of beta-lactamases. **Pharmaceutical research**, v. 18, n. 10, p. 1391–9, 2001.

FALAGAS, M. E.; KASIAKOU, S. K.; SARAVOLATZ, L. D. Colistin: The Revival of Polymyxins for the Management of Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacterial Infections. **Clinical Infectious Diseases**, v. 40, n. 9, p.1333-1341, 1 maio 2005.

FARIA, J. C. NDM-Producing Enterobacteriaceae Strains among Hospitals in Brasília, Brazil. **Journal Of Microbiology & Experimentation**, v. 3, n. 2, 29 jan. 2016.

FRITZENWANKER, M. et al. Treatment options for carbapenem. **Deutsches Aerzteblatt Online**, p.327-345, 21 maio 2018.

GALLER, H. et al. KPC-2 and OXA-48 carbapenemase-harboring Enterobacteriaceae detected in an Austrian wastewater treatment plant. **Clinical Microbiology And Infection**, v. 20, n. 2, p.132-134, fev. 2014.

GHAFOURIAN, S. et al. Extended Spectrum Beta-lactamases: Definition, Classification and Epidemiology. **Current Issues In Molecular Biology**, p.11-21, 2015.

GISKE, C. G. et al. Diverse Sequence Types of *Klebsiella pneumoniae* Contribute to the Dissemination of bla_{NDM-1} in India, Sweden, and the United Kingdom. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 56, n. 5, p.2735-2738, 21 fev. 2012.

GOVIL, D. et al. Colistin and polymyxin B: A re-emergence. **Indian Journal Of Critical Care Medicine**, v. 13, n. 2, p.49-53, 2009.

GULLBERG, E. et al. Selection of Resistant Bacteria at Very Low Antibiotic Concentrations. **Plos Pathogens**, v. 7, n. 7, p.21-58, 21 jul. 2011.

HALLER, L. et al. Occurrence and characteristics of extended-spectrum β -lactamase- and carbapenemase-producing bacteria from hospital effluents in Singapore. **Science Of The Total Environment**, v. 615, p.1119-1125, fev. 2018.

HOELLE, J. et al. Survey of US wastewater for carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. **Journal Of Water And Health**, v. 17, n. 2, p.219-226, 22 jan. 2019.

HOSSAIN, A. et al. Plasmid-Mediated Carbapenem-Hydrolyzing Enzyme KPC-2 in an *Enterobacter* sp. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 48, n. 11, p.4438-4440, 25 out. 2004.

IACONIS, J. P.; SANDERS, C. C. Purification and characterization of inducible beta-lactamases in *Aeromonas* spp. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 34, n. 1, p.44-51, 1 jan. 1990.

ISOZUMI, R. et al. bla_{NDM-1}-positive *Klebsiella pneumoniae* from Environment, Vietnam. **Emerging Infectious Diseases**, v. 18, n. 8, ago. 2012.

JACOBY, A. G.; A MEDEIROS, A. More extended-spectrum beta-lactamases. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 35, n. 9, p.1697-1704, 1 set. 1991.

JEAN, S. et al. Carbapenemase-producing Gram-negative bacteria: current epidemics, antimicrobial susceptibility and treatment options. **Future Microbiology**, v. 10, n. 3, p.407-425, mar. 2015.

- KAHAN, F. M. et al. Thienamycin: development of imipenem-cilastatin. **Journal Of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 12, n., p.1-35, 1 jan. 1983.
- KAZMIERCZAK, K. et al. Multiyear, Multinational Survey of the Incidence and Global Distribution of Metallo- β -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 60, n. 2, p.1067-1078, 7 dez. 2015.
- KIEBOOM, J.; BONT, J. A. Identification and molecular characterization of an efflux system involved in *Pseudomonas putida* S12 multidrug resistance. **Microbiology**, v. 147, n. 1, p.43-51, 1 jan. 2001.
- KITTINGER, C. et al. Antibiotic Resistance Patterns of *Pseudomonas* spp. Isolated from the River Danube. **Frontiers In Microbiology**, v. 7, p.327-345, 3 maio 2016.
- KOLÁR, M.; URBÁNEK, K.; LÁTAL, T. Antibiotic selective pressure and development of bacterial resistance. **International Journal Of Antimicrobial Agents**, v. 17, n. 5, p.357-363, maio 2001.
- KONEMAN, E. W. Diagnóstico Microbiológico: Texto e Atlas Colorido. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.
- KUMARASAMY, K. K. et al. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 10, n. 9, p.597-602, set. 2010.
- LEPUSCHITZ, S. et al. Whole genome sequencing reveals resemblance between ESBL-producing and carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates from Austrian rivers and clinical isolates from hospitals. **Science Of The Total Environment**, v. 662, p.227-235, abr. 2019.
- LETUNIC, I.; BORK, P. Interactive Tree Of Life (iTOL) v4: recent updates and new developments. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. 1, p.256-259, 1 abr. 2019.
- LI, X. et al. Rapid emergence of high-level tigecycline resistance in *Escherichia coli* strains harbouring bla_{NDM-5} in vivo. **International Journal Of Antimicrobial Agents**, v. 47, n. 4, p.324-327, abr. 2016.

LIU, Y. et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 2, p.161-168, fev. 2016.

LUDDEN, C. et al. Sharing of carbapenemase-encoding plasmids between Enterobacteriaceae in UK sewage uncovered by MinION sequencing. **Microbial Genomics**, v. 3, n. 7, 9 jul. 2017.

MAGIORAKOS, A. et al. 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.

MAHON, B. M et al. Indistinguishable NDM-producing Escherichia coli isolated from recreational waters, sewage, and a clinical specimen in Ireland, 2016 to 2017. **Eurosurveillance**, v. 22, n. 15, p.327-345, 13 abr. 2017.

MANAIA, C. M. et al. Antibiotic resistance in wastewater treatment plants: Tackling the black box. **Environment International**, v. 115, p.312-324, jun. 2018.

MARKOVSKA, R. et al. Clonal dissemination of multilocus sequence type ST15 KPC-2-producing Klebsiella pneumoniae in Bulgaria. **Apmis**, v. 123, n. 10, p.887-894, 25 ago. 2015.

MARTÍNEZ, J. L.; COQUE, T. M.; BAQUERO, F. What is a resistance gene? Ranking risk in resistomes. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 2, p.116-123, 15 dez. 2014.

MARTIN, R. M.; BACHMAN, M. A. Colonization, Infection, and the Accessory Genome of Klebsiella pneumoniae. **Frontiers In Cellular And Infection Microbiology**, v. 8, 22 jan. 2018.

MARTINS, V. V. et al. Aquatic environments polluted with antibiotics and heavy metals: a human health hazard. **Environmental Science And Pollution Research**, v. 21, n. 9, p.5873-5878, 22 jan. 2014.

MATHERS, A. J.; PEIRANO, G.; PITOUT, J. D. D. The Role of Epidemic Resistance Plasmids and International High-Risk Clones in the Spread of Multidrug-Resistant

Enterobacteriaceae. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, n. 3, p.565-591, 29 abr. 2015.

MATSEN J. M.; SPINDLER J. A.; BLOSSER R. O. Characterization of *Klebsiella* isolates from natural receiving waters and comparison with human isolates. **Appl. Microbiol.** v 28, p.672–678, 1974.

MEIRELES, C. et al. *Pseudomonas putida* are environmental reservoirs of antimicrobial resistance to β -lactamic antibiotics. **World Journal Of Microbiology And Biotechnology**, v. 29, n. 7, p.1317-1325, 19 fev. 2013.

MIRIAGOU, V. et al. Imipenem Resistance in a *Salmonella* Clinical Strain Due to Plasmid-Mediated Class A Carbapenemase KPC-2. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 47, n. 4, p.1297-1300, 1 abr. 2003.

MOHR, K. I. History of Antibiotics Research. **Current Topics In Microbiology And Immunology**, p.237-272, 2016.

MOLINA, L. et al. Antibiotic Resistance Determinants in a *Pseudomonas putida* Strain Isolated from a Hospital. **Plos One**, v. 9, n. 1, p.1-9, 17 jan. 2014.

MONTEIRO, J. et al. First Report of KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae* Strains in Brazil. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 53, n. 1, p.333-334, 17 nov. 2008.

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

MORADIGARAVAND, D. et al. Evolution and Epidemiology of Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* in the United Kingdom and Ireland. **Mbio**, v. 8, n. 1, 21 fev. 2017.

MUNITA, J. M.; ARIAS, C. A. Mechanisms of Antibiotic Resistance. **Virulence Mechanisms Of Bacterial Pathogens**, Fifth Edition, p.481-511, 2016.

MUNOZ-PRICE, L. S. et al. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 13, n. 9, p.785-796, set. 2013.

NAAS, T. et al. Genetic Structures at the Origin of Acquisition of the β -Lactamase blaKPC Gene. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 52, n. 4, p.1257-1263, 28 jan. 2008.

NAAS, T. et al. Plasmid-Mediated Carbapenem-Hydrolyzing β -Lactamase KPC in a Klebsiella pneumoniae Isolate from France. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 49, n. 10, p.4423-4424, 27 set. 2005.

NAAS, T. et al. Role of ISKpn7 and Deletions in blaKPC Gene Expression. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 56, n. 9, p.4753-4759, 25 jun. 2012.

NASCIMENTO, T. International high-risk clones of Klebsiella pneumoniae KPC-2/CC258 and Escherichia coli CTX-M-15/CC10 in urban lake waters. **Science Of The Total Environment**, v. 598, p.910-915, nov. 2017.

NAVON-VENEZIA, S.; KONDRATYEVA, K.; CARATTOLI, A. Klebsiella pneumoniae: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. **Fems Microbiology Reviews**, v. 41, n. 3, p.252-275, 1 maio 2017.

NICOLAU, D. P. Carbapenems: a potent class of antibiotics. **Expert Opinion On Pharmacotherapy**, v. 9, n. 1, p.23-37, 13 dez. 2007.

NICOLETTI, A. G. et al. Clonal Complex 258, the Most Frequently Found Multilocus Sequence Type Complex in KPC-2-Producing Klebsiella pneumoniae Isolated in Brazilian Hospitals. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 56, n. 8, p.4563-4564, 23 jul. 2012.

NICOLETTI, G.; RUSSO, G.; BONFIGLIO, G. Recent developments in carbapenems. **Expert Opinion On Investigational Drugs**, v. 11, n. 4, p.529-544, abr. 2002.

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

OBERLÉ, K. et al. Evidence for a Complex Relationship between Antibiotics and Antibiotic-Resistant Escherichia Coli: From Medical Center Patients to a Receiving

Environment. **Environmental Science & Technology**, v. 46, n. 3, p.1859-1868, 27 jan. 2012.

OLIVEIRA, S. et al. 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.849-852, 24 out. 2013.

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

PEREIRA, P. S. et al. Update of the molecular epidemiology of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil: spread of clonal complex 11 (ST11, ST437 and ST340). **Journal Of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 2, p.312-316, 15 out. 2012.

PERILLI, M. et al. 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**, [s.l.], v. 1, n. 4, p.217-220, dez. 2013.

PERRY, J.; WAGLECHNER, N.; WRIGHT, G. The Prehistory of Antibiotic Resistance. **Cold Spring Harbor Perspectives In Medicine**, v. 6, n. 6, jun. 2016.

PESQUISA DISTRITAL POR AMOSTRA DE DOMICÍLIOS – PDAD 2018. Disponível em: < <http://www.codeplan.df.gov.br/pdad-2018/>>. Acesso em 10 de nov. de 2019.

PICÃO, R. C. et al. The route of antimicrobial resistance from the hospital effluent to the environment: focus on the occurrence of KPC-producing *Aeromonas* spp. and Enterobacteriaceae in sewage. **Diagnostic Microbiology And Infectious Disease**, v. 76, n. 1, p.80-85, maio 2013.

PITOUT, J. D. D.; NORDMANN, P.; POIREL, L. Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*, a Key Pathogen Set for Global Nosocomial Dominance. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 59, n. 10, p.5873-5884, 13 jul. 2015.

POIREL, L. et al. Detection of NDM-1-Producing *Klebsiella pneumoniae* in Kenya. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 55, n. 2, p.934-936, 29 nov. 2010.

POIREL, L. et al. Environmental KPC-Producing *Escherichia coli* Isolates in Portugal. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 56, n. 3, p.1662-1663, 27 dez. 2011.

POIREL, L. et al. Emergence of Oxacillinase-Mediated Resistance to Imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 48, n. 1, p.15-22, 23 dez. 2003.

PROTONOTARIOU, E. et al. Hospital outbreak due to a *Klebsiella pneumoniae* ST147 clonal strain co-producing KPC-2 and VIM-1 carbapenemases in a tertiary teaching hospital in Northern Greece. **International Journal Of Antimicrobial Agents**, v. 52, n. 3, p.331-337, set. 2018.

QUEENAN, A. M.; BUSH, K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. **Clinical microbiology reviews**, v. 20, n. 3, p. 440–58, 2007.

RODRÍGUEZ-BAÑO, J.; PASCUAL, A. Clinical significance of extended-spectrum β -lactamases. **Expert Review Of Anti-infective Therapy**, v. 6, n. 5, p.671-683, out. 2008.

RODRÍGUEZ-BAÑO, J. et al. Treatment of Infections Caused by Extended-Spectrum-Beta-Lactamase, AmpC, and Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 31, n. 2, p.327-345, 14 fev. 2018.

RODRIGUES, C. et al. Expansion of ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* in hospitalized patients: A successful story of international clones (ST15, ST147, ST336) and epidemic plasmids (IncR, IncFIK). **International Journal Of Medical Microbiology**, v. 304, n. 8, p.1100-1108, nov. 2014.

RUNCHAROEN, C. et al. Whole genome sequencing reveals high-resolution epidemiological links between clinical and environmental *Klebsiella pneumoniae*. **Genome Medicine**, v. 9, n. 1, p.327-345, 24 jan. 2017.

SADER, H. S; BIEDENBACH, D. J; JONES, R. N. Global patterns of susceptibility for 21 commonly utilized antimicrobial agents tested against 48,440 Enterobacteriaceae in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2001). **Diagnostic Microbiology And Infectious Disease**, v. 47, n. 1, p.361-364, set. 2003.

SAMRA, Z. *et al.* Outbreak of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* producing KPC-3 in a tertiary medical centre in Israel. **International Journal Of Antimicrobial Agents**, v. 30, n. 6, p.525-529, dez. 2007.

SANCHEZ, M. B.; HERNANDEZ, A.; MARTINEZ, J. L. Stenotrophomonas maltophilia drug resistance. **Future Microbiology**, v. 4, n. 6, p.655-660, ago. 2009.

SANDERSON, C. E. *et al.* The Changing Face of Water: A Dynamic Reflection of Antibiotic Resistance Across Landscapes. **Frontiers In Microbiology**, v. 9, 6 set. 2018.

SACHA, P. *et al.* Metallo-beta-lactamases of *Pseudomonas aeruginosa* -a novel mechanism resistance to beta-lactam antibiotics. **Folia Histochemica Et Cytobiologica**, v. 46, n. 2, 4 jun. 2008.

SAIKIA, K. *et al.* New Delhi metallo- β -lactamase and extended spectrum β -lactamases co-producing isolates are high in community-acquired urinary infections in Assam as detected by a novel multiplex polymerase chain reaction assay. **Indian Journal Of Medical Microbiology**, v. 34, n. 2, p.173-179, 2016.

SEKI, L. M. *et al.* Molecular epidemiology of KPC-2- producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Brazil: the predominance of sequence type 437. **Diagnostic Microbiology And Infectious Disease**, v. 70, n. 2, p.274-277, jun. 2011.

SHAKIL, S.; AKRAM, M.; KHAN, A. Tigecycline: A Critical Update. **Journal Of Chemotherapy**, v. 20, n. 4, p.411-419, ago. 2008.

SINGH, T.; TSERING, D.; POONIA, S. Antibiotic susceptibility profile of bacteria isolated from natural sources of water from rural areas of East Sikkim. **Indian Journal Of Community Medicine**, v. 39, n. 3, p.156-172, 2014.

SILVA, D. M. Determinantes moleculares da resistência à polimixina em cepas de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de carbapenemases isoladas no Distrito Federal, Brasil. 2019. Dissertação (Mestrado em Biologia Microbiana) – Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, Distrito Federal. 2019.

SHIELDS, R. K. *et al.* Emergence of Ceftazidime-Avibactam Resistance Due to Plasmid-Borne blaKPC-3 Mutations during Treatment of Carbapenem-Resistant

Klebsiella pneumoniae Infections. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 61, n. 3, p.327-345, 28 dez. 2016.

SOULI, M. et al. In Vitro Activity of Tigecycline against Multiple-Drug-Resistant, Including Pan-Resistant, Gram-Negative and Gram-Positive Clinical Isolates from Greek Hospitals. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 50, n. 9, p.3166-3169, 28 ago. 2006.

SUN, J. et al. Plasmid-encoded tet(X) genes that confer high-level tigecycline resistance in Escherichia coli. **Nature Microbiology**, v. 4, n. 9, p.1457-1464, 24 jun. 2019.

SUN, J. et al. Towards Understanding MCR-like Colistin Resistance. **Trends In Microbiology**, v. 26, n. 9, p.794-808, set. 2018.

SZCZEPANOWSKI, R. et al. Detection of 140 clinically relevant antibiotic-resistance genes in the plasmid metagenome of wastewater treatment plant bacteria showing reduced susceptibility to selected antibiotics. **Microbiology**, v. 155, n. 7, p.2306-2319, 23 abr. 2009.

TACÃO, M. et al. Shewanella species as the origin of blaOXA-48 genes: insights into gene diversity, associated phenotypes and possible transfer mechanisms. **International Journal Of Antimicrobial Agents**, v. 51, n. 3, p.340-348, mar. 2018.

TEIXEIRA, P. et al. Occurrence of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in a Portuguese river: blaNDM, blaKPC and blaGES among the detected genes. **Environmental Pollution**, v. 260, p.113-117, maio 2020.

TEKELI, A. et al. Characterization of Klebsiella pneumoniae Coproducing KPC and NDM-1 Carbapenemases from Turkey. **Microbial Drug Resistance**, v. 26, n. 2, p.118-125, 1 fev. 2020.

TOLENTINO, F. M. et al. Endemicity of the High-Risk Clone Klebsiella pneumoniae ST340 Coproducing QnrB, CTX-M-15, and KPC-2 in a Brazilian Hospital. **Microbial Drug Resistance**, v. 25, n. 4, p.528-537, maio 2019.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L.; Microbiologia. 10ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

TZOUVELEKIS, L. S. et al. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and Other Enterobacteriaceae: an Evolving Crisis of Global Dimensions. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, n. 4, p.682-707, 1 out. 2012.

VAN DUIN, D.; PATERSON, D. L. Multidrug-Resistant Bacteria in the Community. **Infectious Disease Clinics Of North America**, v. 30, n. 2, p.377-390, jun. 2016.

VILLEGAS, M. V. et al. First Detection of the Plasmid-Mediated Class A Carbapenemase KPC-2 in Clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae* from South America. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 50, n. 8, p.2880-2882, 26 jul. 2006.

VOLKERS, G. et al. Structural basis for a new tetracycline resistance mechanism relying on the TetX monooxygenase. **Febs Letters**, v. 585, n. 7, p.1061-1066, 12 mar. 2011.

WALSH, T. R et al. Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: an environmental point prevalence study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 11, n. 5, p.355-362, maio 2011.

WALTHER-RASMUSSEN, J.; HOIBY, N. Class A carbapenemases. **Journal Of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 60, n. 3, p.470-482, 26 jun. 2007.

WASEEM, H. et al. Antimicrobial Resistance in the Environment. **Water Environment Research**, v. 90, n. 10, p.865-884, 1 out. 2018.

WEI, Z.-q. et al. Plasmid-Mediated KPC-2 in a *Klebsiella pneumoniae* Isolate from China. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 51, n. 2, p.763-765, 4 dez. 2006.

WOODFORD, N. et al. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae and non-Enterobacteriaceae from animals and the environment: an emerging public health risk of our own making? **Journal Of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, n. 2, p.287-291, 3 out. 2013.

WOODFORD, N.; TURTON, J. F.; LIVERMORE, D. M. Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. **Fems Microbiology Reviews**, v. 35, n. 5, p.736-755, set. 2011.

- WU, W. et al. NDM Metallo- β -Lactamases and Their Bacterial Producers in Health Care Settings. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 32, n. 2, p.327-345, 30 jan. 2019.
- WOODFORD, N. et al. Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* Producing a New Carbapenem- Hydrolyzing Class A -Lactamase, KPC-3, in a New York Medical Center. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 48, n. 12, p.4793-4799, 23 nov. 2004.
- WYRES, K. L.; HOLT, K. *Klebsiella pneumoniae* as a key trafficker of drug resistance genes from environmental to clinically important bacteria. **Current Opinion In Microbiology**, v. 45, p.131-139, out. 2018.
- XU, J. et al. Unravelling the genome sequence of NDM-1 and KPC-2 co-producing *Klebsiella pneumoniae* ST11 isolated from a bloodstream infection. **Journal Of Global Antimicrobial Resistance**, v. 20, p.339-341, mar. 2020.
- YANG, F. et al. Discharge of KPC-2 genes from the WWTPs contributed to their enriched abundance in the receiving river. **Science Of The Total Environment**, v. 581-582, p.136-143, mar. 2017.
- YANG, F. et al. Prevalence and Fate of Carbapenemase Genes in a Wastewater Treatment Plant in Northern China. **Plos One**, v. 11, n. 5, p.156-345, 26 maio 2016.
- YIGIT, H. et al. Carbapenem-Resistant Strain of *Klebsiella oxytoca* Harboring Carbapenem-Hydrolyzing -Lactamase KPC-2. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 47, n. 12, p.3881-3889, 24 nov. 2003.
- YIGIT, H. et al. Novel Carbapenem-Hydrolyzing-Lactamase, KPC-1, from a Carbapenem-Resistant Strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 45, n. 4, p.1151-1161, 1 abr. 2001.
- YONG, D. et al. Characterization of a New Metallo-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, 21 set. 2009.
- ZHANG, X. et al. An Uncommon ST1224 NDM-1-Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolated from the Bloodstream of a Leukemia Patient in China. **Chemotherapy**, v. 62, n. 4, p.262-268, 2017.

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

ZHANG, R. et al. Evolution of tigecycline- and colistin-resistant CRKP (carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*) in vivo and its persistence in the GI tract. **Emerging Microbes & Infections**, v. 7, n. 1, p.1-11, dez. 2018.

ZHANG, L.; LI, X.; POOLE, K. Multiple Antibiotic Resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*: Involvement of a Multidrug Efflux System. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 44, n. 2, p.287-293, 1 fev. 2000.

ZURFLUH, K. et al. Characteristics of Extended-Spectrum β -Lactamase- and Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae Isolates from Rivers and Lakes in Switzerland. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 79, n. 9, p.3021-3026, 1 mar. 2013.

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