

## **Avaliação de transferência de marcadores de resistência por conjugação em enterobactérias resistentes aos antimicrobianos e telurito de potássio no ambiente hospitalar**

Juliana Graça dos Santos<sup>1\*</sup>  
Bianca Oliveira de Fonseca<sup>2</sup>  
Alexandre Ribeiro Bello<sup>2</sup>  
José Augusto Adler Pereira<sup>2</sup>

<sup>2</sup>Laboratório de Bacteriologia (HUPE-UERJ)/Departamento de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Ciências Médicas da UERJ . Universidade do Estado do Rio de Janeiro Av. Boulevard, 28 de Setembro, 87, Vila Isabel, Rio de Janeiro, RJ, CEP: 20551-030

\*E-mail: juliana.riverah@gmail.com

### **RESUMO**

A família *Enterobacteriaceae* constitui um dos principais grupos de agentes infecciosos oportunistas, apresentando mecanismos de resistência aos antimicrobianos que podem ser disseminados através de plasmídios. Investigamos a presença de cepas de enterobactérias isoladas no ambiente hospitalar (a partir de amostras provenientes de alimento, fezes, urina, mãos de profissionais de saúde, manipuladores de alimentos e de diversos materiais clínicos) e a possível transferência de resistência a antimicrobianos e ao telurito de potássio através de conjugação bacteriana. Vinte e sete cepas de enterobactérias foram identificadas por testes bioquímicos, a sensibilidade a antimicrobianos e a produção de ESBLs foram avaliadas através de difusão em ágar, a partir de discos contendo antimicrobianos e foram realizados ensaios de conjugação bacteriana. Neste trabalho, observamos que 88,3 (88,3%) das cepas estudadas apresentaram perfis de multirresistência a antimicrobianos (MDR). Constatamos a transferência de marcadores de resistência por conjugação bacteriana para a cepa de *E. coli* K12 R23, a partir de seis cepas doadoras. O isolamento e cuidados especiais no contato com pacientes infectados/colonizados por bactérias MDR e, em particular, produtoras de beta-lactamases (ESBLs), são questões determinantes no controle da disseminação de tais microrganismos no ambiente hospitalar.

**Palavras-chaves:** infecção nosocomial, plasmídios, resistência bacteriana, multirresistência, mecanismo de resistência, marcadores de resistência

### **ABSTRACT**

The *Enterobacteriaceae* family is one of the main groups of opportunistic infectious agents, that have antimicrobial resistance mechanisms that can be disseminated through plasmids. We investigated the presence of strains of *Enterobacteriaceae* isolated from the hospital environment (from samples from food, feces, urine, hands of health professionals, food handlers and from various clinical materials) and the possible transfer of antimicrobial resistance and to potassium tellurite by bacterial conjugation. Twenty-seven strains of enterobacteria were identified by biochemical tests, sensitivity to antimicrobials and ESBLs production were performed by agar diffusion test, from antimicrobial-containing discs and bacterial conjugation assays were performed. In this work, we observed that 88,3 (88,3%) of the strains studied had antimicrobial multiresistance profiles (MDR). We investigated the transfer of resistance markers by bacterial conjugation to *E. coli* strain K12 R23 from six donor strains. The Isolation and special care in contact with patients infected/colonized by MDR bacteria, in particular, beta-lactamase producers (ESBLs), are determinant factors in the control of the dissemination of such microorganisms in the hospital environment.

**Keywords:** nosocomial infection, plasmids, bacterial resistance, multiresistance, resistance mechanism and resistance markers

## INTRODUÇÃO

A resistência bacteriana é um crescente e preocupante problema mundial de Saúde Pública, particularmente no ambiente hospitalar e, sobretudo, entre pacientes com fatores de risco para infecção ou colonização por cepas multirresistentes (Loureiro, 2016).

De acordo com Jensen et al. (2012), o termo bactéria multirresistente (MDR) é usado para determinar os organismos resistentes a três ou mais diferentes classes de antimicrobianos. De acordo com a Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2017) a resistência aos antimicrobianos é um fenômeno relacionado à formação de cepas de microrganismos que são capazes de se multiplicar na presença de elevada concentração antimicrobiana.

A família *Enterobacteriaceae* é um importante grupo bacteriano e um dos grupos de bactérias mais importantes em infecções humanas (e em outros animais) relacionadas à disseminação de genes de resistência a antimicrobianos (Scarpate, 2009). Os constituintes desta família de enterobactérias possuem importantes mecanismos de resistência aos antimicrobianos como aqueles codificados por genes transferidos em eventos por conjugação bacteriana. Este processo é reconhecidamente de grande importância na transferência de elementos genéticos como plasmídios, cassetes de genes e transpósons, através dos quais as bactérias podem se tornar resistentes a um ou a vários agentes antimicrobianos, eventualmente contendo genes codificadores de resistência a múltiplos agentes antimicrobianos, ocorrendo entre diferentes gêneros de enterobactérias (Carattoli, 2009).

De acordo Harbottle et al. (2006), a resistência bacteriana adquirida, ocorre quando uma bactéria sensível a um determinado antimicrobiano se torna resistente ao mesmo quando adquire genes de resistência. Estes genes codificam enzimas que inativam a ação da droga e impedem a ligação do antimicrobiano no sítio alvo (Ferreira e Lala, 2010). A ação das beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs) tem sido o principal e importante mecanismo de resistência das enterobactérias (Grupta, 2007). Segundo Jeon et al. (2015), estas enzimas atuam hidrolizando o anel central dos antibióticos beta-lactâmicos, inativando irreversivelmente estes compostos e compondo um cenário preocupante que nas últimas décadas inclui a resistência crescente aos carbapenêmicos. Hong et al. (2015) ressaltam que o uso intensivo de antimicrobianos carbapenêmicos tem aumentado a quantidade de cepas resistentes a esse agente, pois favorecem a pressão seletiva, o que conseqüentemente viabiliza a persistência das bactérias mais resistentes. As enzimas beta-lactamases, podem ser expressas a partir de genes encontrados em elementos móveis como plasmídios, que podem ser transferidos para outros microrganismos (Rodríguez-Baño e Navarro, 2008).

A resistência bacteriana ao telurito de potássio pode ser utilizada como um indicador da multirresistência bacteriana a antimicrobianos (Valková, 2007). Segundo Fang et al. (2016), estudos já relataram que o uso de telurito de potássio foi utilizado clinicamente em humanos como agente antimicrobiano e, como consequência, muitos microrganismos Gram-positivos e negativos desenvolveram resistência ao telurito.

Maniati et al. (2007) ressaltaram que um enorme complicador se refere ao fato de ocorrerem associações desses vários genes muitas vezes em elementos genéticos transferíveis, promovidas por mecanismos especializados de rearranjos e recombinações genéticas. As muito intensas pressões seletivas favorecem a persistência de bactérias multirresistentes que emergem favorecidas por esses processos. De acordo com Murray et al. (2009) um desses mecanismos chamado de conjugação bacteriana consiste na transferência do material genético entre as bactérias.

O presente estudo tem como objetivo investigar em cepas multirresistentes de enterobactérias isoladas no ambiente hospitalar, a partir de diferentes origens de cepas bacterianas como de colonização e material clínico, eventual transferência marcadores

de resistência a antimicrobianos através de ensaios de conjugação bacteriana. A necessidade de medidas de prevenção e controle diante desses riscos associados de cepas multirresistentes e de disseminação plasmidial de multiresistência que tem se propagado de maneira elevada no âmbito hospitalar deve ser a principal prioridade para o controle da disseminação de multiresistência, incluindo algumas estratégias e programas voltados para os profissionais de saúde.

## MATERIAL E MÉTODOS

As amostras foram obtidas a partir de coletas microbiológicas realizadas no Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE) nas unidades de Clínica Médica e cirúrgica, no Centro de Tratamento Intensivo e na Cozinha do HUPE-UERJ. Foram analisadas 27 cepas: 14 cepas *K. pneumoniae* e 13 cepas de *E. coli*, sendo assim obtivemos 3 amostras procedentes de alimento, 4 amostra provenientes de fezes, 2 de mãos de profissionais de saúde, 1 de manipulador de alimentos e 17 amostras provenientes de diversos materiais clínicos (secreções traqueais, fragmento de esterno e lavado bronco alveolar), a partir de amostras do setor de Cepas do Laboratório de Bacteriologia (HUPE-UERJ). Para o isolamento das cepas foi utilizado meio seletivo *Cystine Lactose Electrolyte Deficient Agar* – CLED (Oxoid, Hampshire, GBR). As cepas foram identificadas, morfológicamente pela coloração de Gram e bioquimicamente segundo Winn et al. (2006).

O teste de suscetibilidade aos agentes antimicrobianos (TSA) foi realizado segundo normas do *Clinical Laboratories Standards Institute - CLSI* (2017). Foram utilizados os seguintes agentes antimicrobianos (Cefar, Jardim Anhanguera – São Paulo, Brasil) com suas respectivas concentrações: Cefotaxima (Ctx-30µg), Ceftazidima (Caz-30µg), Ceftriaxone (Cro-30µg), Cefepima (Cpm-30µg), Cefalotina (Cfl-30µg), Imipenem (Ipm-10µg), Ertapenem (Etp-10µg), Meropenem (Mep-10µg), Ampicilina (Amp-10µg), Ciprofloxacina (Cip-5µg), Norfloxacina (Nor-10µg), Tetraciclina (Tet-30µg), Cloranfenicol (Clo-30µg), Gentamicina (Gen-10µg), Amicacina (Ami-30µg), Amoxicilina (Ami-20µg), Rifampicina (Rif-10µg), Ácido nalídixico (Na-10µg), Polimixina B (Pol-10µg), Sulfametoxazol-trimetoprin (23,74-1,25µg), Telurito de potássio (Lin- 40 µg). Com relação o teste fenotípico para detecção de cepas produtoras de ESBL, após o teste de suscetibilidade aos antimicrobianos as cepas que apresentaram resistência a cefalosporinas de terceira geração, foram submetidas a testes confirmatórios para presença de ESBL.

A partir do crescimento em ágar, foram preparadas suspensões em tubos contendo solução salina (0,85%) até obtenção de turvação correspondente a 0,5 da escala de McFarland. Sobre a superfície inoculada em ágar MH (Merck) foram depositados os discos contendo os agentes antimicrobianos (ceftazidima (30µg) + cefotaxima (30 µg) com e sem o inibidor de beta-lactamase). As placas foram incubadas por 18h, em estufa a 37 °C e os resultados foram analisados a partir da leitura da mensuração dos halos. Diferenças entre diâmetros de halos maiores ou igual a 5mm, indicaram a produção de beta-lactamase,

## RESULTADOS

Foram estudadas 27 cepas isoladas de diversos materiais no HUPE-UERJ. Foram realizados os testes bioquímicos que identificaram as cepas de enterobactérias e a determinação do perfil de suscetibilidade aos agentes antimicrobianos. Pôde-se observar que 88,3 (88,3%) das cepas apresentaram perfil de multirresistência (Tabela 1).

Tabela 1: Cepas de enterobactérias isoladas, com suas respectivas origens, espécies e resistência antimicrobiana-HUPE-UERJ. (2001).

Amostras isoladas	Origem/ material clínico	Espécies isoladas	Resistência antimicrobiana
002 PRBB	Fezes	<i>K. pneumoniae</i>	Amp Amo Ami Clo, Rif Na Gen
042 PRAB	Fezes	<i>K. pneumoniae</i>	Clo Rif Ctx
E15L8BB	Alimento	<i>K. pneumoniae</i>	Amp Ami Rif
E1L1AB	Alimento	<i>E. coli</i>	Amp Amo Ami, Rif Caz Ctx
E1L10B	Alimento	<i>K. pneumoniae</i>	Ami Amo Amp Gen Cip Clo Pol Stx Tet
1.1B	Mãos de profissionais de saúde	<i>K. pneumonie</i>	Cip Pol Tet Gen Lin
E.1B	Mãos de profissionais de saúde	<i>E. coli</i>	Amp Rif Na
13MBB	Mãos de manipuladores de alimento	<i>E. coli</i>	Amp Amo Stx Tet Gen
4V	S.T	<i>E. coli</i>	Amp Amo Nor Tet, Clo Gen Cip Cpm Caz Ctx
6V	S.T	<i>E. coli</i>	Ami Amo Amp Rif Clo Gen Na Tet
27V	S.T	<i>E.coli</i>	Ami Amo Amp Nor Cip Clo Na Stx Tet Gen
28V	S.T	<i>E.coli</i>	Ami Amp Amo Cip Clo Gen Tet Na
30V	S.T	<i>E.coli</i>	Nor Tet Na Gen Cip
31V	Fezes	<i>E. coli</i>	Amp Amo Tet Nor Gen Cip
F6	S.T	<i>K. pneumoniae</i>	Amp Amo Nor Rif Gen, Cip Cpm Caz
F19	Escarro	<i>K. pneumoniae</i>	Amp Amo Nor Rif Gen Cip Caz Ctx
F20	S.T	<i>K. pneumoniae</i>	Amp Amo Nor Tet Clo Rip Gen Caz Cip Cpm Ctx
F22	Lavado bronco alveolar	<i>E. coli</i>	Ami, Amp, Amo, Nor, Tet Clo Rif Gen, Cip Cpm Ctx
F24	Urina	<i>E. coli</i>	Amp Amo Nor Rif Tet Gen Ami Cip Clo Cpm Ctx
F25	Urina	<i>E. coli</i>	Amp Amo Nor, Ami Tet Clo Rif Gen Cip Cpm Ctx
F26	Urina	<i>K. pneumoniae</i>	Amp Amo Nor Ami Rif
F37	S.T	<i>K. pneumoniae</i>	Amp Amo Nor Rif Gen
F42	S. T	<i>K. pneumoniae</i>	Amp Amo Nor Rif, Gen Cip,
F43	S.T	<i>K. pneumoniae</i>	Amp Amo Clo Rif Gen Cpm Ctx
F44	Fragmento de esterno	<i>K. pneumoniae</i>	Amp Amo Tet Clo Rif Gen Cip Cpm Ctx
F45	Urina	<i>K. pneumoniae</i>	Amp Amo Ami Tet Clo Rif Gen Caz Ctx

\*cepas doadoras selecionadas com perfil para o ensaio de conjugação bacteriana; M.P.S (mãos de profissionais de saúde), M.M.A (mãos de manipuladores de alimento); ST: (secreção traqueal); amp (ampicilina), amo (amoxicilina), ak (amicacina), gen (gentamicina), cip (ciprofloxacina), rif (rifampicina), na (ácido nalídico), tet (tetraciclina), sxt (sulfatametoxazol-trimetropim), clo (clorafenicol), ctx (cefotaxima), caz (ceftazidma),cro(ceftriaxone), nor (norfloxacina),cfl (cefalotina).

### Ensaio de Conjugação bacteriana

Dentre as 27 cepas de diferentes origens foram selecionadas para os ensaios de conjugação. Foram selecionadas 6 cepas de enterobactérias potencialmente doadoras doadoras: cepas isoladas de mãos de manipuladores de saúde (1.1B, E.1B) e cepas oriundas de secreções diversas (4V, 27V, 28V, 30V). Obtivemos nos ensaios de conjugação bacteriana, cepas de *E. coli* K12 transconjugantes com marcadores de

resistência para a gentamicina, para cefalosporinas de 1ª e 3ª geração e outros marcadores de resistência (Tabela 3).

Tabela 3: Cepas submetidas ao teste de sensibilidade aos antimicrobianos das espécies *K.pneumoniae* e *E.coli* e a Indicação de resistência a gentamicina (gen) e, cefalosporinas de 1ª e 3ª geração e a outros marcadores de resistência.

Cepas doadoras	Perfil de resistência das doadoras	Perfil de resistência receptora <i>E. coli</i> k12 após conjugação
<i>K. pneumoniae</i> 1.1B	Ami Gen Pol Sxt Ctx Amp Cfl Cpm Amo	Ami Gen Amo Sxt Ctx Cfl Rif
<i>E. coli</i> E.1B	Ami Gen Tet Na	Ami Gen Na Rif
<i>E. coli</i> 4V	Ami Gen Na Rif Sxt	Ami Gen Na Rif
<i>E. coli</i> 27V	Ami Gen Sxt Cip Nor Caz Cfl Cro Ctx Na Rif	Ami Gen Sxt Na Rif Amo Caz Ctx Rif
<i>E. coli</i> 28V	Ami Gen Sxt Cro Ctx Na Clo Amp Amo	Ami Na Gen Ctx Cro Sxt Amp Amo Rif
<i>E. coli</i> 30V	Gen Sxt Cip Nor Cfl Na Clo	Gen Na Cfl Clo Amp Amo Rif
<i>K. pneumoniae</i> F42	Amp Amo Nor Rif Gen Cip	*
<i>K. pneumoniae</i> F37	Amp Amo Nor Ami Gen	*
<i>K. pneumoniae</i> F45	Amp Amo, Ami Tet Clo Gen	*
<i>K. pneumoniae</i> E1L1AB	Amp Ami Gen	*
<i>K.pneumoniae</i> 002PRRBB	Amp Amo Ami Clo Na Gen Amp Amo Tet Nor Cip	*
<i>E.coli</i> 31V		*

\*cepas que não conjugaram

### Teste fenotípico para detecção de cepas produtoras de ESBL

Após os ensaios de conjugação bacteriana foram avaliados os marcadores de resistência das cepas doadoras e das cepas transconjugantes. Foi possível observar a transferência de marcadores de resistência à gentamicina e cefalosporinas de 1ª e 3ª gerações e de outros marcadores de resistência, em todas as transconjugantes. A partir do fenótipo de resistência obtido para as cepas, foi possível verificar a presença de marcadores resistência a aminoglicosídeos associados à resistência a cefalosporinas por enzimas de espectro estendido. Apresentamos abaixo os perfis de resistência e resultados indicativos da produção de ESBL das cepas de mãos de profissionais de saúde e de secreções diversas e suas transconjugantes (Tabela 4).

Tabela 4: Perfil de resistência bacteriana e resultado da produção de ESBL das cepas de mãos de profissionais de saúde e de secreções diversas.

CEPA	R C	ESBL	RG
1.1B	Ctx Cfl Caz Cro Ctx Cfl	+	+
1.1BT1 1.1BT3 1.1BT4 1.1BT5	Ctx, Cfl	+	+
E.1B	Cfl	—	+
E.1BT1 E.1BT2 E.1BT3 E.1BT4 E.1BT5 E.1BT6	—	—	+
4V	Cfl	—	+
4VT1 4VT2 4VT3 4VT4 4VT5 4VT6	—	—	+
27V	Ctx Cro Cfm Cfl	+	+
27VT1 27VT2 27VT3 27VT4 27VT5 27VT6	Ctx Cro Cfm Cfl	+	+

28V	Ctx Cfl Cfm Caz	+	+
28VT1 28VT2 28VT3	Cro		
28VT4 28VT5 28VT6	Ctx Cfl Cfm Caz Cro	+	+
30V	Cfl	*	+
30VT1 30VT2 30VT3			
30VT4 30VT5 30VT6	Cfl	*	+

\*RC: resistência a cefalosporinas; ESBL: beta-lactamase de espectro estendido; RG: Resistência a Gentamicina;;

\*CEPAS NÃO TESTADAS; Cfl: cefalotina; Caz: ceftazidima; Ctx: cefotaxima.,Cfm: cefepima, Cro: ceftriaxone

## DISCUSSÃO

De acordo com Guenther et al. (2011), os beta-lactâmicos representam uma das classes de antimicrobianos amplamente utilizados, em humanos e outros animais. De fato, não detectamos a resistência a carbapenêmicos nas cepas isoladas no período de estudo.

Nesse trabalho pôde-se observar a multiresistência a diferentes agentes antimicrobianos nas espécies estudadas: *K. pneumoniae* e *E. coli*. A elevada frequência da resistência bacteriana é um preocupante problema mundial, onde a disseminação de bactérias multiresistentes tem sido um crescente desafio não só a nível hospitalar, mas, também, no ambiente extra-hospitalar (Caumo, 2010). Observamos, que as espécies *K. pneumoniae* e *E. coli* estudadas apresentaram uma frequente resistência às cefalosporinas de 1ª e 3ª gerações e à gentamicina. Todas as cepas de origens diversas estudadas foram resistentes a uma ou a mais cefalosporinas, sendo evidenciada maior frequência de resistência para as cefalosporinas de 3ª geração (ceftriaxone, cefotaxima, ceftazidima).

Cerca de 57,8 (57,8%) das cepas mostraram resistência a cefalosporinas de 3ª geração, somente a cepa 13MBB (*E. coli*) de mãos de manipuladores de alimentos apresentou sensibilidade a estes antimicrobianos. Nas últimas décadas, enterobactérias resistentes a cefalosporinas de terceira geração têm emergido e se disseminado dentro e fora do ambiente hospitalar, em infecções associadas ao aumento de morbidade, mortalidade, tempo de internação e despesas hospitalares (Rang e Dale, 2008).

Foi possível constatar que a expressão de genes para ESBL nas espécies *E. coli* e *K. pneumoniae* estudadas foi mais frequente em cepas provenientes de mãos de profissionais de saúde e secreções diversas. De acordo com Caneiras, (2009), entre os microrganismos Gram-negativos mais frequentemente isolados em situações clínicas, inclusive de bacteremia, encontram-se cepas de *E. coli* (20%) e de *K. pneumoniae* (4,7%). No presente trabalho foram analisadas 13 cepas, predominando a espécie *E.coli*.

Silva et al. (2009) ressaltam que *E. coli* é espécie mais comum nas infecções urinárias, entretanto a presença de fímbrias e adesinas atuam como fator de virulência (infecção e/ou colonização) e relaciona-a também com infecções de feridas, infecções intestinais, pneumonias em doentes imunocomprometidos e sepse. Esta espécie bacteriana quando encontrada nas mãos de profissionais de saúde, mãos de manipuladores de alimento e em alimentos, como constatado neste trabalho, traz o entendimento da grande relevância dos fatores que podem contribuir para a ocorrência ou disseminação da resistência bacteriana como: aqueles relacionados ao hospedeiro e à pressão seletiva gerada pelos agentes antimicrobianos, a falta de higienização das mãos, a falta de isolamento dos pacientes ou deficiências na educação, que nem sempre tem trazido a contribuição esperada para o controle da resistência bacteriana.

Observamos que 14 das 27 cepas estudadas eram *K. pneumoniae* e cinquenta por cento deste material clínico isolado foram provenientes de origem de secreções diversas (colonização). Sobretudo, é possível ressaltar que determinados pacientes compartilham características que determinam maior probabilidade de ocorrência de processos de colonização bactéria e/ou infecção (Murthy, 2001). Cuzon et. al. (2010) ressaltam que em *K. pneumoniae*, a resistência normalmente está associada à presença de plasmídios

que podem albergar genes codificando tanto para beta-lactamases, como enzimas para outros beta-lactâmicos, além daquelas que conferem resistência para quinolonas e aminoglicosídeos

Norskov-Lauritsen et al. (2009) relatam que no ambiente hospitalar, a infecção e/ou colonização por *Enterobacteriaceae*, antimicrobianos beta-lactâmicos são os mais prescritos e utilizados pelo seu amplo espectro de ação, porém, devido a ampla utilização destes, a resistência aos bastonetes Gram-negativos tem se tornado mais frequente. Essa resistência aos beta-lactâmicos está muitas vezes associada à resistência aos antibióticos de outras classes também muito utilizados na terapêutica, como os aminoglicosídeos e fluoroquinolonas, também observamos, particularmente, em relação às espécies *E. coli* e *K. pneumoniae*.

Todas as cepas provenientes de alimento apresentaram sensibilidade a gentamicina, porém as cepas de fezes, urina, mãos de manipuladores de alimentos, mãos de profissionais de saúde e secreções diversas foram resistentes a este aminoglicosídeo. Os aminoglicosídeos por muitas décadas foram referência para o tratamento de infecções graves por bacilos Gram-negativos e para infecções graves por microrganismos Gram-positivos, por conta do efeito sinérgico quando utilizados em associação com penicilinas e cefalosporinas (Leggett, 2015). A gentamicina foi o agente antimicrobiano seletivo para o meio de cultura utilizado, o que permitiu o isolamento das cepas *K. pneumoniae* e *E. coli* multiresistentes aos antimicrobianos empregados de forma rotineira na terapêutica. Constatamos que as cepas de mãos de profissionais de saúde E.1 (*E. coli*) e 1.1 (*K. pneumoniae*) apresentaram blocos de resistência a múltiplos antimicrobianos e que ocorreu transferência destes blocos de resistência bacteriana por conjugação bacteriana. Foi possível observar a resistência ao telurito de potássio na cepa doadora 1.1B (*K. pneumoniae*) e nas respectivas transconjugantes 1.1BT1, 1.1BT3, 1.1BT4, 1.1BT5. De acordo com Vieira et al.(1999), este sal aparece como indicador da multiresistência bacteriana aos antimicrobianos. Pelos ensaios de conjugação bacteriana foi possível analisar a transferência de outros marcadores de resistência após o ensaio de conjugação: ampicilina, cefalosporinas de 1ª e 3ª geração, norfloxacin, tetraciclina, cloranfenicol, gentamicina, amicacina, amoxicilina, rifampicina, ácido nalídixico, polimixina B, sulfametoxazol-trimetoprim e telurito de potássio. Todas as cepas de alimento apresentaram sensibilidade a gentamicina, e resistência a ampicilina, amoxicilina, amicacina e rifampicina.

Assim como os aminoglicosídeos, quinolonas e polimixinas também têm sido utilizados como opções terapêuticas nos casos de multiresistência antimicrobiana (Fishbain e Peleg, 2010). Observou-se como marcador de resistência ciprofloxacina nas cepas doadoras 1.1B (*K. pneumoniae*), E.1B (*E. coli*), 27V (*E. coli*), 28V (*E. coli*) e 30 V (*E. coli*), porém a cepa 4V (*E. coli*) foi sensível a esta quinolona. Na resistência a quinolonas, alguns mecanismos podem estar envolvidos como: alterações de topoisomerase tipo IV, diminuição de permeabilidade, mecanismos de bomba de efluxo, proteção de alvo e modificação do antimicrobiano, envolvendo vários genes de origem cromossomal (Gottesman, 2009). As quinolonas estão entre os agentes antimicrobianos mais frequentemente prescritos para o tratamento de diversos tipos de infecções causadas por enterobactérias, especialmente infecções do trato urinário (Kim e Hooper, 2014).

As polimixinas são uma das opções terapêuticas utilizadas para bastonetes Gram-negativos. Dentro das famílias *Enterobacteriaceae* diversos representantes costumam ser suscetíveis a polimixina B entre eles *Escherichia coli*, *Enterobacter spp*, *Citrobacter spp*, *Salmonella spp*, *Shigella spp* e *Klebsiella spp* (Gales, 2011). De acordo com Olaitain et al. (2014), apesar de taxas de resistência a polimixinas serem consideradas baixas, já são descritos casos de resistência a esses agentes antimicrobianos, principalmente para a colistina, em isolados de *K. pneumoniae*, e a eficácia clínica

destes antimicrobianos já está tornando-se limitada, principalmente quando esses antimicrobianos são empregados como monoterapia.

As cepas 1.1B (*K.pneumoniae*), E.1B (*E.coli*) e 30V (*E.coli*), apresentaram resistência a polimixina e a cepa 28V apresentou resistência intermediária ao antimicrobiano. As respectivas transconjugantes 1.1BT5, 1BT2, E.1BT3, E.1BT4, 30VT1 também apresentaram resistência intermediária e a cepa 30VT6 foi a única transconjugante resistente. Acredita-se que a exposição prévia às polimixinas e a utilização de doses abaixo das doses ideais sejam fatores importantes para que microrganismos desenvolvam resistência a estes antimicrobianos (Mezghani, 2011).

A partir do fenótipo de resistência obtido das cepas, foi possível verificar a presença de marcadores de resistência que codificam enzimas que conferem resistência a cefalosporinas de 1ª e 3ª gerações e resistência a aminoglicosídeos. Estes blocos de resistência se devem aos vários mecanismos de resistência codificados por genes que favorecem a disseminação de resistência bacteriana.

Todas as cepas estudadas apresentaram sensibilidade aos antimicrobianos carbapenêmicos (meropenem, ertapnemem e imipenem). Apesar de serem antibióticos com o maior espectro de ação conhecidos, a emergência de resistência aos carbapenêmicos é um fenômeno global e se constitui atualmente como um grave problema de Saúde Pública, especialmente por acometer pacientes gravemente enfermos, geralmente hospitalizados (Lynch, 2013). Segundo Pappa-Wallace et al. (2011), os carbapenêmicos continuam sendo um dos principais fármacos mais utilizados por sua potência e amplo espectro de ação contra multiresistência, estes antimicrobianos foram considerados a “última linha” para o tratamento de infecções graves por Gram-negativos, principalmente aqueles associados às Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS). A resistência a estes antimicrobianos pode ocorrer através de três mecanismos principais: redução da permeabilidade transmembrana (diminuição das porinas), bombas de efluxo e pela ação de beta-lactamases (Falagas e Karageorgopoulos, 2014). Como consequência, os carbapenêmicos têm sido utilizados, frequentemente, como escolha terapêutica, porém o uso cada vez maior destes antimicrobianos, tanto no Brasil como em todo o mundo, têm resultado em um número crescente de isolados resistentes a esse grupo de antibióticos. Os genes codificando para diferentes carbapenemases são descritos como associados a elementos genéticos (sequências de inserção e integrons) que viabilizam a integração dos mesmos a diferentes plasmídios. Diferentes genes específicos para a expressão de carbapenemases, normalmente as da classe B (metalo-lactamases), são detectados em plasmídios de diferentes grupos de incompatibilidade, associados a outros genes de resistência em enterobactérias (Nordmann e Poirel, 2014).

Nessas duas décadas que se sucedem à ocasião de isolamento das cepas estudadas, têm sido descritos plasmídios contendo genes codificando para diferentes classes de antimicrobianos em enterobactérias multiresistentes isoladas em várias partes do mundo, a partir de fontes humanas e animais. As condições de integração de genes codificando para a síntese bacteriana de carbapenemases ocorreu em cenário geral similar ao abordado neste estudo: alta pressão seletiva, procedimentos invasivos, quebras de assepsia em procedimentos, favorecendo a disseminação de plasmídios transferíveis, como os que estão provavelmente envolvidos nos nossos resultados de transferência de marcadores por conjugação bacteriana estudados. O desafio de controle permanece, no geral, o mesmo (Soares, 2012). Os plasmídios daquele período de estudo poderiam estar relacionados ao atual carreamento de genes resistência aos carbapenêmicos. Dentre estes fatores, a transmissão horizontal é um dos principais por ser a capacidade de mobilização dos genes de resistência de uma célula bacteriana para outra por plasmídios e transposons conjugativos e com a eventual recombinação com genoma bacteriano, por transposons, cassetes gênicos em integrons e sequências de



inserção, que podem estar inseridos em plasmídios ou transposons e assim, transferidos para outras bactérias. Estes elementos genéticos móveis possibilitam a mobilização de múltiplos genes permitindo às bactérias sobreviverem sobpressão seletiva de antimicrobianos (Andrade, 2011).

A emergência de microrganismos multirresistentes é consequência natural da pressão seletiva resultante do abuso dos antimicrobianos, sendo um problema cada vez mais preocupante (Praxedes, 2012). De acordo com Pina et al. (2010), o isolamento e cuidados especiais no contato com pacientes infectados com bactérias produtoras de beta-lactamases (ESBLs) são questões determinantes no controle da disseminação de tais microrganismos no ambiente hospitalar. A utilização de procedimentos invasivos, como uso de cateteres e mecanismo de ventilação pulmonar artificial, são fatores que permitem a colonização e/ou infecção por bactérias resistentes nos indivíduos que são submetidos a estas invasões bacterianas que possuem genes que carregam a resistência entre os microrganismos.

Nos ambientes hospitalares, o que tem acarretado a elevada produção de ESBLs e outros mecanismos de resistência enzimática, é a permanência de pacientes, principalmente em Centros de Tratamento Intensivo (CTIs) (Falagas e Karageorgopoulos, 2009). Os pacientes colonizados ou infectados são a principal fonte para a disseminação de microrganismos. Contudo Oliveira et al. (2011) ressaltam que os profissionais de saúde colonizados, equipamentos próximo aos pacientes e frequentemente tocados pelos profissionais são potenciais reservatórios de microrganismos.

Pittet et al. (2009) ressaltam que a Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda a higienização de mãos nas seguintes situações: antes do contato com o paciente, antes da realização de procedimentos, após risco de contato com fluidos corporais, após contato com o paciente e após contato com as áreas próximas ao paciente. Porém, a falta de adesão dos profissionais de saúde a esta prática é uma realidade que vem sendo constatada ao longo dos anos e tem sido objeto de estudos em diversas partes do mundo. A utilização simples de água e sabão pode reduzir a população microbiana presente nas mãos e, na maioria das vezes, interromper a cadeia de transmissão de doenças. A aplicação de produtos antissépticos, em especial de agentes com base alcoólica, pode reduzir ainda mais os riscos de transmissão, pela intensificação da redução microbiana ou por favorecer um aumento na frequência de higienização das mãos (Santos, 2013).

Segundo Cohen et al. (2010), as precauções baseadas em rotas de transmissão são destinadas a pacientes em que se conhece, ou se suspeita, estarem colonizados e/ou infectados com agentes infecciosos específicos. Precauções de contato incluem medidas de prevenção de disseminação de bactérias resistentes. Deve-se implementar nas instituições medidas específicas de controle e prevenção para as *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBL e a orientação na prevenção da transmissão paciente-paciente de microrganismos produtores de ESBL, evitando a colonização do meio ambiente, das mãos dos profissionais de saúde e do equipamento hospitalar (Keith e Pogue, 2015).

Neste trabalho foi possível avaliar nos resultados de marcadores de resistência e a produção de genes ESBL, associados a outros, provavelmente em elementos genéticos móveis como plasmídios que podem estar presentes numa mesma cepa associados a outros genes que codificam resistência a outros antimicrobianos. Não encontramos cepas resistentes a carbapenêmicos. De fato, no tempo de isolamento das cepas estudadas, a resistência a esses antibióticos estava em condições iniciais de disseminação mundial, mas constatamos condições consideradas como prévias à disseminação de diversos genes específicos para resistência a carbapenêmicos, quais sejam plasmídios transferíveis, codificando para diferentes agentes em ambiente favorável à transmissão de microrganismos (internação, invasões e falhas na

assepsia de procedimentos) e transferência de plasmídios em condições de altas pressões seletivas dependentes do uso de antimicrobianos (interações bacterianas em contextos de sítios anatômicos colonizados e/ou infectados).

Pode-se concluir que a provável participação dos plasmídios transferidos por conjugação bacteriana, indica que a disseminação de resistência está grandemente associada a essa capacidade de transferência de elementos que codificam mecanismos de resistência, o que reforça a necessidade do estabelecimento e estrita observância de medidas preventivas básicas e de controle da disseminação destes microrganismos e de elementos genéticos carreando genes para resistência a antimicrobianos, no ambiente hospitalar, em particular.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, aos meus queridos orientadores José Augusto Adler Pereira e Alexandre Ribeiro Bello e co-orientadora Bianca Oliveira Fonseca pelo aprendizado e confiança, à Universidade Santa Úrsula e à Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andrade LN. Genética e epidemiologia molecular de enterobactérias produtoras de KPC no Brasil. Tese [Doutorado em Farmácia]-Universidade de São Paulo; 2011.
- Caneiras CSG. Determinantes genéticos de resistência e virulência em isolados clínicos de *Escherichia coli* e *Klebsiella spp.* Dissertação [Mestrado em Genética]-Universidade de Lisboa Bacteriémias; 2009.
- Carattoli A. Resistance plasmid families in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob agents and chemoter.*2009;53(6): 2227-38.
- Caumo K, Duarte M, Cargnin TS, Ribeiro BV, Tasca T, Macedo JA. Resistência bacteriana no meio ambiente e implicações na clínica hospitalar. *Rev Lib* 2010;11(16): 89-188.
- Cohen S, Gerding D, Johnson S, Ciaran P, Kelly M, Vivian G, et al. Clinical practice guidelines for clostridium difficile infection in adults: update by the society for healthcare epidemiology of America (shea) and the infectious diseases society of America (idsa). *Infect Control Hosp Epidemiol* 2010;31(5):431-55.
- Cuzon G, Naas T, Nordmann P. KPC carbapenemases: what is at stake in clinical microbiology. *Pathology Biol* 2010;58:39-45.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (US). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-fourth Informational Supplement. CLSI document M100-S27. Wayne, Pennsylvania; 2017.
- Falagas ME, Karageorgopoulos DE. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases-producing organisms. *J Hospital Infec* 2009; 73:345-54.
- Falagas ME, Lourida P, Poulidakos P, Rafailidis PI, Tansarli GS. Antibiotic Treatment of Infections Due to Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae*: Systematic Evaluation of the Available Evidence. *Antimicrob. Agents Chemother* 2014; 58(2):654-63.
- Fang L, Li X, Li L, Li S, Liao X, Sun J, et al. Co-spread of metal and antibiotic resistance within ST3-IncHI2 plasmids from *E. coli* isolates of food-producing animals. *Scienc report* 2016; 6(10):1038- 25312
- Ferreira H, Lala ER. *Pseudomonas aeruginosa*: Um alerta aos profissionais de saúde. *Rev Pan Infect* 2010;12(2):44 -50.
- Fishbain J, Peleg YA. Treatment of *Acinetobacter* Infections. *Clin Infect Dis* 2010; 51(1):79–84
- Gales AC, Jones RN, Sader HS. Contemporary activity of colistin and polymyxin B against a worldwide collection of Gram-negative pathogens: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2006-09). *J Antimicrob Chemother* 2011; 66(9):2070-2074

- Gottesman BS, Carmeli Y, Shitrit P, Chowers M. Impact of quinolone restriction on resistance patterns of *Escherichia coli* isolated from urine by culture in a community setting. *Clinic Infect Dis* 2009; 49:869-75.
- Guenther S, Ewers C, Wieler LH. Extended-spectrum beta-lactamases producing *E.coli* in wildlife, yet another form of environmental pollution? *Frontiers in microbiology – antimicrobials*. *Resist Chem* 2011;2:1-13.
- Gupta V. An update on newer  $\beta$  lactamases. *Indian J Med Res* 2007;126: 417-27.
- Harbottle H, Thakur S, Zhao S, White DG. Genetics of antimicrobial resistance. *Anim biotechnol* 2006;17:111-24.
- Hong DJ, Bae IK, Ho-In Jang, Jeong SH, Kyung-Hynk K, Lee K. Epidemiology and characteristics of metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect chemother* 2015;47(2):81-97.
- Jensen US, Muller A, Brandt CT, Frimodt-Møller N, Hammerumand AM, Monnet DL. Effect of generics on price and consumption of ciprofloxacin in primary healthcare: the relationship to increasing resistance. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65:1286-91.
- Jeon JH, Jung HL, Jae JL, Kwang SP, Asad MK, Chang-Ro L, et al. Structural basis for carbapenem-hydrolyzing mechanisms of carbapenemases conferring antibiotic resistance. *Inter J Mol Sci* 2015;16(5):9654-92.
- Keith SK, Pogue MJ. Infections Caused by Resistant Gram-Negative Bacteria: Epidemiology and Manag Pharmacot 2015;35(10):949-62
- Kim ES, Hooper DC. Clinical importance and epidemiology of quinolone resistance. *Infect Chemother* 2014; 46(4):226-38.
- Leggett JE. Aminoglycosides. In: Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases 8<sup>th</sup>.ed.. Philadelphia: Elsevier; 2015.
- Lynch JP, Clark NM, Zhanel GG. Evolution of antimicrobial resistance among *Enterobacteriaceae* (focus on extended spectrum  $\beta$  lactamases and carbapenemases). *Expert Opin Pharm* 2013;14(2):199-210
- Loureiro RJ, Roque F, Rodrigues AT, Herdeiro MT, Ramalheira E. O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. *Rev Port Saúde Pública* 2016;34(1):77–84
- Maniati M, Ikonomidis A, Mantzana P, Daponte A, Maniatis AN, Pournaras S. A highly carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate with a novel *bla*VIM-4/*bla*P1b integron overexpresses two efflux pumps and lacks *OprD*. *J Antimicrob Chemother* 2007;60(1):132–35.
- Mezghani MS, Ghozzi R, Smaoui H, Mnif B, Znazen A, Mahjoub F, et al. Evolution de la sensibilité aux antibiotiques des souches de *Staphylococcus aureus* en Tunisie : résultats d'une étude multicentrique (1999-2008). *Rev Tun Infectiol* 2011; 5(4): 244-88.
- Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Medical Microbiol* Mosby, 6th.ed. St. Louis: Mosby; 2009.
- Murthy R. Implementation of strategies to control Antimicrobial resistance. *Chest* 2001;119 (suppl II):405S-411S.
- Nordmann P, Poirel L, Dortet L. Rapid detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg Infect Dis* 2012;18:(9) 1503-7
- Norskov-Lauritsen N, Overballe MD, Kilian M. 2009. Delineation of the species *Haemophilus influenzae* by phenotype, multilocus sequence phylogeny, and detection of marker genes. *J Bacteriol* 2009; 191: 822–31.
- Oliveira AC, Damasceno QS, Piscocoya M, Nicoli JR. Epidemiologic characteristics of resistant microorganisms present in reserves from an intensive care unit. *Am. J Infect Control* 2011;1-3.
- Olaitan AO, Morand S, Rolain JM. Mechanisms of polymixin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Front Microbiol* 2014;5:1-18.

- Pappa-Wallace PM, Endimani A, Taracila MA, Bonomo RA. Carbapenems: Past, Present and Future. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55(11):4943–60.
- Pina E, Ferreira E, Marques A, Matos B. Infecções associadas aos cuidados de saúde e segurança do doente. *Rev Port Saúde Pública* 2010;10: 27-39.
- Pittet D, Allegranzi B, Boyce J. World health organization world alliance for patient safety first global patient safety challenge core group of experts. The world health organization guidelines on hand hygiene in health care and their consensus recommendations. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2009;30:611-22.
- Praxedes C, Zúniga NO, Bastos PA, Franco RM, Mano SB. Avaliação da sensibilidade de *Enterobacteriaceae* da microbiota intestinal de frangos de corte submetidos à dieta com nitrofuranos. *Rev Bras Ci Vet* 2012;19(1):46-49.
- Rang HP, Dale MN, Ritter JM. *Farmacologia*. 6th ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008.
- Rodríguez-Baño, J, Navarro M.D. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in ambulatory care: a clinical perspective. *Clinical Microbiol Infection* 2008;14(1):104-110.
- Santos DA, Nascimento MM, Vitali LH, Martinez R. In vitro activity of antimicrobial combinations against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev Soc Bras Med Trop* 2013;46(3):299-303
- Scarpate EC, Cossatis JJ. A presença da *Klebsiella pneumoniae* produtora de  $\beta$ -lactamase de espectro estendido no ambiente hospitalar. *Saúde Amb Rev* 2009;4 (1):1-11.
- Silva A, Oliveira F, Ramos M. Infecção associada ao cateter venoso central - revisão da literatura. *Rev Ref* 2009;2(11):125-134.
- Soares VM. Emergência de *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase (KPC) em um hospital terciário. *Bras Patol Med Lab* 2012;48(4):251-53
- Valková D, Valkovicová L, Vávrová S, Kováčová E, Mravec J, Turna J. The contribution of tellurite resistance genes to the fitness of *Escherichia coli* uropathogenic strains. *Central Europ J Biol* 2007;2(2):182-91
- Vieira AL, Castro RE, Duarte BJ, Pinheiro RS, Suassuna I, Pereira AJ. Colonização intestinal de recém-natos por enterobactérias multiresistentes a antimicrobianos em unidade neonatal. *J Pediatr* 1999;75(2):83-90
- Winn W, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger P, et al. *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. Lippincott Williams e Wilkins: Philadelphia; 2006.