LÍVIA DE CARVALHO FONTES

MONITORAMENTO DA RESISTÊNCIA AOS ANTIBACTERIANOS EM MEMBROS DA FAMÍLIA ENTEROBACTERIACEAE RECUPERADOS DE AMBIENTES AQUÁTICOS NO ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2012

Lívia de Carvalho Fontes

MONITORAMENTO DA RESISTÊNCIA AOS ANTIBACTERIANOS EM MEMBROS DA FAMÍLIA ENTEROBACTERIACEA RECUPERADOS DE AMBIENTES AQUÁTICOS NO ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Nilton Lincopan

Versão Corrigida

A versão original encontra-se arquivada no Setor de Comunicação do ICB

São Paulo
2012

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Fontes, Lívia de Carvalho.
Monitoramento da resistência aos antibacterianos em membros da família *Enterobacteriaceae* recuperados de ambientes aquáticos no estado de São Paulo, Brasil / Lívia de Carvalho Fontes. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Nilton Erbet Lincopan Huenuman.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Bactérias resistentes aos antibacterianos

Versão do título para o inglês: Monitoring the presence of multidrug-resistant *Enterobacteriaceae* in environmental water samples in São Paulo State, Brasil.

Descritores: 1. *Enterobacteriaceae* 2. Poluição da água por microorganismos 3. Testes de sensibilidade microbiana 4. Resistência microbiana às drogas I. Huenuman, Nilton Erbet Lincopan II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB02/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Lívia de Carvalho Fontes.

Título da Dissertação: Monitoramento da resistência aos antibacterianos em membtos da família Enterobacteriaceae recuperados de ambientes aquáticos no estado de São Paulo, Brasil.

Orientador(a): Nilton Erbet Lincopan Huenuman.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**, em sessão pública realizada a ...../...../.....,

( ) Aprovado(a) **( ) Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone :(55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB Nº **361/10** referente ao projeto intitulado: ***"Mecanismos de resistência, transferência de genes e tipagem molecular em membros da família Enterobacteriaceae recuperados de ambientes na região sudeste do Brasil"*** sob a responsabilidade de **Lívia de Carvalho Fontes,** foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSH-COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não envolve manipulação animal ou humana que justifique uma aprovação quanto aos princípios éticos exigidos por ambas as Comissões.

São Paulo, 22 de março de 2010.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEUA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M.A ZANOTTO
Vice-Coordenador da CEPsh - ICB/USP

Dedico esse trabalho aos meus pais, que sempre me apoiaram, acreditando nos meus planos, e que nunca permitiram que eu desistisse.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por conceder-me equilíbrio e saúde para trilhar os caminhos por mim escolhidos;
Aos meus pais, pelo imenso carinho e amor, alicerces para que eu alcançasse os meus objetivos de vida;
Aos meus irmãos Flávio, Bini e Monalisa pela amizade sincera, pelo carinho e incentivos profissionais;
Ao meu orientador, Nilton Lincopan, pela confiança, ensinamentos e orientação;
Aos meus tio(a)s e primo(a)s pelo incentivo e carinho;
Aos meus amigos de disciplinas que ajudavam a tornar as aulas mais alegres;
Aos meus amigos de outros laboratórios que tanto contribuíram com empréstimos de reagentes, materiais e equipamentos;
À Pri por todo auxílio e amizade;
Ao Felipe, apoio incondicional;
À Clau e prof. Irma que me abriram as portas para que eu desse o primeiro passo;
Aos vários colegas de laboratório, Ketrin, Manú, Sil, Michele, Helena, Patrícia, Juan, Sabrina, pelas muitas horas que convivemos, pela ajuda na solução de problemas, no apoio, nos ensinamentos;
À Clarissa pela saudável convivência;
À técnica do laboratório, Jacinta, pela ajuda, disponibilidade e amizade;
Aos que me ajudaram, quando surgiram obstáculos a serem transpostos
À equipe de esterilização;
A toda equipe da CETESB por fornecer as amostras de água;
Ao Lab. da Prof. Maria Helena Matté (isolados bacterianos Estações de Tratamento de Esgoto);
À Cefar pelos discos de antibióticos;
À equipe da biblioteca que tanto ajudou na finalização deste trabalho
Ao pessoal da secretária da Pós-graduação e departamento de Microbiologia
À Capes e Cnpq
Finalmente, tenho que manifestar meu agradecimento à FAPESP, pelo aporte financeiro (Processo: 2010/04476-1) que muito contribui para que eu concluísse este trabalho.

À banca de qualificação e à banca presente na defesa da tese, pelas sugestões enriquecedoras ao trabalho

Minha Gratidão!

No meio da dificuldade encontra-se a oportunidade.

Albert Einstein

Termos consciência de que somos ignorantes é um grande passo para o conhecimento.

Benjamin Disraeli

RESUMO

FONTES, L. C. **Monitoramento da Resistência aos Antibacterianos em Membros da Família Enterobacteriaceae Recuperados de Ambientes Aquáticos no estado de São Paulo, Brasil.** 2012. 79 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Enterobactérias são importantes agentes de infecções relacionadas à assistência à saúde (IrAS), podendo contaminar ambientes aquáticos poluídos por atividades antropogênicas. O uso indiscriminado de antibacterianos (ATB) na medicina humana e veterinária tem resultado no aumento do número de bactérias resistentes, sendo que ambientes aquáticos podem ser importantes locais para a sua seleção e disseminação, assim como, para a aquisição de elementos genéticos associados. O objetivo desse estudo foi monitorar a disseminação de enterobactérias, com perfil de resistência aos ATB, em ambientes aquáticos do estado de São Paulo investigando o seu contexto genético. O perfil de resistência foi caracterizado por antibiograma qualitativo (Kirby-Bauer) e quantitativo (CIM) seguindo as recomendações do CLSI. A produção de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) foi avaliada pela técnica da dupla-difusão em disco e/ou utilizando fitas de E-test ESBL. Genes codificando ESBLs e resistência a quinolonas mediada por plasmídeos (PMQR) foram investigados por PCR, e a similaridade genética foi avaliada por ERIC-PCR. De 2009-2010, 135 enterobactérias, resistentes a pelo menos um ATB, foram isoladas de rios urbanos, represas, e estações de tratamento de esgoto. O fenótipo multirresistente (MR) foi predominante em 64% dos isolados, sendo que houve uma alta prevalência de *Escherichia coli* (80%) e *Klebsiella pneumoniae* (48%). Dentre estas espécies, 8% dos isolados apresentaram fenótipo ESBL (cefotaxima, $CIM_{50} \geq 64$ µg/ml) devido à presença de genes bla_{CTX-M}-*like*, enquanto que a presença de genes *qnr-like* foi confirmada em 7% dos isolados resistentes à ciprofloxacina ($CIM_{50} \geq 32$µg/ml). A tipagem por ERIC-PCR, nos isolados carregando genes bla_{CTX-M} e/ou genes *qnr*, revelou ausência de relação clonal entre as cepas de *K. pneumoniae* (n=10), enquanto que cepas de *E. coli* (n= 12) foram agrupadas em nove *clusters* (> 90% de similaridade). Neste trabalho, reportamos a ocorrência de genes de resistência de importância clínica em enterobactérias recuperadas de ambientes aquáticos no estado de São Paulo, Brasil.

Palavras chave: Enterobacteriaceae. Ambiente. Multirresistência. Antibacterianos. Beta-lactamases de espectro estendido (ESBL). Fluoroquinolonas.

ABSTRACT

FONTES, L. C. **Surveillance of antibacterial resistance among Enterobacteriaceae from environmental water samples in São Paulo State, Brazil.** 2012. 79 p. Master's Thesis (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Members of the Enterobacteriaceae are important agents of healthcare-associated infections (HAI) and often inhabit aquatic environments polluted by anthropogenic activities. The widespread use of antibiotics in human medicine and veterinary has resulted in increasing number of bacterial resistance to antimicrobial agents, and aquatic environments can be favorable settings for efficient selection of these populations, as well as, for the exchange of resistance genes mediated by horizontal transfer of mobile elements. The aim of this study was to monitor the spread of Enterobacteriaceae with an antimicrobial-resistant profile in aquatic environments in Sao Paulo state, and to investigate their genetic background. The antimicrobial resistance profiles were characterized by using qualitative (Kirby-Bauer) and quantitative (MIC) susceptibility methods in accordance to CLSI guidelines. Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) phenotypes were identified by double-disk diffusion, and by using ESBL E-test strips. Genes encoding ESBLs and plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) were investigated by PCR and genotyping of isolates carrying these genes was performed by ERIC-PCR. From 2009 to 2010, 135 bacterial isolates of Enterobacteriaceae resistant to at least one antibiotic were isolated from various water sources such as rivers, dams and sewage treatment plants, in the state of Sao Paulo, Brazil. A total of 87/135 isolates (64%) exhibited a multidrug-resistant phenotype with a high prevalence of *E. coli* (80%) and *Klebsiella pneumoniae* (48%) strains, of which 8% showed a positive ESBL phenotype (cefotaxime, $MIC_{50} \geq 64$ µg/ml) related to bla_{CTX-M}-like genes. The presence of *qnr*-like genes was confirmed in 7% isolates (ciprofloxacin $MIC_{50} \geq$ 32µg/ml). ERIC-PCR genotyping among isolates carrying bla_{CTX-M}-*like* and/or *qnr* genes revealed absence of clonal relationship among *K. pneumoniae* strains (n=10), whereas *E. coli* strains (n=12) were grouped into the nine clusters (>90% similarity). In this study, we report the occurrence of resistance genes in clinically important Enterobacteriaceae recovered from aquatic environments in São Paulo state, Brazil.

Key words: Enterobacteriaceae. Environment, Multidrug resistance, Fluoroquinolone. Antimicrobial agents. Extended-spectrum beta-lactamases (ESBL). Fluoroquinolones.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMI - Amicacina

AMC - Amoxicilina + Ácido clavulânico

AMP - Ampicilina

ATCC - *American Type Culture Collection*

Bla - Gene codificador de β-lactamases

CAZ - Ceftazidima

CIP - Ciprofloxacina.

CLSI - *Clinical and Laboratory Standard Institute*

CIM - Concentração inibitória mínima

CRO - Ceftriaxona

CTX - Cefotaxima

DDST - Método da dupla difusão em disco

DNA - Ácido desoxiribonucleico

dNTPp - Deoxinucleotideo trifosfato

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

ESBL - *Extended Spectrum Beta-Lactamases* (Beta-lactamases de espectro ampliado)

EST- Estreptomicina

CPM - Cefepime
CTX – Cefotaxima

CRX - Cefuroxima

GEN- Gentamicina

IMP- Imipenem

MH – Muller-Hinton

ml- Mililitro

mm- Milímetro.

NAL- Ácido nalidíxico

PBP – *Penicilium Binding Protein*

PCR - Reação em cadeia pela polimerase (“Polymerase Chain Reaction”)

PFGE - Eletroforese em gel de campo pulsado (“Pulsed Field Gel Electrophoresis”)

PMQR – *Plasmid Mediated Quinolone-Resistant*

RNA - Ácido ribonucléico (“Ribonucleic Acid”)

RPM – Rotações por minuto

SUT - Sulfametoxazol-Trimetropim

TET - Tetraciclina

Tris - Tris-hidroximetilaminometano (2-amino-2-(hidroximetil)propano-1,3-diol)

UGRHI – Unidades de Gerenciamento de Recursos Hídricos

UV - Ultra violeta

µg - Micrograma

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura básica de uma enzima beta-lactamase.....23

Figura 2 - Estrutura básica de cefalosporinas e algumas cefalosporinas de primeira, segunda e terceira geração.....24

Figura 3 - Sítio de ação das beta-lactamases entre as ligações peptídicas 26

Figura 4 - Estrutura básica de quinolonas e algumas quinolonas de segunda e terceira geração..30

Figura 5 - Localização dos rios Tietê e Pinheiros no estado de São Paulo e distribuição de pontos de coleta de amostras de água para a realização do presente projeto 35

Figura 6 - Mapa do Estado de São Paulo apresentando a localização das UGRHI`s 37

Figura 7 - Técnica da Membrana Filtrante modificada 38

Figura 8 - Gráfico representativo da biodiversidade das enterobactérias identificadas.....45

Figura 9 - Porcentagem de isolados resistentes a cada um dos antibióticos testados durante o estudo 46

Figura 10 - Teste fenotípico para triagem de ESBL (*Extended-Spectrum Beta-Lactamase*) 48

Figura 11- CIM – CTX = Concentração Inibitória Mínima do antibiótico Cefotaxima 48

Figura 12 - Perfil obtido por ERIC-PCR de *Klebsiella pneumoniae* carregando o gene *qnr* *bla*$_{CTX-M}$.....53

Figura 13 - Perfil obtido por ERIC - PCR de *Escherichia coli* carregando os genes *qnr* e/ou *bla*$_{CTX-M}$.....53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Descrição dos Pontos de Amostragem 36

Tabela 2 - Iniciadores específicos para determinantes de resistência às cefalosporinas em enterobactérias 41

Tabela 3 - Iniciadores específicos para determinantes de resistência a fluoroquinolonas em enterobactérias 41

Tabela 4 - Concentração Inibitória Mínima de antibióticos de uso clínico e veterinário para 135 cepas de enterobactérias analisadas 47

Tabela 5 - Porcentagem de genes de resistência encontrados em isolados com perfil de multirresistência 48

Tabela 6 - Perfil fenotípico e genotípico de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* produtoras de ESBL e com perfil PMQR 50

Tabela 7 - Resultado da Extração de Plasmídeos e Transformação Bacteriana 51

Tabela 8 - Perfil de virulência de cepas *Escherichia coli* 54

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 20

1.1 Antibacterianos 22

1.2 Antibióticos beta-lactâmicos/cefalosporinas.....23

1.2.1 Descoberta e desenvolvimento das cefalosporinas 24

1.2.2 Mecanismo de ação e Resistência aos antibacterianos 25

1.2.3Classificação ESBL.....28

1.3 Quinolonas/Fluoroquinolonas 29

1.3.1 Mecanismos de ação e Resistência 30

1.3.2 PMQR 31

2 OBJETIVOS 33

2.1 Objetivo geral.....33

2.2 Objetivos específicos.....33

3 MATERIAIS E MÉTODOS.....33

3.1 Amostras bacterianas 34

3.2 Isolamento e Identificação 37

3.3 Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos 39

3.4 Detecção de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) 40

3.5 Extração de DNA total bacteriano 40

3.6 Amplificação de genes de resistência aos antibióticos por PCR (Polymerase Chain Reaction) 40

3.7 Extração plasmideal 42

3.8 Transformação bacteriana 43

3.9 Avaliação da clonalidade por ERIC-PCR 43

3.10 Determinação do grupo filogenético de *E.coli* 44

4 RESULTADOS 45

4.1 Isolamento e identificação de Enterobactérias com fenótipo de resistência antibacteriana isoladas de amostras de ambientes aquáticos 45

4.2 Perfil de susceptibilidade aos antibacterianos dos isolados estudados 45

4.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....46

4.4 Genótipos de resistência 47

4.5 Caracterização de fenótipo e genótipos ESBL nos isolados estudados 48

4.6 Caracterização dos genótipos PMQR 49

4.7 Extração Plasmideal e Transformação Bacteriana 51

4.8 Tipagem molecular e análise de *cluster*.....51

4.9 Grupo filogenético de *E. coli*.....54

5 DISCUSSÃO 55

5.1 Fenótipos ESBL e PMQR 57

5.2 Genótipos de resistência 58

5.3 Triagem de ESBL 59

5.4 Triagem de PMQR 61

5.5 Extração de plasmídeos e transformação dos genes 63

5.6 Tipagem 64

5.7 Grupos filogenéticos de *E. coli*.....65

6 CONCLUSÕES 67

REFERÊNCIAS 68

ANEXO 1 – Artigo apresentado em congresso 79

1 INTRODUÇÃO

O amplo uso de antibióticos na medicina humana e na produção animal tem resultado no aumento do número de bactérias comensais e patogênicas resistentes a agentes antimicrobianos, o que vem se tornando um dos principais problemas de saúde pública (SORUM e ABÉE-LUND, 2002; RIVERA-TAPIA, 2003; KIFFER et al., 2005; SADER et al., 2001; DALLA-COSTA et al., 2003; GALES et al., 2003; PAVEZ et al., 2008; LINCOPAN et al., 2005; 2006; ZAVASCKI et al., 2005; DOYLE et al., 2011).

Bactérias resistentes aos antibióticos são encontradas em diferentes nichos ecológicos. Dentre esses nichos, o ambiente aquático é considerado o mais eficiente para a seleção de populações bacterianas resistentes, bem como para a troca de genes de resistência, por meio de elementos genéticos móveis (ALI ABADI e LEES, 2000; WEGENER e MOLLER, 2000; LU et al., 2010; LUBICK, 2011).

Dentre os agentes bacterianos mais frequentemente encontrados nestes ambientes destacam-se membros da família Enterobacteriaceae, os quais são importantes agentes de infecções relacionadas à assistência à saúde (IrAS) (MINARINI et al., 2007; 2008; 2009), o que torna o ambiente uma fonte para a disseminação e aquisição destas bactérias resistentes (ALLEN et al., 2010). De fato, tem sido reportado em revistas de alto impacto que, o aparecimento da resistência aos antibióticos no ambiente é relevante para a saúde humana devido à crescente importância de infecções zoonóticas, bem como a necessidade de investigar a emergência de patógenos resistentes (ALLEN et al., 2011; WALSH et al., 2011; LUBICK, 2011).

Nos últimos anos, devido ao crescimento acelerado da população e da urbanização, os ecossistemas aquáticos vêm sendo profundamente alterados em função de diversos impactos ambientais de origem antrópica, tais como: desvio do curso natural de rios, lançamento de efluentes domésticos e industriais não tratados, desmatamentos, mineração, eutrofização artificial, introdução de espécies exóticas e outros (GOURLART e CALLISTO, 2003).

No ambiente aquático, do ponto de vista sanitário, o que realmente põe em risco a saúde pública é a ocorrência de poluição fecal, pela possibilidade de estarem presentes também microrganismos patogênicos, como bactérias, vírus, protozoários e ovos de helmintos, agentes frequentemente responsáveis por doenças de veiculação hídrica (GELDREICH, 1998). Vários estudos têm demonstrado que infecções humanas, tanto intestinais como extra-intestinais, podem

ser causadas por microrganismos veiculados por águas contaminadas por fezes e urina. A possibilidade dos ambientes aquáticos servirem de reservatório a diversos microrganismos sustentando a sobrevivência dos mesmos nesses habitats, assume, em seu aspecto epidemiológico, considerável importância.

Outro problema que atinge o ambiente aquático é a contaminação por bactérias resistentes provenientes dos seres humanos e animais expostos a antibióticos (SHAKIBAIE et al., 2009; AL-BAHRY et al., 2009; GUSATTI et al., 2009; PRADO et al., 2008), seja pelo uso terapêutico ou pela ingestão acidental de alimentos contaminados com bactérias resistentes que poderiam colonizar transitoriamente hospedeiros, e/ou alimentos contendo resíduos de antimicrobianos com posterior eliminação pelas fezes que poderiam contaminar ambientes aquáticos através do esgoto (GUSATTI et al., 2009; PRADO et al., 2008; COSTA et al., 2006).

Com relação à ambientes aquáticos, o uso profilático de antibióticos na aquicultura tem se tornado comum, principalmente em países industrializados, onde não há regulamentação para o uso de drogas nestes ambientes (XI et al., 2009; SEIFRTOVÁ et al., 2009). Assim, muitos produtores ignoram que o uso indiscriminado de antibióticos proporciona, dentre os principais riscos, a seleção de bactérias resistentes no ambiente aquático; a alteração da microbiota dos ambientes de cultivo; e a transferência de resistência para bactérias potencialmente patogênicas aos seres humanos (HÖLMSTROM et al., 2003). Portanto, o uso de antibióticos na aquicultura deve ser controlado, a fim de se reduzir a disseminação de resistência entre bactérias patogênicas ou da microbiota comensal de peixes e de outros organismos cultivados, além de evitar o risco da presença de resíduos nos alimentos destinados ao consumo humano (BRUUN et al., 2003).

No Brasil, rios urbanos são frequentemente afetados por atividades antropogênicas. Em São Paulo, os rios Tietê e Pinheiros são um exemplo. O rio Tietê (o maior rio do Estado de São Paulo) nasce nos contrafortes ocidentais da Serra do Mar, a 840 metros de altitude, no município de Salesópolis, a apenas 22 Km do Oceano Atlântico. Dirigindo-se para o interior do Estado de São Paulo, no rumo sudoeste-noroeste, o rio Tietê percorre 1.100 quilômetros do território paulista, indo desaguar no rio Paraná, na divisa com Mato Grosso do Sul. Na Região Metropolitana de São Paulo, o rio Tietê e seus afluentes constituem a chamada Bacia Hidrográficas do Alto Tietê, que apresenta um quadro crítico de poluição de suas águas, que

percorrem a cidade de São Paulo e/ou o estado de São Paulo, englobando vários reservatórios ao longo de seu curso (SUARES ROCHA et al., 2010). Estes reservatórios são utilizados para prover água de consumo, como fonte para irrigação agrícola e como fonte de recreação (SUARES ROCHA et al., 2010). No entorno urbano, ambos os rios são conhecidos por serem altamente poluídos pela contaminação por efluentes industriais e domésticos, e por córregos urbanos que deságuam nos mesmos (SUARES ROCHA et al., 2010). Já o rio Pinheiros, recebe resíduos de muitos efluentes domésticos e industriais passando pela área metropolitana da cidade de São Paulo. Assim, dados de qualidade da água apontam níveis elevados de poluição, como resultado da enorme taxa de decomposição da matéria orgânica e industrial, constantemente despejada no seu leito. A água do rio Pinheiros apresenta temperatura elevada, alta concentração de poluentes, além disso, libera mau cheiro pela degradação anaeróbia, confirmada pela ausência de oxigênio dissolvido, o que a caracteriza como sendo anóxica (SMA 2002).

1.1 Antibacterianos

Os antibióticos agem como indutores para a expressão de genes bacterianos que codificam mecanismos de resistência a essas drogas (BUTAYE et al., 2003) favorecendo a seleção natural destas populações, seguindo o principio Darwiniano de sobrevida do mais forte. Assim, na presença de genes que codificam resistência, a seleção de uma população de microrganismos resistentes pode ser uma conseqüência da pressão decorrente do uso exacerbado de antibióticos, sendo que o poder de seleção é proporcional ao tempo de exposição das bactérias ao antibiótico (ALI ABADI e LEES, 2000).

No Brasil, como antecedente desfavorável, dados da ANVISA têm mostrado que o consumo anual de antimicrobianos em 2004 e 2005 excedeu 1200 toneladas (ANVISA 2006; LOCATELLI et al., 2011). Na data avaliada, o maior consumo correspondeu aos compostos da classe dos beta-lactâmicos reportando-se um elevado consumo de amoxicilina (390 toneladas), ampicilina (184 toneladas), cefalexina (163 toneladas), sulfametoxazol (133 toneladas), tetraciclina (45 toneladas), norfloxacina (38 toneladas), ciprofloxacina (30 toneladas) e trimetoprim (27 toneladas).

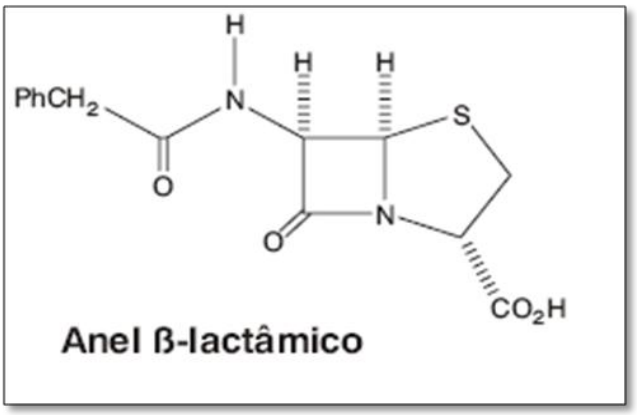
Locatelli e colaboradores (2011) avaliaram a presença de resíduos de antibióticos na Bacia do Rio Atibaia, o que confirma que, não há regulamentação para a diminuição do aporte

destes resíduos que entram no ambiente aquático, se tornando cada vez mais concentrados, uma vez que não são eliminados. Este trabalho mostrou que aspectos antropogênicos e sazonais afetam os níveis destes compostos nas amostras de água. Por exemplo, em períodos chuvosos a porcentagem de detecção de níveis de antibióticos, foi menor (LOCATELLI, et al 2011).

1.2 Antibióticos beta-lactâmicos/cefalosporinas

Antibióticos beta-lactâmicos são amplamente utilizados, pois possuem baixa toxicidade (sendo usados para tratar uma ampla gama de infecções), o que tem contribuído diretamente na emergência de resistência a estes antibióticos (LIVERMORE, 1995). Os mecanismos de resistência aos beta-lactâmicos incluem a dificuldade dos antibióticos atingirem suas enzimas alvo por impermeabilidade e/ou ativação de bombas de efluxo, e/ou a hidrolise direta por beta-lactamases (WALSH, 2011), que são enzimas com capacidade de romper o anel beta-lactâmico (Figura 1) inativando sua ação sobre as células bacterianas. Entre os antibióticos beta-lactâmicos, as cefalosporinas representam uma das classes mais utilizadas deste tipo de antibiótico.

Figura 1. Estrutura química de um beta-lactâmico

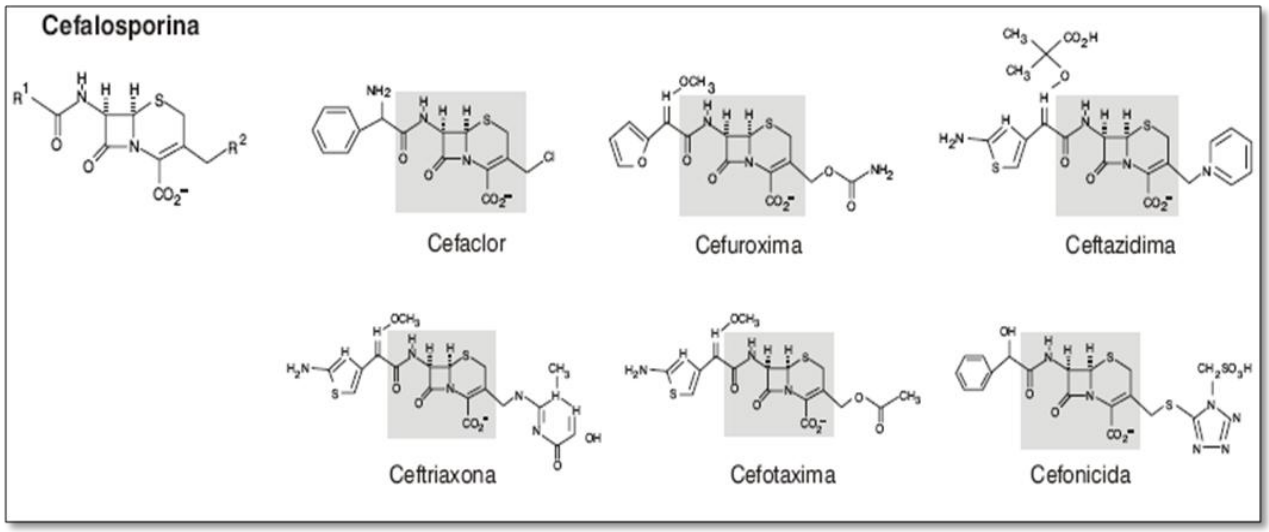


Fonte: Modificado de Rosário e Grumach, (2006).

As cefalosporinas (Figura 2) caracterizam-se pelo seu amplo espectro de ação no combate de uma ampla gama de infecções bacterianas, espectro que tem evoluido farmaceuticamente caracterizando cefalosporinas de primeira a quinta-geração (BUSH e JACOBY, 2010). De fato,

do ponto de vista microbiológico, a principal razão do uso excessivo de cefalosporinas é seu amplo espectro de atividade antibacteriana. Consequentemente, o crescimento da disseminação de cepas produtoras de beta-lactamase tem sido gradual em função do tempo e tipo de cefalosporina lançada no mercado.

Figura 2: Estrutura química das cefalosporinas



Fonte: Rosário e Grumach, (2006).

1.2.1 Descoberta e desenvolvimento das cefalosporinas

O *Acremonium cephalosporium*, que representou o ponto de partida para o descobrimento de todas as cefalosporinas, foi descoberto em 1948 na costa da Sardenha (Itália), por Joseph Brotzu (CORNAGLIA, 2000). A cefalosporina C foi isolada do caldo de cultura desse fungo. Além de ter uma modesta atividade antibacteriana, esta não foi produzida em grandes quantidades até a década de 60, quando foi descrito um novo procedimento a fim de obter o ácido 7-aminocefalosporânico. Este desenvolvimento abriu o caminho para a síntese de grande número de moléculas semi-sintéticas (Figura 2), e em 1964 as cefalosporinas de primeira geração (cefalotina e cefaloridina) chegaram ao mercado (BROTZU, 1948). Hoje, diferentes classes (ou "gerações") de cefalosporinas permitem uma classificação microbiológica destes compostos com base em seu espectro antibacteriano.

Cefalotina e cefaloridina foram introduzidos na prática clínica em 1964, seguido por cefazolina. A busca por novos derivados capazes de resistir à ação de beta-lactamases produzidas por bactérias gram-negativas levou à síntese da segunda geração de cefalosporinas. No início dos anos 70, foi relatado que algumas espécies de *Streptomyces* produtores de 7-alfametoxi cefalosporinas, também conhecida como cefamicina (p.ex. cefoxitina e cefotetan), caracterizava altos níveis de resistência à hidrólise feita pela maioria das beta-lactamases. Outros compostos deste grupo foram introduzidos na prática clínica, mas foram caracterizados pela presença de um anel cefêmico metoximínico (cefuroxima) ou um anel-thiomethyl-tetrazólio (cefamandol) na mesma posição C-7 (GILBERT et al., 1998). A produção contínua de novos compostos levou à descoberta de novos derivados menos hidrolisáveis pelas beta-lactamases, até o desenvolvimento da cefotaxima, a primeira cefalosporina de "Terceira geração" e, a primeira cefalosporina de "Amplo espectro". Cefotaxima se apresenta 100 vezes mais ativa do que o cefamandol sobre bactérias gram-negativas. Mudanças na posição da molécula C-3 foram os principais responsáveis para a melhoria das propriedades farmacocinéticas dessa droga (CORNAGLIA, 2000).

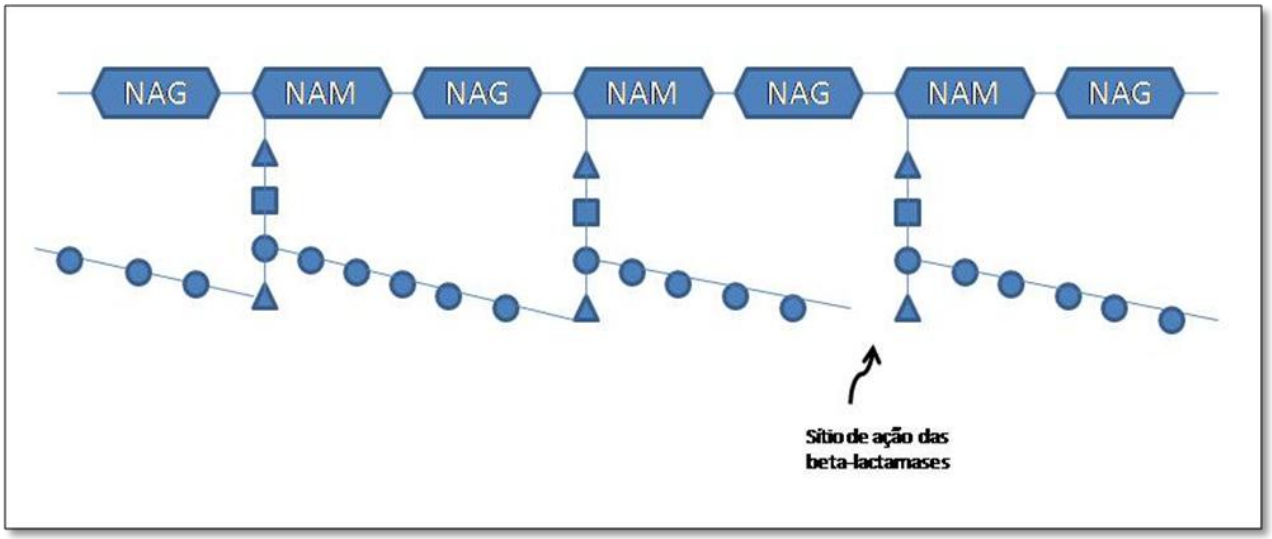
A busca por novos compostos não parou após a introdução de cefalosporinas de terceira geração na prática clínica e levou a síntese de compostos zwitteriônicos de quarta geração (cefepime e cefpiroma) caracterizados por um grupo de amônio quaternário na posição C-3. Cefalosporinas de quarta geração têm um espectro antibacteriano bastante semelhante ao de cefotaxima. Devido à sua natureza zwitteriônica, estes compostos atravessam muito rapidamente a membrana externa da célula bacteriana e são mal hidrolisados por beta-lactamases de classe C, intrínseca em algumas espécies) no espaço periplasmático (CORNAGLIA, 20000).

1.2.2 Mecanismo de ação e resistência aos antibacterianos

As cefalosporinas são uma classe de antibacterianos beta-lactâmicos que inibem a síntese da parede celular bacteriana interferindo na sua integridade, essencial para o crescimento e desenvolvimento bacteriano. O principal mecanismo de ação destes compostos ocorre na atividade da transpeptidase, na fase de biossíntese do peptideoglicano. As cefalosporinas contêm

em sua estrutura um anel beta-lactâmico (Figura 1), que interage com proteínas denominadas PBPs (*Penicillin-Binding Proteins*), inibindo a enzima envolvida na reação de transpeptidação, responsável pela ligação entre as cadeias de tetrapeptídeos do peptideoglicano. Assim, não é possível a formação das ligações entre os tetrapeptídeos de cadeias adjacentes de peptideoglicano (Figura 3), causando perda de rigidez da parede celular (TRABULSI e ALTHERTHUM, 2008).

Figura 3: Sítio de ação das beta-lactamases entre as ligações peptídicas



Fonte: FONTES, 2011

Com relação à resistência aos antibacterianos, entre as bactérias da família Enterobacteriaceae, a produção de beta-lactamases é o mais importante mecanismo de resistência contra agentes beta-lactâmicos (JACOBY e MUNOZ-PRICE, 2005; SANDERS e SANDERS, 1992). Membros da família Enterobacteriaceae comumente expressam beta-lactamases de espectro restrito, porém, o uso indiscriminado de antibióticos tem levado à emergência e disseminação de beta-lactamases de amplo espectro, codificadas por plasmídeos, que conferem resistência às penicilinas e cefalosporinas de amplo espectro, muitas vezes utilizadas em esquemas terapêuticos em humanos e animais (BUSH et al., 1995; LIVERMORE, 1995).

Em 1983, um grupo de enzimas nomeadas de beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs) foi detectado em cepas de *Serratia marcescens* e *Klebsiella pneumoniae* na Alemanha (KNOTHE et al., 1983). Este grupo de enzimas foi primeiramente referido como resultado de genes presentes em plasmídeos, como o TEM-1, TEM-2 e SHV-1, os quais sofreram mutações semelhantes, resultando em substituições no aminoácido terminal e no sítio ativo destas enzimas. Estas alterações (mutações) modificam estruturalmente o sítio ativo da enzima, causando aumento de sua ação sobre as cefalosporinas. Como resultado, sua ação não se restringe apenas às penicilinas e cefalosporinas de primeira e segunda geração, mas, também, sobre as oxiamino-cefalosporinas (cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona) e monobactans (aztreonam) (STÜRENBURG e MACK, 2003).

As ESBLs, geralmente podem ser bloqueadas por inibidores de beta-lactamases, como por exemplo, o clavulanato, sulbactam e tazobactam. Além disso, as bactérias produtoras de beta-lactamases de espectro estendido também apresentam resistência a outras drogas não-beta-lactâmicas, o que causa dúvidas quanto à conduta terapêutica para estes casos (WARREN et al., 2008; MARRA et al., 2006; DHANJI et al., 2010).

Infelizmente, a utilização indiscriminada e sem critérios destes antibacterianos, também tem favorecido a seleção de bactérias produtoras de ESBLs, que conferem resistência a estes agentes (MEDEIROS, 1997). A primeira mutação observada na produção de ESBLs foi a enzima SHV-2, que foi encontrada em uma cepa de *Klebsiella ozaenae*, isolada na República Federal da Alemanha, em 1983 (LIVERMORE, 1995). A partir destes primeiros achados, o isolamento destas bactérias que carregam esses genes de resistência vem se tornando cada vez mais comum, inclusive em animais, alimentos contaminados e ambientes aquáticos. Além disso, tem sido encontrado em diversos gêneros de enterobactérias, como em *Escherichia, Klebsiella, Proteus*, e também em bacilos gram-negativos não-fermentadores de glicose, como a *Pseudomonas aeruginosa* (AMBLER, 1980).

O método mais utilizado para triagem de ESBL é aproximação de discos que consiste em dispor discos de cefalosporinas (cefotaxima, ceftazidima, cefoxitina e cefepime), além de aztreonam a aproximadamente 25 mm de distância, centro-centro, do disco com inibidor (clavulanato, tazobactam, sulbactam) (CARTER, 2000). O sinergismo indica a produção de ESBL (RADICE, 2002). A zona de sinergismo é comumente denominada de “zona fantasma”. A

utilização de fitas comerciais de E-test ESBL (BioMérieux, Marcy l'Étoile, France) também são utilizadas para triagem e/ou confirmação do fenótipo de ESBL, no qual a queda de pelo menos três vezes na Concentração Inibitória Mínima (CIM) do antibiótico quando o mesmo é associado a um inibidor indica a produção de ESBL (FERNANDES, 2009).

1.2.3 Classificação ESBL

Hoje, mais de 370 variantes naturais de ESBLs diferentes são conhecidas atualmente no mundo todo (STÜRENBURGet al., 2005). Estas enzimas pertencem filogeneticamente à classe de beta- lactamases denominadas "*Serine-Beta-Lactamases*" que, juntamente com as "*Metallo-Beta-Lactamases*", formam os dois grandes grupos de enzimas que possuem a capacidade de degradar antibióticos beta-lactâmicos (SHAH et al., 2004).

A relação entre as enzimas ESBLs foi mais bem representada pelo esquema de classificação de Ambler, baseada na similaridade entre as seqüências de aminoácidos também conhecida como classificação molecular. Esta classificação baseia-se na seqüência de aminoácidos e nucleotídeos destas enzimas (AMBLER et al., 1991).

Atualmente, há 04 classes moleculares conhecidas (A, B, C e D). As classes A, C e D agem através do mecanismo baseado nas "Serinas", enquanto a classe B ou *Metallo-beta-lactamases* necessitam de Zinco (Zn) para sua ação. A maioria das bactérias produtoras de ESBLs estão contidas na classe molecular "A" de Ambler (AMBLER, 1980), caracterizadas pela presença do sítio ativo "*Serina*".

Outro esquema de classificação muito utilizado é o modelo descrito por Bush-Jacoby-Medeiros (BUSH K. et al., 1995; BUSH, 2001) que recentemente apresentaram uma atualização do esquema de classificação, no qual dividiram as enzimas em 4 grandes grupos (1, 2, 3 e 4) e subgrupos (a, b, c, d, e, f) (BUSH et al.,1995; BUSH, 2001; BUSH e JACOBY, 2010).

O grupo 01 no esquema de Bush-Jacoby-Medeiros é formado por cefalosporinases (beta-lactamases) que não sofrem inibição pelo ácido clavulânico, e que pertencem à classe molecular C de Ambler. O grupo 02 são penicilinases e/ou cefalosporinases (beta-lactamases) que sofrem inibição pelo ácido clavulânico, também pertencentes às classes moleculares A e D de Ambler. O

grupo 03 são enzimas que possuem no seu sítio ativo a necessidade de Zinco (Zn) para exercerem seu efeito, e por esse motivo são chamadas de "*Zinco-beta-lactamases*" ou simplesmente "*Metallo-beta-lactamases*", e correspondem à classe molecular B de Ambler. E finalmente existe o grupo 04, onde se localizam as penicilinases (beta-lactamases) que não são inibidas pelo ácido clavulânico e ainda não estão inseridas em um grupo molecular definido (SHAH et al., 2004; BUSH e JACOBY, 2010).

1.3 Quinolonas/Fluoroquinolonas

As quinolonas/fluoroquinolonas são um grupo de antibacterianos sintéticos, cujo espectro de atividade é focado em bactérias gram-negativas, mas vem se expandindo sobre gram-positivos, anaeróbios e micobactérias.

Atualmente, outro problema de importância epidemiológica no Brasil é a emergência de cepas resistentes às fluoroquinolonas (MINARINI et al., 2008; CASTANHEIRA et al., 2007), lembrando que antibióticos como ciprofloxacina e enrofloxacina são amplamente utilizadas para terapia de infecções clínicas humanas e veterinárias, respectivamente, e até mesmo utilizados como promotores de crescimento (THORSTEINSDOTTIR et al., 2009). Os antibióticos da classe das fluoroquinolonas apresentam potente atividade contra grande número de bactérias gram-positivas e gram-negativas, e como resultado de seu amplo espectro de ação, as fluoroquinolonas têm sido prescritas como terapia empírica em muitos casos de infecção humana e animal (HURST et al., 2002).

Na década de sessenta do século passado foi introduzido na prática clínica o ácido nalidíxico (primeira quinolona usada como antimicrobiano) (Figura 4). No entanto, a importância deste grupo reside nas mudanças ao final de 1970 quando criaram um grande número de agentes antibacterianos.

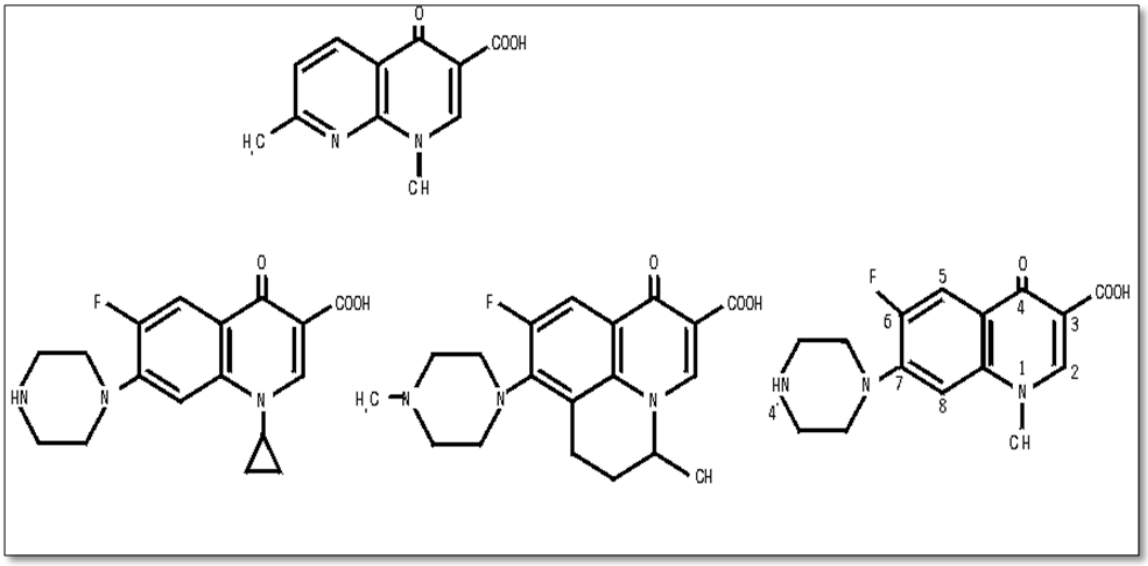
A primeira geração (ácido nalidíxico, ácido pipemídico), pouco utilizado hoje em dia, tem atividade contra a família bacteriana Enterobacteriaceae e alguns outros gram-negativos e são praticamente inativos contra bactérias gram-positivas, anaeróbios e atípicos (BOLON, 2011).

Embora muitas substituições tenham sido realizadas com o propósito de expandir a atividade contra diversos patógenos, o uso clínico de quinolonas de segunda geração

(norfloxacina) (Figura 4) permaneceu limitado pelo seu restrito espectro de atividade, (APPELBAUM e HUNTER, 2000).

Em meados da década de 80, foi lançada a ciprofloxacina (primeira fluoroquinolona, com amplo espectro de atividade) (Figura 4), desde então, surgiram outras quinolonas, cuja adição de flúor levou à classificação de seus compostos como fluoroquinolonas (ciprofloxacina, ofloxacina, levofloxacina). Em virtude da emergência da resistência bacteriana às gerações anteriormente citadas, iniciou-se o desenvolvimento de novas quinolonas, caracterizando a quarta geração (moxifloxacino) desses compostos com a adição de um grupamento metoxi (APPELBAUM e HUNTER, 2000; BOLON, 2011).

Figura 4: Estrutura básica de quinolonas/fluoroquinolonas



Fonte: Modificada de Jackson et al., 1998.

1.3.1 Mecanismos de ação e Resistência

As quinolonas associam-se às enzimas DNA gyrase e Topoisomerase IV, impedindo o enovelamento da molécula de DNA, tendo efeito bactericida. Mutações no sítio ativos destas enzimas (DNA gyrase e Topoisomerase IV) constituíam o principal mecanismo de resistência às quinolonas. A atividade antimicrobiana de fluoroquinolonas é baseada na inibição das topoisomerases, enzimas heterotetraméricas compostas por duas subunidades A e B

respectivamente codificadas pelos genes *gyrA* e *gyrB* na DNA girase e pelos genes *parC* e *parE* na topoisomerase IV (NAKAMURA, et al., 1989; PAN e FISHER, 1996; KIM, et al., 2010).

Até 1998, todos os mecanismos conhecidos de resistência às quinolonas eram cromossomal, porém, a partir daí, resistência à quinolonas mediada por plasmídeos, PMQR tem sido descritas (JOHNSON, et al, 2008; ROBICSEK, et al, 2006; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, et al, 2008).

Desde a introdução do ácido nalidíxico em 1960, o antibiótico ciprofloxacina é considerado, entre a classe das quinolonas o agente antimicrobiano mais consumido em todo o mundo (ACAR e GOLDSTEIN, 1997; CHENIA e PILLAY, 2006). O seu alto consumo, somado aos erros em seu emprego na terapêutica, tem sido considerado fatores responsáveis pelo rápido desenvolvimento da resistência bacteriana a esta classe de antibióticos (NAHEED et al., 2004; BIEDENBACH et al., 2006).

1.3.2 PMQR

Determinantes de resistência do tipo PMQR incluem: as proteínas Qnr (QnrA, QnrB, QnrS, QnrC e QnrD), que protegem a DNA girase e topoisomeraseIV da inibição por quinolonas; a variante de aminoglicosídeo acetiltransferase aac(6')-lb-cr, capazes de acetilar e subsequentemente reduzir a atividade de norfloxacina e ciprofloxacina, e; as recentemente descritas bombas de efluxo, proteína QepA, envolvidas na expulsão das fluoroquinolonas para fora da células bacterianas (PÉRICHON,et al, 2007; YAMANE, et al, 2007; CATTOIR e NORDMANN, 2009; CAVACO, et al, 2009; MARTINEZ-MARTINEZ, et al, 2008).

Genes do tipo *qnr* foram descobertos em 1998, e foram associados com a produção de pentapeptídeos repetidos que protegem a enzima DNA gyrase da ação desta classe de quimioterápicos, ligando-se ao sítio ativo da enzima em vez de se ligarem ao DNA. Estes genes foram encontrados em plasmídeos.

A integração dos genes *qnr* em diferentes plasmídeos proporcionou a rápida disseminação desse mecanismo de resistência às quinolonas. O surgimento e a propagação de resistência às quinolonas dependem do patógeno (que é mais ou menos sensível), do antibiótico (que é mais ou

menos ativo), do local da infecção e da carga bacteriana (a mais elevada carga bacteriana, a maior probabilidade de surgimento e seleção de mutantes resistentes), da integridade dos mecanismos de defesa do hospedeiro, e da dose utilizada (adequada ou baixa), entre outros fatores.

Além dos genes *qnr*, a resistência a quinolonas mediada por plasmídeos (PMQR) pode ser devido à inativação de fluoroquinolonas por uma transferase, *aac-(6 ')-Ib-cr*, que leva à acetilação das moléculas de fluoroquinolonas, tornando-as inativas. O gene *aac-(6 ')-Ib-cr* é uma subvariante de uma outra acetilase, *aac-(6 ')-Ib* aminoglicosídeo acetiltransferase, com duas mutações pontuais que permitem a ligação aoo sítio ativo da molécula, com posterior acetilação de forma similar ao que ocorre com canamicina e amicacina (VETTING et al, 2008; ROBICSEK, 2006; WARBURG et al, 2009).

A aquisição e disseminação de genes de resistência às cefalosporinas de amplo espectro e fluoroquinolonas, apresentam-se como um grave problema de saúde pública, uma vez que o meio aquático pode constituir uma fonte potencial para a mobilização destes genes de resistência e a disseminação das bactérias com perfil de multirresistência. Este panorama, requer a implementação de controle principalmente na redução dos resíduos de antibacterianos que são despejados diretamente nos ambientes aquáticos, assim como o esgoto comunitário e hospitalar.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a disseminação de enterobactérias, com perfil de resistência aos antibióticos em ambientes aquáticos do estado de São Paulo, investigando os genes envolvidos.

2.2 Objetivos específicos

- Isolar e identificar enterobactérias resistentes aos antibacterianos em ambientes aquáticos (estações de tratamento de esgoto, rios e represas).
- Caracterizar fenotipicamente a resistência aos antibióticos por métodos qualitativos (Kirby-Bauer) e quantitativos (CIM, concentração inibitória mínima);
- Caracterizar os genes de resistência aos antibióticos por PCR;
- Observar a ocorrência de plasmídeos, dentre os isolados resistentes aos antimicrobianos e sua associação com a mobilização de genes de resistência;
- Avaliar a similaridade genética através da técnica de ERIC-PCR e correlacionar sua disseminação clonal com o predomínio de fenótipos multirresistentes.

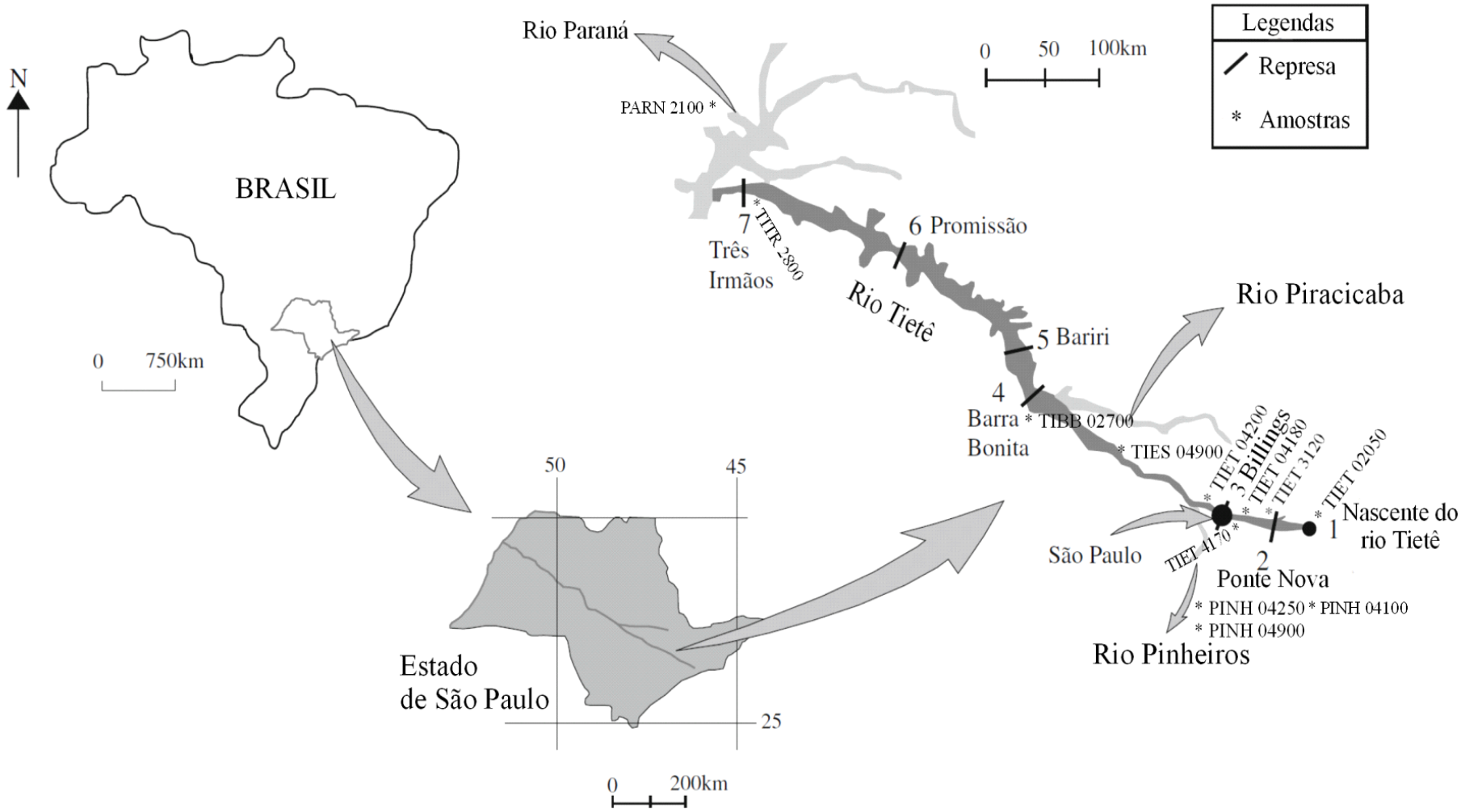
3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Amostras bacterianas

Um total de 135 cepas da família Enterobacteriaceae foram estudadas, sendo que 90 cepas foram isoladas das amostras de água coletadas no período de 2009 a 2010, nos Rios Tietê e Pinheiros com o auxílio da CETESB, e 45 cepas foram cedidas pelo Laboratório de Saúde Pública em Vigilância Sanitária localizado na Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo. Este último grupo são cepas previamente isoladas de Estações de Tratamento de Esgoto (ETE`s) de Barueri e Alphavile no Estado de São Paulo. Todas as cepas foram semeadas em Agar MacConkey e identificadas por série bioquímica (KONEMAN et al., 2001) e conservadas em glicerol 20%, Soro Fetal Bovino (-20°C) e TSA semi-sólido (1%).

Amostras de água (500 mL) com o apoio da CETESB, foram coletadas em ecossistemas aquáticos, tais como rios, represas, e estações de tratamento de esgoto no estado de São Paulo. Na figura abaixo está representada a localização simplificada dos locais onde foram coletadas as amostras de água, no caso dos rios urbanos (Figura 5).

Figura 5. Localização dos rios Tietê e Pinheiros no estado de São Paulo e distribuição de pontos de coleta de amostras de água .



Fonte: Modificada de Suares Rocha et al., 2010).

Na tabela 1. Representamos a descrição dos pontos de coleta das amostras de água dos rios Tietê e Pinheiros, de acordo com o código da CETESB, o local exato da amostragem e o Município.

Tabela 1.Descrição dos Pontos de Amostragem

*UGRHI**	Corpo Hídrico	Código CETESB	Local de Amostragem	Latitude S	Longitude W	Município
6	Rio Tietê	TIET2050	Ponte na Rodovia que Liga Mogi das Cruzes a Salesópolis (SP-88)	23 33 54	46 00 57	Biritiba Mirim
	Rio Tietê	TIET3120	A Jusante da ETE de Suzano	23 30 11	46 20 13	Suzano
	Rio Tietê	TIET4180	Ponte das Bandeiras, na Avenida Santos Dumont	23 31 18	46 37 52	São Paulo
	Rio Tietê	TIET4200	Ponte dos Remédios, na Avenida Marginal (Rodovia Presidente Castelo Branco)	23 31 11	46 44 47	São Paulo
	Reservatório Edgard de Souza	TIES4900	Próximo às Comportas da Barragem do Reservatório, após a Rede de Retenção de Aguapés	23 27 16	46 54 36	Santana do Parnaíba
	Rio Pinheiros	PINH4250	Na Ponte do Socorro	23 39 53	46 42 35	São Paulo
	Rio Pinheiros	PINH4900	Próximo à sua Foz no Rio Tietê, na Estrutura de Retiro	23 31 52	46 44 54	São Paulo
10	Reservatório de Barra Bonita	TIBB2700	No Meio do Corpo Central, na Direção do Córrego Araquazinho	22 32 39	48 26 48	São Manuel

UGRHI***:** Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos

Amostras de água foram retiradas de cada local (tabela 1) acondicionadas em frascos estéreis e transportadas sob refrigeração para o laboratório de Microbiologia do ICB-USP.

A figura abaixo (Figura 6) representa a localização das Unidades de Gerenciamento de Recursos Hídricos (UGRHI`s) nas quais foram realizadas as coletas de amostras de água.

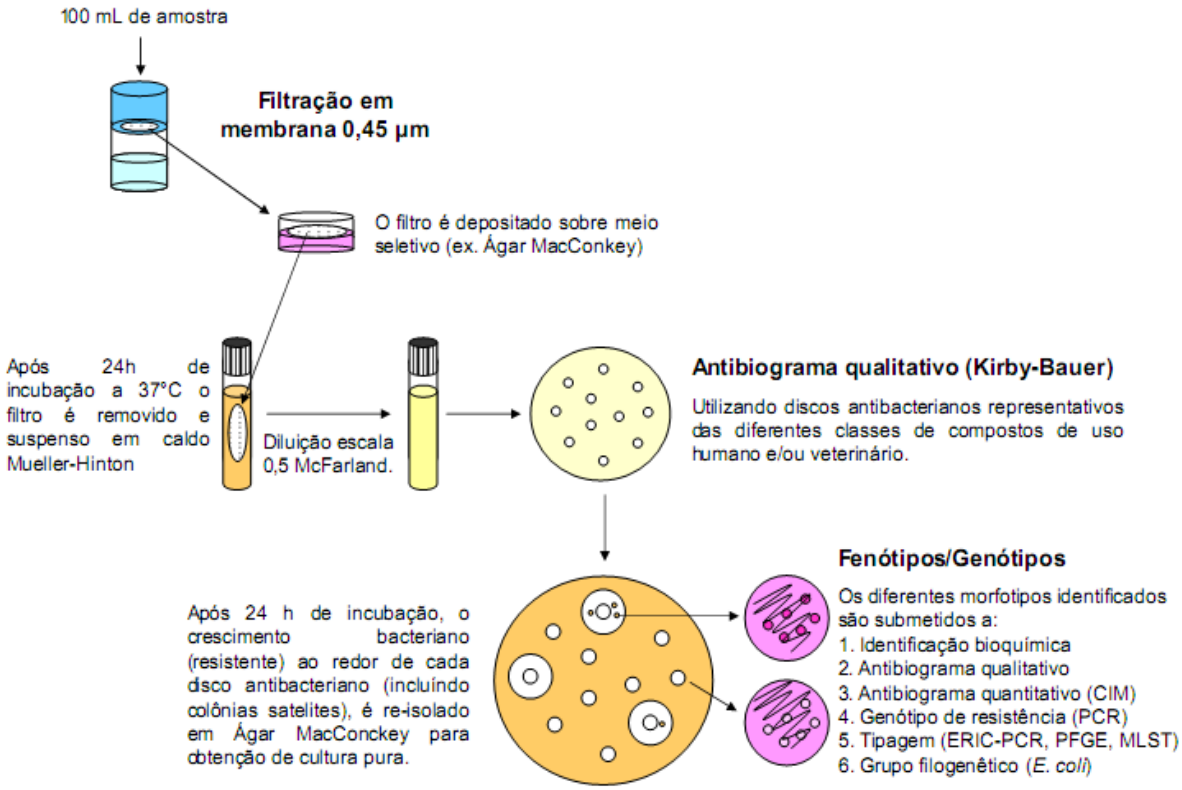
Figura 6: Mapa do Estado de São Paulo apresentando a localização das UGRHI`s (Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos).

Fonte: CETESB (www.cetesb.sp.gov.br)

3.2 Isolamento e Identificação

As amostras provenientes das Estações de Tratamento de Esgoto (ETEs) foram recebidas previamente isoladas. Por outro lado as amostras dos Rios foram filtradas no laboratório utilizando a técnica da membrana filtrante (APHA, 1998), modificada por Fontes e Lincopan, 2012 (no prelo), conforme esquema apresentado na figura 7, utilizando membranas (Millipore) com poros de 0,45µm para procedimento quantitativo visando à concentração da amostra. Após a filtragem, as membranas de nitrocelulose foram posicionadas em placas contendo meio de cultura (ágar MacConkey) e incubadas a 37° C por um período de aproximadamente 24 horas, a fim de obter apenas crescimento de bactérias gram-negativas. Deste modo, seguindo uma padronização própria mais apropriada para atingir os objetivos do presente estudo, as membranas contendo as bactérias foram transferidas para caldo Muller-Hinton, agitadas e em seguida, foi realizado teste simulando um antibiograma onde foram incluídas diferentes classes de antibacterianos.

Figura 7: Técnica da Membrana Filtrante modificada



Fonte: (Lincopan e Fontes, 2012) A* - filtragem a vácuo, utilizando membrana de nitrocelulose; B* - membrana Milipore transferida para tubo de ensaio; C*- tubo de ensaio contendo meio de cultura; D* - simulação de antibiograma; E* - Colônias satélites ao antibiótico são isoladas

A partir das colônias resistentes aos antibióticos testados e/ou observadas como colônias satélites aos halos de inibição foi feito posterior re-isolamento para obtenção de colônias isoladas. As placas semeadas foram incubadas a 37º C durante 24 horas. Após o período de incubação, a partir de colônias de diferentes morfotipos, foram obtidas culturas puras que foram submetidas aos testes bioquímicos convencionas (KONEMAN, 2001) para a identificação das espécies bacterianas e subseqüentemente, novos testes para avaliação da susceptibilidade aos antimicrobianos.

3.3 Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos

Foram realizados os antibiogramas utilizando o método de kirby-Bauer estabelecido pelo CLSI, para obter o perfil de resistência principalmente aos antibióticos da classe das cefalosporinas e quinolonas de terceira e quarta geração. Os isolados identificados obtidos das culturas puras foram submetidos à determinação do perfil qualitativo de resistência aos antibióticos, por meio do método de difusão em disco. Os discos foram concedidos pela Cefar (Sensifar-Cefar, Diagnóstica, São Paulo, Brasil) Vinte e sete antibióticos pertencentes a todas as classes foram selecionados para a realização do antibiograma. Os antibióticos selecionados para realização dos testes foram: ertapenem (10µg), levofloxacina (5µg), norfloxacina (10µg), cefalotina (30µg), ácido nalidíxico (30µg), amoxicilina/clavulanato (30µg), amicacina (30µg), ampicilina (32µg), cefepime (30µg), cefoxitina (30µg), cefotaxima (30µg), ceftazidima (30µg), cefuroxima (30µg), ciprofloxacina (5µg), cloranfenicol (32µg), enrofloxacina (2µg), estreptomicina (10µg), gentamicina (10µg), imipenem (10µg), ofloxacina, sulfametoxazol/trimetoprima (4µg) e tetraciclina (16µg), aztreonam (30µg), nitrofurantoína (300µg), tobramicina (10µg), canamicina (30µg). Foram utilizados, como controle de qualidade, as amostras de referência *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603). Para as bactérias que apresentaram perfil de resistência aos antibióticos testados, foi determinada a Concentração Mínima Inibitória (CLSI, 2009), utilizando a técnica de Disco difusão e depois usado fitas e-test para confirmação. Os testes de Concentração Inibitória Mínima (CIM) foram realizados pela técnica de diluição em Agar, seguindo as padronizações estabelecidas pelo CLSI para antibióticos beta-lactâmicos de interesse (CLSI, 2009).

Para determinar a Concentração Inibitória Mínima, os agentes antimicrobianos foram testados em uma faixa de concentração entre 0.03 – 512µg/ml. As diluições seriadas foram realizadas a partir de uma solução estoque em tubos contendo 19 mL de Agar Mueller Hinton (Merck, Darmstad- Alemanha) previamente esterilizados a uma temperatura entre 45 - 50° C. Uma vez estabilizados, 1 mL da solução do antimicrobiano com concentração 20 vezes superior para cada diluição testada foi adicionada aos 19 mL de Agar Mueller-Hinton. Após homogeneização, o conteúdo foi depositado em placas de petri estéreis de 90x15mm.

Para cada amostra, 10 µL de cultura crescida overnight foram cultivadas em 2 mL de caldo MH e incubadas a 37° C durante 2-3 horas para atingir uma turbidez equivalente a 0,5 na escala de MacFarland na fase de crescimento exponencial da bactéria. A seguir, 300 µL dessa suspensão foram transferidos para o replicador/inoculador de *Steers*. Desse modo, 1 a 3 µL de cada amostra foram inoculados simultaneamente em Agar Muller Hinton e incubadas por 18-24h. A CIM foi definida como a menor concentração de cada antimicrobiano capaz de inibir o crescimento bacteriano e foram interpretadas de acordo com os critérios de sensibilidade estabelecidos pela CLSI para a família Enterobacteriaceae (CLSI, 2011).

3.4 Detecção de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL)

Para avaliar a presença de ESBL foi feita uma triagem por meio do teste de dupla difusão com disco utilizando-se como substrato, ceftazidima (30 µg), cefotaxima (30 µg), ceftriaxona (30 µg) e aztreonam (30 µg). Os discos contendo antibióticos foram alinhados a uma distância de 2 cm de um disco único com o inibidor ácido clavulânico em uma concentração de 4 µg/mL.

Posteriormente, fitas de E-test foram utilizadas para confirmar a produção de ESBL.

3.5 Extração de DNA total bacteriano

O DNA de todas as cepas resistentes a pelo menos um antibiótico (n=135) foi extraído pelo método da fervura (CHAPMAN et al, 2001), que consistiu em aliquotar 2 ml de cultura bacteriana e centrifugá-la durante 3 minutos a 4000 rpm a 4° C. O precipitado foi ressuspendido em 100µl de água destilada estéril e submetido à fervura por 10 minutos e depois deixado em banho de gelo por 5 minutos. Em seguida, a suspensão foi centrifugada a 10000 rpm a 4° C e o sobrenadante contendo DNA foi aliquotado e armazenado a -20° C.

3.6 Amplificação de genes de resistência aos antibióticos por PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Bactérias que apresentaram resistência aos antibióticos de interesse foram submetidas à pesquisa dos principais genes de resistência pela técnica de PCR. Os iniciadores usados constam nas tabelas que se seguem.

Tabela 2: Iniciadores específicos para determinantes de resistência às cefalosporinas em enterobactérias

Gene alvo	Sequência do iniciador (5'- 3')	Pares de bases	Temp. de anelamento	REFERÊNCIAS
bla_{TEM}	F: GAG TAT TCA ACA TTT CCG TGT C R: TAA TCA GTG AGG CAC CTA TCT	861	51 ^{o}C	Baraniak, *et al.,* 2005
bla_{GES}	F: ATG CGC TTC ATT CAC GCA C R: CTA TTT GTC CGT GCT CAG	827	53 ^{o}C	Wachino et al., 2004.
bla_{PER}	F: GTA GTA TCA GCC CAA TCC CC R: CCA ATA AAG GCC GTC CAT CA	700	54 ^{o}C	Bauernfeind *et al.*, 1996
bla_{SHV}	F: ATG CGT TAT ATT CGC CTG TG R: GTT AGC GTT GCC AGT GCT CG	573	53 ^{o}C	Chen, *et al.,* 2006
bla_{CTX-M}	F: CGC TTT GCG ATG TGC AG R: ACC GCG ATA TCG TTG TG	544	56 ^{o}C	Edelstein *et al.*, 2003.
$bla_{CTX-M-2}$	F: ATG ATG ACT CAG AGC ATT CG R: TGG GTT ACG ATT TTC GCC GC	876	52 ^{o}C	Hopkins *et al.,* 2005.

Iniciadores para amplificação dos genes *bla (beta lactamases)*, seguidos do tamanho do fragmento amplificado esperado e temperatura ótima de anelamento.

Tabela 3: Iniciadores específicos para determinantes de resistência a fluoroquinolonas em enterobactérias

Gene alvo	Sequência do iniciador (5'- 3')	Pares de bases	Temp. de anelamento	REFERÊNCIAS
qnrA	F: ATT TCT CAC GCC AGG ATT TG R: GAT CGG CAA AGG TTA GGT CA	516	53 ^{o}C	Robicseket al., 2006
qnrB	F: GAT CGT GAA AGC CAG AAA GG R: ACG ATG CCT GGT AGT TGT CC	469	53 ^{o}C	Robicseket al., 2006
qnrS	F: ACG ACA TTC GTC AAC TGC AA R: TAA ATT GGC ACC CTG TAG GC	417	53 ^{o}C	Robicseket al., 2006
aac6-lb-	F: TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA R: AAACACGCCAGGCATTCGAG	482	55 ^{o}C	Park et al. (2006)

Iniciadores para amplificação dos genes *qnr (quinolon resistant) e aac6-lb*, seguidos do tamanho do fragmento amplificado esperado e temperatura ótima de anelamento.

Além desses iniciadores, foram usados iniciadores para a pesquisa dos genes dos isolados multirresistentes aos aminoglicosídeos (genes *aadA, aadB, aadD, aac6, ant2 e ant4*), tetraciclinas (genes *tetA e tetB*) e sulfametoxazol/trimetoprim (genes *sul1 e sul2*) (RIBEIRO, 2007).

Os genes de resistência foram pesquisados por PCR com volume final da reação 50 µL contendo: 100ng DNA; 10X PCR buffer [Tris-HCl (pH 8,4), 50mM KCl] (Fermentas, USA), 1,5mM $MgCl_2$ (Fermentas); 200µM de cada dNTP (Fermentas); 25pmol de cada iniciador, e 1U

de Taq DNA polimerase (Fermentas). O produto de PCR foi detectado após eletroforese em gel de agarose 1%, correndo em paralelo um marcador de DNA de peso molecular de3 kb (New England Biolabs, UK) . Foram utilizados controles positivos de cada gene para validar as reações de PCR.

Os genes alvos foram amplificados nas seguintes condições: 94°C por 5 minutos; 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, anelamento com temperatura específica para cada iniciador, por 30 segundos; e 72°C por 2 minutos para extensão; seguido de um passo de extensão final de 72°C por 5 minutos. Alíquota de cada produto amplificado foi aplicada em gel agarose 1% para ser submetido à eletroforese, correndo em paralelo um marcador de DNA de peso molecular (New England Biolabs, UK)

3.7 Extração plasmideal

Para extração de plasmídeos de resistência foi utilizada o método de lise alcalina descrita por Birnboim e Dolly (1979) que consistiu em aliquotar 3 mL de cultura overnight em caldo LB (*Lysogeny Broth*), alíquotas de 0,5 mL foram submetidas a centrifugação de 9000 giros durante 15segundos, o sobrenadante foi removido cuidadosamente e o sedimento ressuspenso em 100 µL de solução I (glicose 50mM, Tris-HCl 25 mM, EDTA 10 mM, Lizosima 20 mg/mL). Após incubação a 0° C por 30 minutos, foram adicionados 200 µL da solução II (0.2 N NaOH, SDS 1%) e misturados cuidadosamente em vórtex. Após 5 minutos de incubação a 0° C, 150 µL da solução III (Acetato de sódio 3 M, pH 4.8) foram adicionados e misturados por inversão para a precipitação do DNA cromossômico. O tubo foi incubado a 0° C por 60 minutos. Após a centrifugação a 9000 giros por 5 minutos, 400 µL do sobrenadante foram transferidos para um novo microtubo e precipitados com 1mL de etanol gelado. Após uma incubação a -20° C por 30 minutos, o precipitado foi coletado novamente após centrifugação a 9000 giros por 2 minutos. Posteriormente, o sedimento foi ressuspenso em 100µL de acetato de sódio 0,1M/Tris 0,05 M) e novamente precipitado com 200 µL de etanol gelado e incubado a -20° C por 10 minutos para ser coletado por centrifugação. Esta etapa foi repetida mais uma vez para finalmente o sedimento ser suspendido em 40 µL de água milli-Q (BIRNBOIM e DOLLY, 1979).

3.8 Transformação bacteriana

A técnica usada para a transformação bacteriana foi a descrita por Sambrook (1989) utilizando como cepa receptora do plasmídeo, ao invés da bactéria *E. coli* DH10B, a *E. coli* TOP10.

A mobilização genética dos genes determinantes da produção de ESBL e dos genes do tipo *qnr*, foi avaliada mediante ensaios de transformação utilizando a cepa *E. coli* Top 10 como linhagem receptora.

Cultura da linhagem receptora (TOP 10), em meio LB crescida por 18 horas foi aliquotada, 1 mL em 100 mL de meio LB e incubadas no *shaker*. Após 3 horas de incubação, a cultura foi submetida à centrifugação (2700 giros por 10 minutos a 4º C) e o *pellet* foi ressuspendido em 30 ml de solução contendo 80 mM de cloreto de magnésio e 20 mM de cloreto de cálcio. A suspensão foi novamente centrifugada nas mesmas condições da anterior e o *pellet* ressuspendido em 2 mL de cloreto de cálcio e aliquotado em *eppendorf*. Posteriormente, 5µl do plasmídeo extraído foi adicionado a 50 µl de suspensão de células competentes. A mistura foi submetida à incubação a 0º C por 30 minutos seguida de incubação em banho-maria a 42º C por 90 segundos e uma segunda incubação de 2 minutos a 0º C. Logo após as incubações, a suspensão foi plaqueada em meio Mueller Hinton contendo 0,8 µg/ml de cefotaxima para a aquisição de genes codificadores de beta-lactamases e 0,03 µg/ml de ciprofloxacina para possível transferência dos genes *qnr*. Para avaliar o sucesso da transformação, foi extraído DNA das linhagens *E. coli* TOP10 transformadas, e a confirmação da aquisição dos genes de resistência foi feita pela análise dos produtos de PCR-multiplex, contendo os genes em questão, além de verificar o tamanho do plasmídeo transferido.

3.9 Avaliação da clonalidade por ERIC-PCR

A análise de ERIC PCR é um método de tipagem baseado na amplificação de segmentos conservados presentes no DNA das Enterobactérias. As regiões conservadas do DNA das cepas em estudo foram amplificadas segundo a técnica de PCR, a partir de um *primer* único ERIC-2 (5'– AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG – 3') (SNEATH, 1973) específico para estes segmentos. A reação ocorreu nas seguintes condições: etapa de desnaturação inicial a 94º C por

10 min; etapa de amplificação com 30 ciclos de desnaturação à 94º C por 1 min, hibridação à 52ºC por 1 min, extensão à 72ºC por 8 min; extensão final a 72ºC por 16 minutos. A visualização dos segmentos foi obtida por eletroforese em gel de agarose 1,5%. A avaliação da clonalidade foi realizada a partir do perfil de amplificação obtido, utilizando o coeficiente de Dice numa tolerância de 0,5% que foram comparados mediante a construção de dendrograma utilizando o software Bionumerics (Applied Maths, Kortrijk, Belgium).Os perfis que apresentaram coeficiente de similaridade igual ou superior a 90% foram considerados clonais.

3.10 Determinação do grupo filogenético de *E.coli*

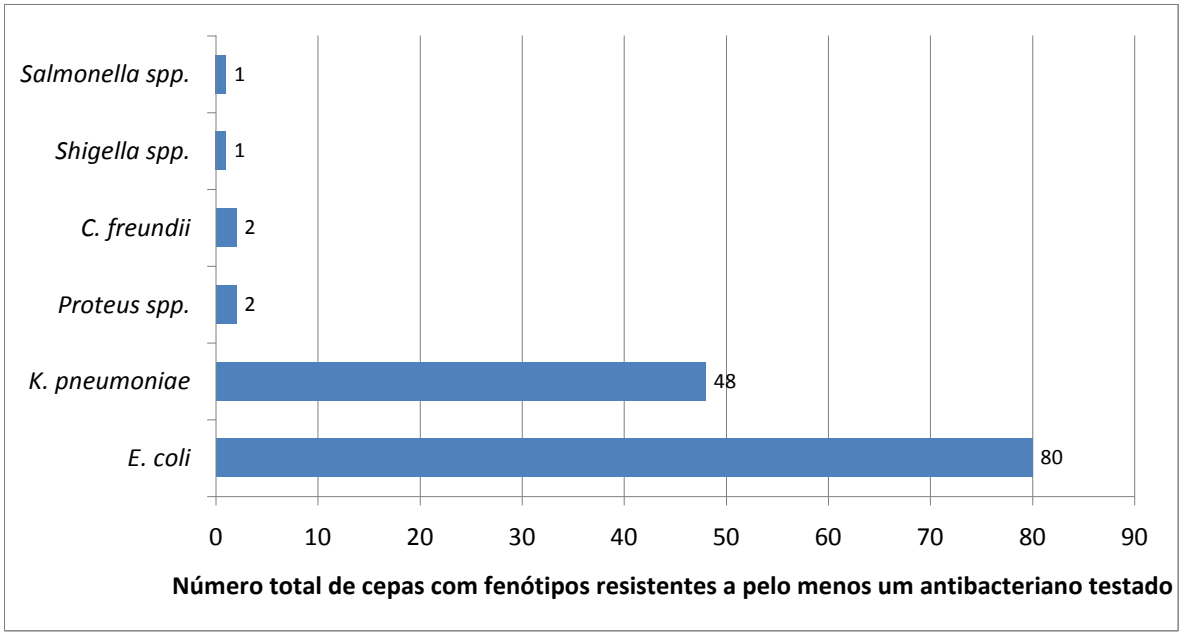
Para determinar a que grupo filogenético as linhagens de *E. coli* pertencem, foi realizado PCR nas seguintes condições: desnaturação por 5 minutos a 94° C; 30 ciclos de 30 segundos a 94° C, 30 s a 55° C, and 30 s a 72° C; e uma extensão final de 7 minutos a 72° C. Os iniciadores utilizados para amplificação dos genes foram ChuA.F (5′-GACGAACCAACGGTCAGGAT-3′) and ChuA.R (5′-TGCCGCCAGTACCAAAGACA-3′), YjaA.F (5′-TGAAGTGTCAGGAGACGCTG-3′) and YjaA.R (5′-ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC-3′), and TspE4C2.F (5′-GAGTAATGTCGGGGCATTCA-3′) e TspE4C2.R (5′-CGCGCCAACAAAGTATTACG-3′) (CLERMONT, 2000).

4 RESULTADOS

4.1 Isolamento e identificação de Enterobactérias com fenótipo de resistência antibacteriana isoladas de amostras de ambientes aquaticos

Uma análise da alta prevalência de *E. coli* (n=80), seguida de *K. pneumoniae* (n=48) está representada simplificadamente no gráfico abaixo (Figura 8). As bactérias foram identificadas por testes bioquímicos convencionais (KONEMAN, 2001). As outras bactérias identificadas não foram estudadas, visto que o número de isolados não foi significante e o foco foi de fato os fenótipos de resistência às quinolonas e cefalosporinas de amplo espectro.

Figura 8: Gráfico representativo da biodiversidade das enterobactérias identificadas.

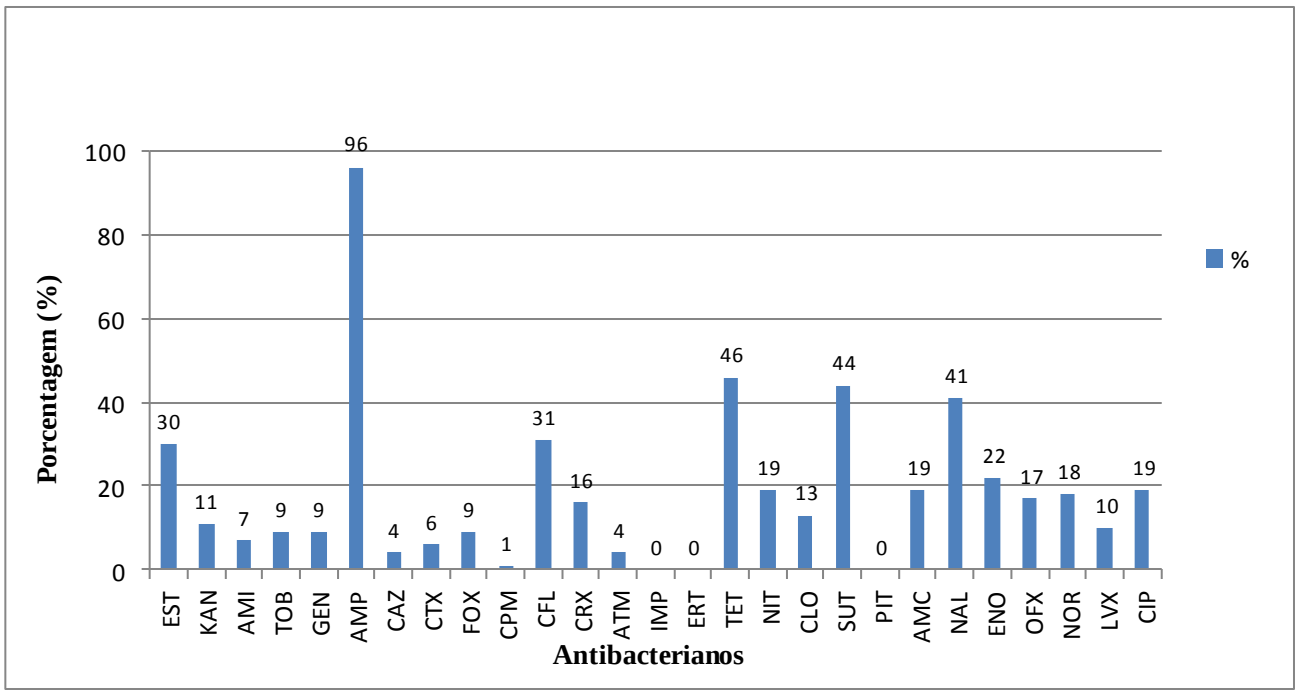


4.2 Perfil de susceptibilidade aos antibacterianos dos isolados estudados

Do total de 135 cepas da família Enterobacteriaceae recuperadas do ambiente aquático,resistentes a pelo menos um antibiótico testado (Figura 9), a freqüência foi: ampicilina (96%) seguido de tetraciclina (46%), sulfametoxazol/trimetoprim (44%), ácido nalidixico (41%),

cefalotina (31%) e estreptomicina (30%). Oitenta e sete (64%) isolados se mostraram multirresistentes, ou seja, resistentes a pelo menos três antibióticos de classes diferentes (MAGIORAKOS, et al., 2011). Além disso, não foi detectada resistência ao imipenem, ertapenem e piperacilina/tazobactam.

Figura 9. Porcentagem de isolados resistentes a cada um dos antibióticos testados durante o estudo.



EST (estreptomicina), KAN (canamicina), AMI (amicacina), TOB (tobramicina), GEN (gentamicina), AMP (ampicilina), CAZ (ceftazidima), CTX (cefotaxima), FOX (cefoxitina), CPM (cefepima), CFL (cefalotina), CRX (cefuroxima), ATM (aztreonam), IMP (imipinem), ERT (ertapenem), TET (tetraciclina), NIT (nitrofurantoína), CLO (cloranfenicol), SUT (sulfametoxazol-trimetopriml), PIT (piperacilina/tazobactam), AMC (amoxicilina/clavulanato), NAL (ácido nalidíxico), ENO (enrofloxacina), OFX (ofloxacina), NOR (nofloxacina), LVX (levofloxacina), CIP (ciprofloxacina).

4.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A Concentração inibitória mínima foi realizada pelo método de diluição em ágar para os antimicrobianos abaixo listados e fitas de E-test foram utilizadas para confirmação da CIM para

as PMQR-positivas e ESBL-positivas. Os valores da CIM encontrados para os antibióticos são representados na tabela 4.

Tabela 4: Concentração Inibitória Mínima de antibióticos de uso clínico e veterinário para 135 isolados de enterobactérias analisadas.

CLASSE DE ANTIBIÓTICOS	ANTIBIÓTICO	(*breakpoint* – CLSI, 2011)*	MIC_{90}	MIC_{50}
		μg/mL		
Aminoglicosídeos	Gentamicina	(≥16)	32	24
	Tobramicina	(≥16)	24	24
	Amicacina	(≥64)	12	2
	Kanamicina	(≥64)	512	512
Quinolona	Ácido Nalidíxico	(≥32)	64	32
Fluorquinolonas	Ciprofloxacina	(≥4)	32	32
	Levofloxacina	(≥8)	18	2
	Enrofloxacina	(≥4)	32	32
Sulfametoxazole	Sulfonamidas	(≥512)	≥512	≥512
Anfenicóis	Cloranfenicol	(≥32)	256	96
Tetraciclínas	Tetraciclina	(≥16)	4	2
Penicilina	Ampicilina	(≥32)	256	256
Cefalosporinas	Ceftazidima	(≥16)	12	8
	Cefotaxima	(≥ 4)	64	64
	Cefepime	(≥32)	512	512
	Ceftriaxona	(≥4)	256	256
Monobactâmico	Aztreonam	(≥16)	24	24

Isolados resistentes a antibióticos; MIC_{90} = Mínima concentração do antibiótico capaz de inibir o crescimento de 90% dos isolados; MIC_{50} = Mínima concentração do antibiótico capaz de inibir o crescimento de 50% dos isolados;*nd = não determinada; Enrofloxacina foi determinada pelo CLSI veterinário, 2008. *

4.4 Genótipos de resistência

Os isolados que apresentaram perfil de multirresistência aos antibióticos testados e valores de CIM igual ou acima do ponto de corte (*breakpoint*) foram submetidos à pesquisa dos genes de resistência. O resultado dessa pesquisa se encontra na tabela 5.

Tabela 5. Porcentagem de genes de resistência encontrados em isolados com perfil de multirresistência

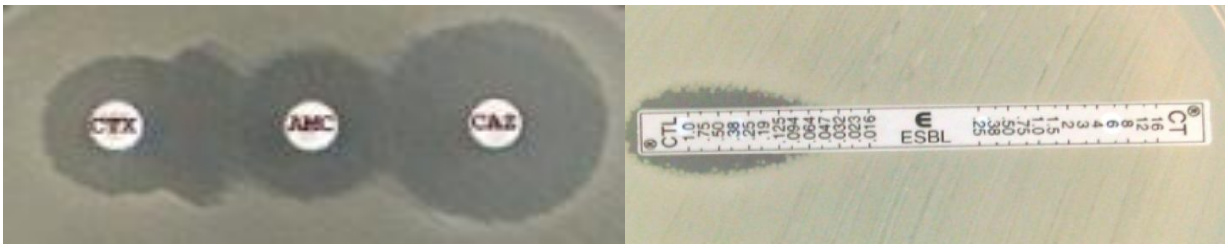
Antimicrobianos	N de isolados resistentes	Genes identificados (%)
EST	40	*aadA(35), aadB (27), aac6 (57) , ant2(2) , ant4(27)*
KAN	15	*aadA(20), aadB(13), aac6(20), ant2(6), ant4(40)*
AMI	9	*aadA(22), aadB(22), aac6(22), ant4(44)*
TOB	12	*aadA(33) aadB(33), aac6(50), ant2(8), ant4(25)*
GEN	12	*aadA(50), aadB(33), aac6(66), ant2(16), ant4(8)*
CAZ	5	*bla_{CTX-M-}-like, (40)bla_{TEM}-like (20), bla_{SHV}-like (20)*
CTX	8	*bla_{CTX-M}-like (62),bla_{TEM}-like (25), bla_{SHV}-like (50)*
FOX	12	*bla_{CTX-M-}-like (16),bla_{TEM}-like (16), bla_{SHV}-like (16)*
CPM	2	*bla_{CTX}(100), bla_{SHV}-like (100)*
CFL	42	*bla_{CTX-M}-like (14), bla_{TEM}-like (7), bla_{SHV}-like (12)*
TET	62	*tetA(14), tetB(8)*
SUT	60	*Sul1 (11) e sul2(6)*
ENO	30	*qnrB(23), qnrS(16)*
OFX	23	*qnrB(21), qnrS(21)*
NOR	24	*qnrB(20), qnrS (25)*
LVX	14	*qnrB(28), qnrS (14)*
CIP	26	*qnrB(23), qnrS (23)*

EST (estreptomicina), KAN (canamicina), AMI (amicacina), TOB (tobramicina), GEN (gentamicina), CAZ (ceftazidima), CTX (cefotaxima), FOX (cefoxitina), CPM (cefepima), CFL (cefalotina), TET (tetraciclina), SUT (clotrimoxazol), ENO (enrofloxacina), OFX (ofloxacina), NOR (nofloxacina), LVX (levofloxacina), CIP (ciprofloxacina)

4.5 Caracterização de fenótipo e genótipos ESBL nos isolados estudados

Com relação à detecção de ESBL, tanto os testes de combinação de discos (Figura 10) quanto E-test ESBL (Figura 11) detectaram a produção de ESBL em 12 isolados todos com a presença do gene *bla_{CTX-M}*-like. Dos 12 isolados CTX-M positivos, 11 foram do tipo CTX-M-2. Todas as cepas fenotipicamente multirresistentes foram testadas quanto ao genótipo de resistência pela técnica de PCR nos 12 isolados com fenótipo ESBL (tabela 4).

Figuras 10 e 11: Teste fenotípico para triagem de ESBL (*Extended-Spectrum Beta-Lactamase*)



CIM – CTX = Concentração Inibitória Mínima do antibiótico Cefotaxima.

4.6 Caracterização dos genótipos PMQR

Para avaliar o mecanismo de resistência às fluoroquinolonas, direcionamos a pesquisa para a caracterização dos genes *qnr*. A presença dos genes *qnr-like* foi confirmada em 10 isolados, segundo tabela 5. Além disso, a presença de gene *aac(6`)lb-cr* recentemente descrito, codifica uma acetiltransferase que inativa aminoglicosídeos e confere redução da sensibilidade à ciprofloxacina e norfloxacina (ROBICSEK, et al., 2006), foi confirmada em 2 isolados. O gene *qnrA* não foi encontrado em nenhum dos isolados, apenas *qnrB* e *qnrS*.

Tabela 6. Perfil fenotípico e genotípico de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* produtoras de ESBL e com perfil PMQR.

Amostra	Local de coleta	Perfil atb	Mecanismo	CIM-(µg/mL) CT/CTL	Genes
152 EC	TIET04200	EST, AMP, CAZ, CTX, CFL, CIP, OFX, ENO, NAL, NIT, TET	ESBL	*12/0,64*	$bla_{CTX-M-2}$
153 EC	TIET04200	EST, AMP, CIP, OFX, ENO, NAL, SUT, TET	ESBL	*16/0,064*	$bla_{CTX-M-2}$
150 EC	TIET03120	TOB, EST, AMP, CTX, CFL, CIP, LVX, NOR, OFX, ENO, NAL, AMC, SUT, CLO, TET, ATM	PMQR/ESBL	*16/0,064*	*qnrS,* bla_{CTX-M}
151 EC	TIET04180	TOB, EST, AMP, CTX, CFL, CIP, LVX, NOR, OFX, ENO, NAL, AMC, SUT, CLO, TET, ATM	ESBL	*16/0,019*	$bla_{CTX-M-2}$
42 EC	PINH04250	AMP, CAZ, CTX, CIP, NOR, OFX, ENO, NAL, SUT, TET, ATM	PMQR/ESBL	*12/0,064*	*qnrS,*
43 EC	PINH04250	EST, AMP, CIP, LVX, NOR, OFX, ENO, NAL, SUT, TET	PMQR	-	*qnrS,*
89 EC	TIES04900	AMP, CIP, NOR, OFX, ENO, NAL, SUT, TET	PMQR	-	$bla_{CTX-M-2}$
88 EC	TIES04900	EST, AMP, CIP, NOR, OFX, ENO, NAL, SUT, TET	PMQR	-	$bla_{CTX-M-2}$
102 EC	TIES04900	AMP, CIP, LVX, NOR, OFX, ENO, NAL, SUT, TET	PMQR	- *qnr*	*qnrS,*
121 EC	ETE	GEN, KAN, AMP, CFL, CIP, NOR, ENO, NAL, AMC, SUT, CLO, TET	PMQR	-	*qnrB, aac(6`)Ib-cr*
154 EC	TIET04200	TOB, EST, AMP, CTX, CFL, CIP, LVX, NOR, OFX, ENO, NAL, AMC, SUT, CLO	ESBL	16/0,64	$bla_{CTX-M-2}$
190 EC	ETE	EST, AMP, FOX, CFL, CIP, LVX, NOR, OFX, ENO, NAL, SUT, TET, CTX	PMQR	-	*qnrB*
23 KP	PINH04900	EST, AMP, CAZ, CTX, CFL, CIP, LVX, NOR, OFX, ENO, NAL, SUT, NIT, ATM,	PMQR/ESBL	*16/0,047*	*qnrB,* $bla_{CTX-M-2}$
24 KP	PINH04250	AMP, CFL, LVX, ENO, NAL, AMC, CTX	PMQR/ESBL	*16/0,064*	*qnrB,* bla_{CTXM-2}
26 KP	TIET04170	AMP, CFL, SUT, NIT,CIP	PMQR	-	*qnrB,*
100 KP	TIES04900	GEN, TOB, AMI, KAN, AMP, CTX, CFL, CIP, ENO, NAL, NIT, ATM	ESBL	*16/0,19*	$bla_{CTX-M-2,}$
137 KP	TIES04900	AMP, CIP, NOR, NAL, CLO	PMQR	-	*qnrS*
14 KP	TIBB02700	AMP, FOX, CFL, CIP, NOR, ENO, NAL, AMC, SUT, TET	PMQR	-	*qnrB, aac(6`)Ib-cr*
99 KP	TIES04900	EST, AMP, FOX, CFL, CIP, LVX, NOR, OFX, ENO, NAL, SUT, TET, CTX, CAZ	ESBL	*16/0.125*	$bla_{CTX-M-2}$
61 KP	TIET02050	AMI, KAN, AMP, CAZ, CFL, LVX, ENO, NAL, SUT	ESBL	*16/0.064*	$bla_{CTX-M-2,}$
199 KP	ETE	EST, AMP, FOX, CFL, CIP, LVX, NOR, OFX, ENO, NAL, SUT, TET, CTX	PMQR	-	*qnrS*
18 KP	ETE	TOB, EST, AMP, CTX, CFL, CIP, LVX, NOR, OFX, ENO, NAL, AMC, SUT, CLO, TET	ESBL	*16/0.064*	$bla_{CTX-M-2}$

EST (estreptomicina), KAN (canamicina), AMI (amicacina), TOB (tobramicina), GEN (gentamicina), AMP (ampicilina), CAZ (ceftazidima), CTX (cefotaxima), FOX (cefoxitina), COM (cefepima), CFL (cefalotina), CRX (cefuroxima), ATM (aztreonam), IMP (imipinem), ERT (ertapenem), TET (tetraciclina), NIT (nitrofurantoína), CLO (cloranfenicol), SUT (clotrimoxazol), PIT (piperacilina/tazobactam), AMC (amoxicilina/clavulanato), NAL (ácido nalidíxico), ENO (enrofloxacina), OFX (ofloxacina), NOR (nofloxacina), LVX (levofloxacina), CIP (ciprofloxacina).

4.7 Extração Plasmideal e Transformação Bacteriana

A extração plasmidial foi realizada visando a obtenção de DNA plasmidial de todos os isolados que foram positivos para a produção de ESBL e com perfil PMQR.

A extração plasmideal foi realizada segundo protocolo de Birnboim e Dolly (1979) e subsequentemente foi realizado a transformação bacteriana dos plasmídeos dos isolados ESBL-positivo e *qnr*-positivos em cepas receptoras *E. coli* TOP10 seguindo a técnica descrita por Sambrook (1989).

Do total de 22 cepas ESBL- positivo e *qnr*-positivos, foi possível a extração plasmidial de 19 isolados bacterianos. A extração plasmidial foi confirmada correndo-se um gel 0.8% afim de visualizar as bandas contendo DNA. Bandas de vários tamanhos foram identificadas, assim como vários plasmídeos em um mesmo isolado.

A transferência plasmideal realizada pela transformação da cepa TOP10 foi realizada utilizando DNA plasmideal de 19 cepas, no entanto, apenas 15 foram transformados conforme tabela 7.

4.8 Tipagem molecular e análise de *cluster*

Em relação à avaliação da clonalidade, através de ERIC-PCR, feita por análise de *cluster* segundo coeficiente de DICE (0,5%), a análise dos perfis obtidos por ERIC-PCR de 10 isolados de *K. pneumoniae* $bla_{\text{CTX-M}}$ positivo e *qnr* positivo mostrou uma grande diversidade genética demonstrando que estas foram não clonalmente relacionadas (Figura 12),ou seja, a técnica de ERIC-PCR mostrou uma grande diversidade genética entre as cepas de *K. pneumoniae* enquanto doze isolados de *E. coli* $bla_{\text{CTX-M}}$ positivo, e *qnr* positivo foram agrupadas em nove *clusters*, mostrando uma similaridade apenas entre 3 isolados (Figura 13).

Tabela 7. Resultado da Extração de Plasmídeos e Transformação Bacteriana

CEPA (gene identificado)	Tamanho aproximado dos plasmídeos (Kb) identificados	TRANSFORMAÇÃO		
		E. coli TOP10 (*qnr* B +)	*E. coli* TOP10 (*qnr* S +)	*E. coli* TOP10 (bla_{CTX-M} +)
14 KP (*qnrB*)	42 kb	+	-	-
23 KP (*qnrB/*bla_{CTX-M})	42 kb, 35 kb, 24 kb, 2 kb	+	-	+
24 KP (*qnrB/*bla_{CTX-M})	42 kb, 35 kb	+	-	+
26 KP (*qnrB*)	42 kb, 35 kb	+	-	-
42 EC (*qnrS*, bla_{CTX-M})	25 kb	-	+	+
61 KP (*qnrS*, bla_{CTX-M})	42 kb, 35 kb, 14 kb	-	+	+
88 EC (*qnrS*)	25 kb	-	+	+
89 EC (*qnrS*)	25 kb	-	+	-
100 KP (*qnrS/*bla_{CTX-M})	48 kb, 42 kb, 35 kb	-	+	+
102 EC (*qnrS*)	25 kb	-	+	-
110 KP (bla_{CTX-M})	42 kb, 12 kb	-	-	+
137 KP (*qnrS*)	42 kb, 35 kb,	-	+	-
150 EC (*qnrB/*bla_{CTX-M})	25 kb	+	-	+
153 EC (bla_{CTX-M})	25 kb	-	-	+
154 EC(bla_{CTX-M})	12 kb	-	-	-
190 EC(*qnrB*)	>40 kb	-	-	-
152 EC(bla_{CTX-M})	12 kb, 4 kb	-	-	-
151 EC(bla_{CTX-M})	>40 kb, 25 kb	-	-	-
43 EC(*qnrS*)	25 kb, 1 kb	-	-	-
121 EC (*qnrB*)	Ni*	-	-	-
199 KP(*qnrS*)	Ni*	-	-	-
18 KP(bla_{CTX-M})	Ni*	-	-	-

*plasmídeo não identificado. EC (*E. coli*) e KP (*K. pneumoniae*).

Figura 12. Perfil obtido por ERIC-PCR de *Klebsiella pneumoniae* carregando o gene *qnr* ou bla_{CTX-M}

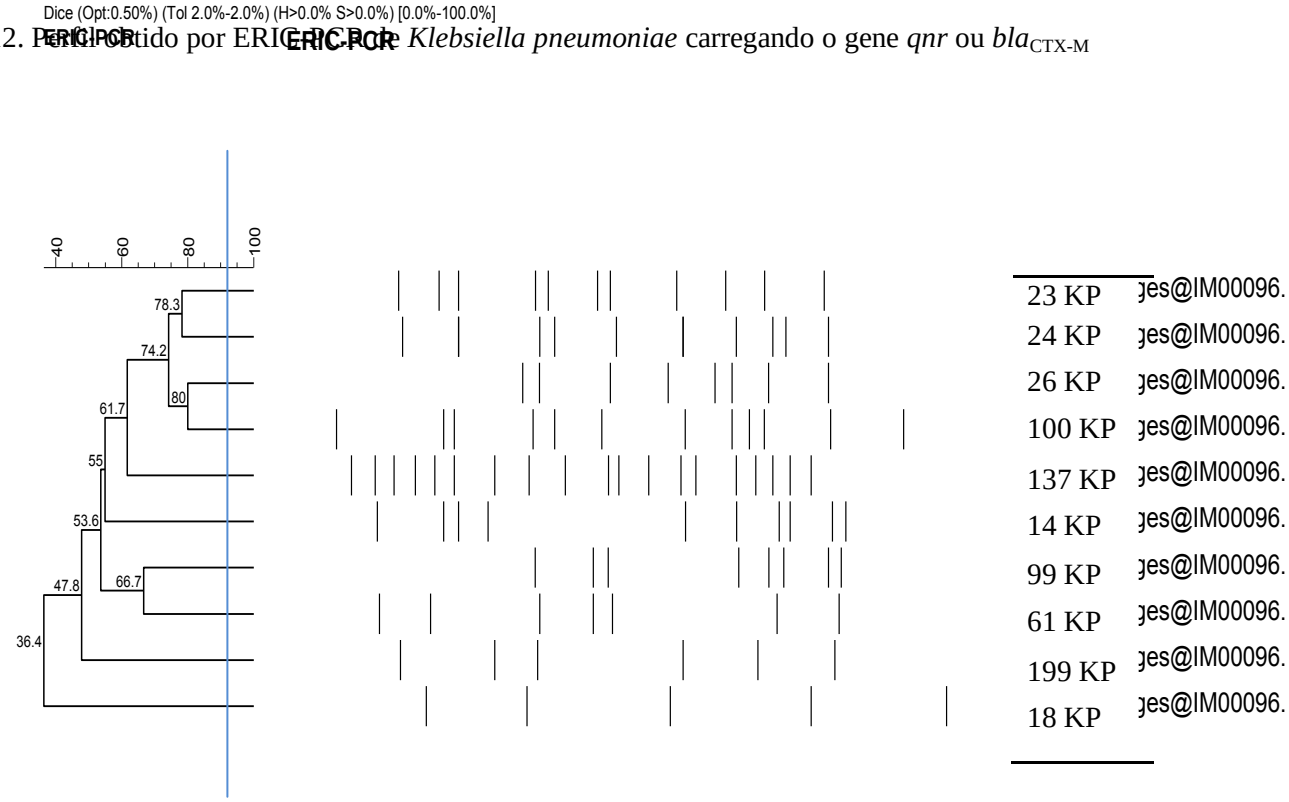
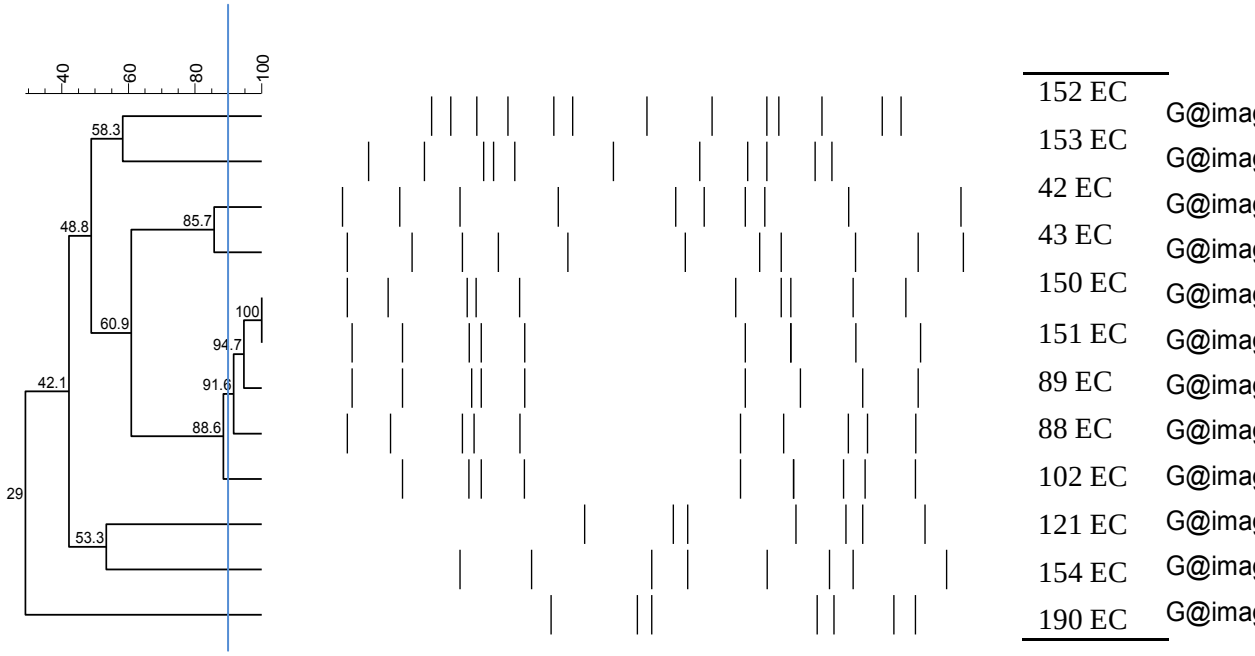


Figura 13. Perfil obtido por ERIC-PCR de *Escherichia coli* carregando o gene *qnr* ou bla_{CTX-M}



4.9 Grupo filogenético de *E. coli*

A análise filogenética tem demonstrado que as linhagens de *E. coli* podem ainda ser agrupadas em quatro principais grupos (A, B1, B2 e D), sendo que a maioria das linhagens capazes de produzir infecção pertencem ao grupo B2 e, em menor escala, ao grupo D, considerados de alta virulência. Por outro lado, linhagens comensais pertencem aos grupos filigenéticos A e B1, de baixa virulência. Assim para identificar esses diferentes grupos filogenéticos, Clermont et al. (2000) desenvolveram um método rápido baseado na identificação de três genes: *chuaA*, *yjaA* e *TspE4.C2*, gerando fragmentos de 279 pares de bases, 211 pares de bases e 152 pares de bases, respectivamente. A identificação destes genes permite elucidar se as cepas de *E. coli* são linhagens comensais (grupo filogenético A e B1) de baixa virulência ou se são linhagens patogênicas (grupo filogenético B2 e D) altamente virulentas.

Como representado na tabela 8, do total de 12 amostras de *E. coli* ESBL e/ou PMQR positivos, 8 pertenciam ao grupo A (de baixa virulência), 2 pertenciam ao grupo B1 (também de baixa virulência), ambos caracterizados como grupo de bactérias comensais. Por outro lado, 2 isolados foram agrupados no grupo D, descrito como altamente virulento e também referido como grupo de bactérias patogênicas.

Tabela 8. Perfil de virulência de cepas *Escherichia coli*

Amostra	Mecanismo	Virulencia	Genes
152 EC	ESBL	A	bla_{SHV}, $bla_{CTX\text{-}M\text{-}2}$
153 EC	ESBL	A	bla_{SHV},$bla_{CTX\text{-}M\text{-}2}$
42 EC	PMQR/ESBL	A	*qnrS,*
43 EC	PMQR	A	*qnrS,*
150 EC	PMQR/ESBL	D	*qnrS,* $bla_{CTX\text{-}M}$
151 EC	ESBL	D	bla_{SHV}, $bla_{CTX\text{-}M\text{-}2}$
89 EC	PMQR	A	$bla_{CTX\text{-}M}$, $bla_{CTX\text{-}M\text{-}2}$
88 EC	PMQR	A	bla_{SHV}, $bla_{CTX\text{-}M\text{-}2}$
102 EC	PMQR	A	*qnrS,*
121 EC	PMQR	B1	*qnrB*
154 EC	ESBL	A	$bla_{CTX\text{-}M\text{-}2}$
190 EC	PMQR	B1	*qnrB*

5 DISCUSSÃO

As bactérias são microrganismos ubíquos que podem adquirir genes de resistência, contaminando produtos alimentares, ambientes domésticos, colonizando animais de estimação e humanos (RIBEIRO, 2007). A água, sendo um hábitat importante para as bactérias, representa um veículo de disseminação destes genes e das entidades bacterianas associadas. Os resíduos de antibacterianos acabam atingindo os recursos hídricos, o que aumenta o risco do desenvolvimento de bactérias resistentes, além de eventuais impactos na biota aquática. Em países em desenvolvimento, os sistemas de coleta e tratamento de esgotos são precários e sem sistemas eficientes e seguros para tratamento de água. Isto se torna um grave problema de saúde pública com a urgente necessidade de uma ação conjunta para mudar esse panorama.

Principalmente no período de inundações, os esgotos transbordam, a disseminação das bactérias resistentes vai além destes ambientes e o problema aumenta. A incidência de infecções resistentes a drogas atinge níveis muito elevados e muitas vezes não sendo possível combatê-las com as drogas existentes. A cada ano, milhares de pessoas morrem no mundo todo em decorrência de infecções de bactérias que driblam até mesmo antibióticos recém-lançados (WALSH, et al., 2011). Há, portanto a necessidade urgente de se produzir novos medicamentos. Além disso, os sistemas de tratamento de água, em geral, não foram concebidos para eliminar traços de antimicrobianos ou composto quimicamente relacionados.

No Brasil, o uso indiscriminado de antibióticos tem atingido áreas além da clínica médica e veterinária, como o agronegócio e aqüicultura, isto tem resultado na emergência de bactérias resistentes amplamente disseminadas na comunidade e nos hospitais brasileiros, assim como no aparecimento de novos mecanismos de resistência (LINCOPAN *et al*., 2005; 2006; PAVEZ *et al*., 2008), tendo o ambiente como uma possível fonte de disseminação (BALSALOBRE *et al*., 2009) e com consequente risco para a transmissão de agentes de infecções relacionadas a área da saúde (FONTES et al., 2011).

Se por um lado a emergência de bactérias resistentes tem contribuído com um alto índice de morbidade e mortalidade no Brasil, por outro lado, tem afetado a qualidade e segurança de alimentos brasileiros direcionados ao consumo interno e à exportação (WARREN *et al*., 2008;

DHANJI et al., 2010) tendo adicionalmente um impacto ambiental (REGITANO et al., 2010; FUENTEFRIA, et al., 2011).

O controle da resistência a antimicrobianos tem se tornado prioridade em serviços relacionados à saúde. No Brasil, problemas endêmicos tem sido caracterizados nos diferentes serviços de saúde (DOYLE, et al, 2011), porém, no caso do ambiente os dados de resistência são escassos e restritos a algumas regiões (FONTES, et al., 2011; FUENTEFRIA, et al., 2011)

A resistência de Enterobactérias aos antimicrobianos tem sido relatada em diversos setores, demonstrando a necessidade de vigilância do panorama geral da resistência e de medidas de intervenção para um uso mais adequado dos antibióticos. Assim, com o intuito de contribuir com informação sobre o panorama da resistência em ambientes aquáticos no estado de São Paulo, monitoramos rios urbanos e estações de tratamento de esgoto.

No período de 2009-2010 foram processadas oito amostras de água coletadas de diferentes pontos, nos rios Tietê e Pinheiros. Adicionalmente, foram recebidas 45 isolados de enterobactérias recuperadas de amostras coletadas de ETEs, encaminhadas pelo laboratório de Saúde Pública da USP (Figura 5).

Nas amostras de rios urbanos, foram isoladas 90 espécies de enterobactérias resistentes pelo menos a um antibiótico testado, totalizando 135 isolados do ambiente aquático que foram caracterizados no presente estudo.

Os isolados apresentaram um perfil de multirresistência [i.e., resistência a pelo menos três antibióticos de diferentes classes, segundo a definição de Magiorakos e colaboradores (2011)].

Entre os isolados resistentes, foi confirmado o predomínio de *Escherichia coli* (n=80) seguido de *Klebsiella pneumoniae* (n=48).

Os fenótipos de resistência identificados mostram um comportamento diversificado das bactérias com relação à resistência aos antibacterianos. Foram encontradas cepas resistentes a todas as classes de antibacterianos, sendo altas as taxas de resistência para ampicilina (96%) seguido de tetraciclina (46%), sulfametoxazol/trimetoprim (44%), ácido nalidixico (41%), cefalotina (31%) e estreptomicina (30%). Por outro lado, não foram detectadas cepas resistentes a ertapenem, imipenem e piperacilina/tazobactam.

Um dado importante foi a identificação de isolados resistentes a cefalosporinas de amplo espectro e fluoroquinolonas, principalmente entre *E. coli* e *K. pneumoniae*, com resistência a cefotaxima (6%), ceftazidima (4%), cefoxitina (9%), cefepime (1%), cefalotina (31%) e ceftriaxona (16 %), ácido nalidíxico (41%), enrofloxacina (22%), ofloxacina (17%), norfloxacina (15%), levofloxacina (10%) e ciprofloxacina (19%).

Com relação aos valores da CIM, a interpretação foi baseada no CLSI 2011. Os isolados inicialmente caracterizados pelo método de Kirby-Bauer exibiram altos valores de CIM, alguns muito acima do ponto de corte como é o caso de cefotaxima (64 μg/mL), ciprofloxacina (32 μg/mL), canamicina (512μg/mL). Estes resultados nos levam a pensar que muito provavelmente, por atividades antropogênicas, existe uma descarga alta destes compostos ou produtos quimicamente similares com características de antimicrobianos nos locais de coletas das amostras de água, uma vez que os valores da CIM foram elevados. Além disso, a elevada CIM foi característica em isolados de diferentes pontos de coleta, o que nos leva a crer que a concentração desses compostos se distribui homogeneamente ao longo dos pontos de coleta dos rios. Independente do possível agente com atividade antimicrobiana ser específico para a expressão de um tipo de gene é importante lembrar que elementos de mobilização genética como plasmídeos carregam genes para resistência a desinfetantes como amônios quaternários, assim existe um ambiente que favorece a sobrevida e duplicação de plasmídeos contendo diversos genes de resistência, ou seja, pode existir a resistência cruzada no sentido de favorecer a disseminação e amplificação do elemento móvel carregando diversos genes.

Do ponto de vista de urgência epidemiológica e clínica, observamos a resistência à cefalosporinas de terceira e quarta geração e fluoroquinolonas, assim caracterizamos os possíveis mecanismos de resistência para ambas as classes de antibacterianos.

5.2 Fenótipos ESBL e PMQR

Ambos os testes, combinação de discos e E-test revelaram 12 amostras de enterobactérias produtoras de ESBL e 14 amostras com perfil PMQR. Todas as cepas foram recuperadas de ETEs e rios urbanos no Estado de São Paulo. Nos rios Tietê e Pinheiros os pontos de coleta positivos foram TIET 2050, TIET 3120, TIET 4180, TIET 4200, TIES 4900, PINH 4900 e TIBB 2700, que constam no mapa (Figura 5). Fenótipos ESBL positivos têm sido amplamente

identificados em bactérias gram-negativas isoladas de amostras clínicas de pacientes hospitalizados, porém, estudos nacionais têm mostrado a disseminação destes fenótipos para a comunidade (MINARINI et al., 2007). Um dado interessante, é que mesmo se tratando de amostras ambientais, a expressão do fenótipo ESBL nas cepas identificadas foi exacerbada uma vez que, era de se esperar que cepas ambientais não expressassem o fenótipo por não estarem expostas ao contato direto com o antibiótico, ou mesmo pelo efeito de diluição do mesmo no ambiente aquático. Assim, a marcada expressão do fenótipo ESBL nos isolados estudados revela que existe uma carga antibacteriana contínua no próprio ambiente aquático (LOCATELLI et al., 2011) ou existe uma descarga continua da bactéria resistente para o ambiente aquático, seja, a partir da própria comunidade ou de um ambiente hospitalar da região urbana.

5.3 Genótipos de resistência

Focamos a caracterização dos isolados de *K. pneumoniae* e *E. coli* que se mostraram multirresistentes aos antibióticos. A análise dos produtos de PCR confirmou a presença do gene $bla_{\text{CTX-M}}$ em todos os isolados produtores de ESBL, além da confirmação da presença de gene *qnr* em 10 dos 30 isolados resistentes a antibióticos fluoroquinolonas.

A pesquisa de genes que conferem resistência a aminoglicosídeos também foi realizada para todos os isolados, obtendo 54/135 cepas multirresistentes aos antibióticos aminoglicosídicos testados. Desses 54 isolados, 12 foram positivos para o gene *aadA*, 12 para o gene *aadB*, 27 para o gene *aaC6*, 2 para o gene *ant2* e 14 para o gene *ant4*. O gene *aadD* foi negativo para todas as 54 amostras. Além disso, durante a realização do trabalho, foi possível realizar o isolamento de uma *Pseudomonas aeruginosa* produtora de Metallo-Beta-Lactamase, do tipo SPM-1 co-produzindo uma metilase 16S ribossomal RmtD-1, e a partir deste isolado foi possível a publicação de um artigo em revista de alto impacto (FONTES ET. AL., 2011).

A realização da pesquisa de genes que conferem resistência a aminoglicosídeos foi feita de forma adicional à proposta original, uma vez que os resultados fenotípicos se mostraram muito interessantes. Além disso, foram encontradas cepas resistentes a todas as classes de antibióticos, exceto aos carbapenêmicos, sendo altas as taxas de resistência a ampicilina (96%) seguido de tetraciclina (46%), sulfametoxazol/trimetoprim (44%), ácido nalidixico (41%), cefalotina (31%) e

estreptomicina (30%). Estes antimicrobianos são antigos, alguns de uso veterinário, uso na aqüicultura (CARNEIRO, et al., 2007). Estes fatores poderiam parcialmente explicar a mais alta incidência de resistência a estes compostos.

Como citado anteriormente, além da resistência a cefalosporinas e fluoroquinolonas, mais de 80% das amostras de *E. coli* e *K. pneumoniae* apresentaram resistência a antibióticos de outras classes, incluindo, tetraciclinas, aminoglicosídeos e inibidores da via do folato, exibindo altos valores de CIM. Com relação a isso, os determinantes de resistência adicional podem estar localizados no mesmo elemento móvel que carrega os genes que codificam ESBLs e genes *qnr*, o que contribui para o fenótipo de multirresistência. Sob esse aspecto, elementos móveis, do tipo integron, tem sido frequentemente relacionados a fenótipos de multirresistência. Em contrapartida, a pesquisa de integrons não foi realizada nesse trabalho, e no futuro será digna de estudo.

A multirresistencia pode ser explicada devido ao fato de existirem integrons que carregam obrigatoriamente genes de resistência a sulfonamidas (i.e., classe 1). Estes integrons quando se inserem em plasmídeos, que também possuem genes de resistência aos antimicrobianos, tornam-se elementos que carregam mais de um gene de resistência. Essa multirresistência pode ser transferida a outras bactérias por mobilização horizontal dos genes (SHAKIBAIE ET AL., 2009).

Além de resistência a cefalosporinas, todas as cepas produtoras de CTX-M apresentaram resistência a antibióticos de várias classes, incluindo quinolonas, tetraciclinas, e aminoglicosídeos.

5.4 Triagem de ESBL fenótipo e genótipos

Um dos mecanismos de resistência mais comum e mais importante contra antimicrobianos beta-lactâmicos em microrganismos gram-negativos é a produção de beta-lactamases. Entre as beta-lactamases estão as conhecidas ESBLs (beta lactamases de espectro estendido), presentes principalmente em espécies da família Enterobacteriaceae, dificultando as opções terapêuticas quando há a necessidade de se tratar infecções hospitalares graves (HERNANDEZ et al., 2005). ESBL é, portanto endêmico no Brasil e tem correlação com nossos resultados que pode explicar em partes a infecção comunitária.

Klebsiella pneumoniae é a espécie na qual mais se observa a produção de beta-lactamase de espectro estendido. A localização dos genes que codificam estas enzimas se encontra no DNA plasmidial, o que facilita a transferência horizontal dos mesmos para muitas outras bactérias da mesma espécie e de espécies diferentes. Segundo Tosin e colaboradores (2003) o problema da transferência horizontal de genes de resistência poderia ser controlado pela restrição do uso de antimicrobianos. Em relação ao tipo de gene responsável pela expressão de ESBL foi encontrada uma alta incidência do gene $bla_{\text{CTX-M}}$ carregado por um plasmídeo transferível. A pesquisa de genes bla_{PER}, bla_{GES}, bla_{SHV} e bla_{TEM} foi realizada também. Segundo Li et al (2003), quando o mesmo clone apresenta diferentes genes *bla*, isto é devido a presença de diferentes plasmídeos entre estes isolados.

A forma pela qual as enzimas CTX-M se disseminam, ou seja, por mobilização horizontal (CANTÓN, et al 2011; COQUE et al, 2008) explica não apenas de disseminação de clones específicos, mas também de elementos genéticos móveis entre diversas espécies de enterobactérias.

A rápida disseminação das enzimas CTX-M por todo mundo pode ser conseqüência não só do uso indiscriminado de cefalosporinas, mas sim de uma série de eventos em que genes $bla_{\text{CTX-M}}$ estão envolvidos. Pois não existe apenas um mecanismo associado.

Os testes fenotípicos para detecção de ESBL identificaram 12 amostras produtoras de ESBL, sendo 8 amostras (4 *E. coli* e 4 *K. pneumoniae*) carregando unicamente $bla_{\text{CTX-M}}$ e 4 amostras (2 *E. coli* e 2 *K. pneumoniae*) carreando tanto $bla_{\text{CTX-M}}$ quanto o gene *qnr-like*. Das amostras produtoras de ESBL, 11 carregavam o gene $bla_{\text{CTX-M-2}}$ e uma única cepa não foi elucidado o tipo de CTX-M.

No Brasil, o primeiro caso de produção de CTX-M-2 reportada ocorreu no ano de 2000, em cepas de *Proteus mirabilis* isoladas em hospitais e, no ano de 2007, foi reportado pela primeira vez cepas *Escherichia coli* de origem comunitária produtoras de CTX-M-2 . Diante destes relatos presentes na literatura, acredita-se que as enzimas do grupo CTX-M-2 sejam prevalentes dentre membros da família Enterobacteriacea, sendo descritas em vários estados, dentre eles São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais, especialmente em *E. coli* e *Klebsiella pneumoniae*, o que concorda com os resultados encontrados no presente trabalho. Assim, a

presença de *bla*$_{CTX-M-2}$ em *E. coli* tem sido intensamente relatada no Brasil, tanto em amostras de origem clínica, comunitária e animal. Além do gene *bla*$_{CTX-M-2}$, as amostras produtoras de ESBL carregavam também genes do tipo SHV e TEM. Estas enzimas têm sido bastante documentadas em isolados de diversos estados brasileiros, incluindo Pernambuco, Sergipe, Bahia, Rio de Janeiro, Minas Gerais, São Paulo e Rio Grande do Sul.

Para a pesquisa dos referidos genes, neste trabalho, foi realizado a técnica de PCR e posterior visualização em gel de agarose visando confirmar a ocorrência dos genes que indicam produção de ESBL. A identificação precisa dos genes poderá ser determinada por meio do sequenciamento dos genes detectados em estudos posteriores.

A presença desses gene foi confirmada em *K. pneumoniae* e *E. coli*, o que sugere a importância dos plasmídeos na disseminação desta resistência independentemente do gênero bacteriano.

5.5 Triagem de PMQR

A resistência às fluoroquinolonas de terceira geração se tornou um grave problema, principalmente entre as espécies *E. coli* e *K. pneumoniae*. As fluoroquinolonas são utilizadas para combater infecções causadas por enterobactérias produtoras de ESBL, no entanto, o aparecimento da resistência às fluoroquinolonas em enterobactérias produtoras de ESBL é preocupante, visto que pode restringir as opções terapêuticas. Estes novos mecanismos de resistência têm um impacto epidemiológico, tendo aumentado as porcentagens de resistência.

Em um artigo, Warburg et al.,2009 estudou os genes responsáveis pela produção de QNR e AAC (6 ')-Ib-cr em uma coleção de cepas de *Escherichia coli* isoladas de amostras clínicas no período 1991-2005. Os autores relatam a ocorrência de cepas portadoras de genes *aac (6 ')-Ib-cr* pela primeira vez em 1998, coincidindo com um aumento de resistência à ciprofloxacina. A presença do gene *aac (6 ')-Ib-cr* tinha características multiclonais e também foi relacionada com a presença beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs).

As quinolonas são agentes antibacterianos sintéticos e uma molécula muito estável no meio ambiente, inclusive nos ambientes aquáticos, o seu uso indiscriminado e exagerado nestas áreas provavelmente está associado ao envolvimento de microrganismos resistentes as quinolonas nas infecções oriundas da comunidade (CATTOIR et al, 2008).

Do total de 33 enterobactérias resistentes à pelo menos 3 fluoroquinolonas, 8 carregavam o gene *qnr*B e 6 carregavam o gene *qnr*S. Nenhuma delas carregava os genes *qnr*A e duas das cepas *qnr*-positivas carregavam o gene *aac (6')Ib*-cr, que também conferem resistência a quinolonas.

Os genes *qnr* codificam pentapeptídeos que exercem efeito protetor contra a ação das fluoroquinolonas, resultando em baixo nível de resistência a esses antibióticos. Outros mecanismos de resistência, especialmente a ocorrência de mutações nos genes *gyrA* e *parC* conferem alta resistência às quinolonas, tornando os antibióticos inativos. As amostras que carregam tanto os genes *qnr*B quanto *qnr*S apresentam altos valores CIM, sugerindo que possuam outro mecanismo de resistência, alem dos genes *qnr*. Diante disso, acredita-se que essas amostras apresentam mutações nos genes *gyr*A e *par*C, o que resulta em enzimas com conformação incapaz de se ligar a fluoroquinolonas, tornando o tratamento com esses antibióticos ineficaz (NAKAMURA, et al., 1989; PAN e FISHER, 1996; KIM, et al., 2010).

Para a confirmação da presença dos genes *qnr*B e *qnr*S foi feito o sequenciamento parcial desses genes, confirmando os resultados obtidos por PCR. Essas sequências foram submetidas ao GenBank para comparação com as já existentes contendo essas sequências. Embora o percentual da resistência a quinolonas mediada por plasmídeos pesquisada nesse estudo (genes do tipo *qnr*) seja relativamente baixo, a ocorrência destes em ambientes aquáticos preocupa, visto que a disseminação por transferência horizontal de genes plasmideais aumenta a incidência destes genes.

Os genes *qnr-like* envolvidos codificam proteínas que interferem com a ação das quinolonas em DNA girase bacteriana e topoisomerase IV, resultando em baixos níveis de resistência à quinolonas (ROBICSEK , 2006).

Quatro tipos principais de genes *qnr* (*qnr*A, *qnr*B, *qnr*C e *qnr*S), já foram identificados. PMQR associado ao gene *qnr* foi detectada primeiro nos EUA em 1994 de uma *Klebsiella pneumoniae* e foi reportado entre as espécies de enterobactérias na Ásia, em vários países da

Europa e, recentemente, na America do Sul (ROBICSEK, 2006;CATTOIR , 2007; MINARINI , 2007; PEREIRA , 2007). O gene *qnr*B foi identificada pela primeira vez em um isolado da Índia, em seguida, nos EUA, Coreia, Kuwait, França e Taiwan. .(ROBICSEK , 2006, CATTOIR V, POIREL, 2007; CATTOIR V, POIREL L, NORDMANN , 2007). O gene *qnr*S foi detectado pela primeira vez em uma *Shigella flexneri* isolada no Japão e tem sido encontrado em Enterobacteriaceae da Alemanha , nos EUA, Taiwan, Vietnã e França (ROBICSEK , 2006). Muito recentemente, o gene *qnr*C foi identificado a partir de um *Proteus mirabilis* isolado clínico da China (WANG, 2009).

Em 4 das 14 cepas *qnr*-positivas, houve a associação de mecanismos de resistência plasmideais de resistência as quinolonas e às cefalosporinas de amplo espectro, havendo a produção de CTX-M2. Os determinantes do tipo *qnr*B já foram encontrados em enterobactérias produtoras de CTX-M2 (MINARINI, et al 2006). Os plasmideos carreando determinantes *qnr* foram transferidos por transformação em 11 das 22 cepas.

Enterobactérias produtoras de ESBL e resistentes às fluoroquinolonas tem sido detectadas em alguns centros médicos brasileiros, indicando que estes isolados estão realmente disseminados no Brasil (PEREIRA, et al., 2007)

Diante disso, a escolha terapêutica se torna cada vez mais difícil, uma vez que, considerando que as fluoroquinolonas juntamente com as cefalosporinas eram uma escolha fácil e confiável no tratamento de infecções comunitárias causadas por Enterobacteriaceae. Consequentemente, cada vez mais está sendo utilizados aminoglicosídeos e carbapenêmicos (para os quais as bactérias já desenvolveram mecanismos de resistência) (DENTON, 2007).

Os plasmídeos são importantes na produção de ESBL assim como na resistência a quinolonas, uma vez que mecanismos para estes perfis são passíveis de transferência horizontal e o ambiente aquático em especial favorece esse tipo de mobilização genética.

5.6 Extração de plasmídeos e transformação dos genes

Primeiro pesquisamos a existência de plasmídeos nas bactérias em estudo. Estas apresentaram um ou mais plasmídeos de diferentes tamanhos. A caracterização total destes plasmídeos não foi realizada, visto que houve uma infinidade de plasmídeos em uma mesma

bactéria e que estes podem se apresentar superenovelados ou não, o que tornaria esta pesquisa muito extensa. Para o presente estudo, nos interessava a saber se existiam plasmídeos de resistência e tentar transferi-los a uma bactéria receptora.

Para estudar a transferência dos genes de resistência, foi realizados ensaios de transformação bacteriana que inicialmente não foram bem sucedidos, provavelmente por incompatibilidade das cepas receptoras (*E. coli* DH10B) sugeridas pelo protocolo seguido (SAMBROOK, 1989). Quando começamos a utilizar a cepa *Escherichia coli* TOP 10, a transformação obteve exito, porém, nem todas as cepas foram transformáveis.

Os ensaios de transformação tiveram como objetivo elucidar a mobilização horizontal dos determinantes de resistência à cefalosporinas e quinolonas.

Os testes para transferência dos plasmídeos foram positivos para 14/22 cepas, confirmando a natureza transferível de ambos os mecanismos de resistência.

A associação de genes do tipo *qnr* e determinates de beta-lactamases em um mesmo elemento genético móvel tem sido frequentemente relatado na literatura como um ponto de urgência epidemiológica, uma vez que as fluoroquinolonas constituem uma alternativa terapêutica a produtores de beta-lactamases e a existência concomitante desses dois mecanismos de resistência restringe as alternativas terapêuticas no tratamento de infecções por fenótipos resistentes.

Assim, o constante isolamento de cepas produtoras de ESBL resistentes às fluoroquinolnas e o risco de falha terapêutica pela administração de cefalosporinas tem forçado um uso maior das outras classes de antibióticos, forçando também a seleção da resistência.

5.7 Tipagem

A análise do dendrograma dos perfis obtidos por ERIC-PCR revelou a disseminação multiclonal dos isolados de *E. coli* produtores de CTX-M-2, sugerindo um alto grau de transferência horizontal do plasmídeo.

A análise obtidos por ERIC – PCR agrupou as cepas de *E. coli* em 9 *clusters* (> 90% de similaridade), já as cepas de *K. pneumoniae* foram clonalmente não relacionadas.

Entre as cepas localizadas em um mesmo *cluster*, duas cepas de *E. coli* foram isoladas de amostras de água coletadas em pontos próximos um do outro no rio e no mesmo dia, porém, a outra cepa com similaridade clonal também foi coletada em local próximo, mas em uma diferente época do ano, o que confirma que o ambiente aquático, além de ser um veículo de disseminação destes agentes de resistência, é também um ambiente propício para que as bactérias mesmo que comensais se mantenham nesses locais.

Para isolados produzindo ESBL, a ausência de clonalidade é um fenômeno descrito, cujo fundamente se baseia da origem plasmidial da resistência. Mesmo plasmídeos geneticamente idênticos (grupo de compatibilidade) carregando um gene específico, podem ser mobilizados por diferentes gêneros e espécies. A alta promiscuidade do plasmídeo denota a importância epidemiológica do elemento genético na disseminação da resistência. Por outro lado, mesmo um tratamento de efluente direcionado para diminuir a carga bacteriana, talvez pudesse ser ineficiente em eliminar o elemento móvel, lembrando que, o próprio elemento não precisa de uma bactéria hospedeira para se manter no ambiente e disseminar para qualquer bactéria receptora, seja comensal ou patogênica, por um mecanismo de transformação. Por outro lado, a transferência horizontal por conjugação de espécies e gêneros não relacionados pode acontecer favoravelmente no ambiente aquático, denotando uma disseminação policlonal no ambiente aquático.

5.8 Grupos filogenéticos de *E. coli*

Considerando os grupos filogenéticos dos isolados de *E. coli* produtores de CTX-M-2, quatro cepas pertenciam aos grupos de baixa virulência A, enquanto dois dos isolados pertenciam ao grupo D, de alta virulência. É interessante ressaltar que as cepas de *E. coli* pertencentes ao grupo D (de alta virulência) foram isoladas de amostras de água coletadas no mesmo dia e de pontos próximos.

A resistência aos carbapenêmicos está aparecendo gradualmente, sendo que nos últimos anos espécies como *K. pneumoniae* tem adquirido rapidamente genes do tipo KPC (WOODFORD, et al., 2008). Assim, a ausência de isolados resistentes ao imipenem e ao ertapenem pode indicar que por se tratar de um fenômeno recente nesta família de

antibacterianos, muito provavelmente ainda não haviam atingido o ambiente aquático estudado no período em que foram coletadas as amostras. De fato, um estudo recente do nosso grupo caracterizou a presença de *K. pneumoniae* produtora de KPC-2 nos rios Tietê e Pinheiros no ano 2011 (OLIVEIRA, et al 2011). Deve-se atentar que o uso indiscriminado dos carbapenêmicos tem acarretado no desenvolvimento de resistência em bactérias gram-negativas nos últimos anos em decorrência de diversos fatores e pressão seletiva (NORDMANN e POIREL 2002).

Bactérias produtoras de ESBL estão freqüentemente sendo isoladas não só de ambiente hospitalar e comunidade (LINCOPAN et al, 2006.; CANTON et al, 2011, MINARINI et al.; 2006), mas também em produtos alimentícios, água de esgoto (PITOUT et al., 2005; CARATTOLI et al., 2005) e mais recentemente em efluentes urbanos (Fontes, 2011). Este aumento destes mecanismos de resistência nestes ambientes mostram a necessidade urgente de entender os meios de disseminação dos genes a fim de implantar uma estratégia de vigilância sanitárias para casos que estão se tornando pandêmicos.

O isolamento de amostras de enterobactérias multiresistentes no ambiente aquático é preocupante, devido à facilidade de disseminação dos genes de resistência em corpos d'água, não só entre espécies, mas também de uma espécie para outra diferente. Os genes de resistência que se encontra em plasmídeos são passados para outras bactérias por transferência horizontal de genes e a bactéria receptora se torna também resistente a tais antibióticos causando grande impacto em saúde pública. Assim, bactérias comensais do trato gastrointestinal de humanos e outros animais, podem adquirir estes determinantes de resistência com um risco potencial para trasformar-se em patógenos oportunistas. Nosso estudo confirma a presença de isolados resistentes carregando genes de importância clínica, sugerindo uma possível disseminação de cepas multirresistentes dos hospitais para o ambiente, muito provavelmente pelo esgoto. Por outro lado, a alta poluição dos rios urbanos pode sustentar a seleção e disseminação de bactérias multirresistentes e/ou seus genes de resistência em ecossistemas associados à entornos aquáticos urbanos disseminando esse perfil de resistência às comunidades.

6 CONCLUSÕES

- Houve predominância de isolados das espécies *E. coli* e *K. pneumoniae* nas amostras de água coletadas.
- As taxas de resistência aos antimicrobianos foram altas tanto em *E. coli* quanto em *K. pneumoniae*
- Os valores da Concentração Inibitória Mínima ultrapassou os valores do ponto de corte para todos os antimicrobianos para 90% dos isolados, exceto no caso da tetraciclina que tanto a CIM_{90}quanto a CIM_{50}apresentou valores abaixo do ponto de corte.
- Todas as amostras foram sensíveis ao imipenem, ertapenem e pip/tazobactam;
- Um total de 87 isolados da família Enterobacteriaceae se mostraram multirresistentes, ou seja, resistentes a pelo menos 3 antibacterianos de diferentes classes.
- Um total de 12 cepas de *E. coli* e 10 cepas de *K. pneumoniae* eram produtoras de ESBL e/ou PMQR.
- O grupo filogenético A foi o mais frequente dentre as amostras de *E. coli*, sendo identificada duas cepas pertencente ao grupo B1 (ambas caracterizadas como de baixa virulência ou comensais) e duas cepas pertencentes ao grupo D, caracterizadas como altamente viruluntas (patogênicas).
- Seis amostras de *E. coli* carregavam o gene *qnr* , quatro carregavam o gene $bla_{CTX\text{-}M}$ e 2 carregavam ambos os genes,
- Quatro amostras de *K. pneumoniae* carregavam o gene *qnr*, quatro carregavam o gene $bla_{CTX\text{-}M}$2 carregavam ambos os genes,
- A tipagem por ERIC-PCR, nos isolados carregando genes $bla_{CTX\text{-}M}$ e/ou genes *qnr*, revelou ausência de relação clonal entre as cepas de *K. pneumoniae* (n=10), enquanto que cepas de *E. coli* (n= 12) foram agrupadas em nove *clusters* (> 90% de similaridade).

REFERÊNCIAS

ACAR, J. F.; GOLDSTEIN, F. W. Trends in bacterial resistance to fluoroquinolones.**Clin. Infect. Dis.,** Jan;24 Suppl. 1, S67-7, 1997.

AL-BAHRY, S. N.; MAHMOUD, I. Y.; AL-KHAIFI, A., ELSHAFIE, A. E.; AL-HARTHY, A. Hability of multiple antibiotic resistant bacteria in distribution lines of treated sewage effluent used for irrigation.**Water Sci. Technol.**, v. 60, n. 11, p. 2939-2948, 2009.

ALLEN, S. E.; BOERLIN, P.; JANECKO, N.; LUMDSEN, J. S.; BARKER, I. K.; PEARL, D. L.; REID-SMITH, R. J.; JARDINE, C. Antimicrobial resistance in generic *Escherichia coli* isolates from wild small mammals living in swine farm, residential, landfill, and natural environments in southern Ontario, Canada. **Appl. Environ.Microbiol.** v. 77, n. 3, p. 882-888, 2011.

ALI ABADI, F. S.; LEES, P. Antibiotic treatment for animals: effect on bacterial population and dosage regimen optimization. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v.14, p.307-313, 2000.

AMBLER, R. P. The structure of beta-lactamases.**Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.** v. 289, n. 1036, p. 321-331, 1980.

AMBLER, R. P.; COULSON, A. F.; FRÈRE, J. M.; GHUYSEN, J. M.; JORIS, B.; FORSMAN, M.; LEVESQUE, R. C.; TIRABY, G.; WALEY, S. G.; A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases. **Biochem. J**. v. 276, pt. 1, p. 269-270, 1991.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA - National Health Surveillance Agency, National assembly for the regulation of the drug market. Available at: http://www.anvisa.gov.br/monitora/cmed/index.htm, 2006

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION.APHA. 1992**.** Standards methods for the examination of water and waste water**.** 18 ed. APHA, Washington, 1998

APPELBAUM, P. C.; HUNTER, P. A.; The fluoroquinolone antibacterials: past, present and future perspectives. **Int. J. Antimicrob. Agents**. v. 16, n. 1, p. 5-15, 2000

BALSALOBRE, L. C.; DROPA, M.; LINCOPAN, N.; MAMIZUKA, E. M.; MATTÉ, G. R.; MATTÉ, M. H. Detection of metallo B-lactamases-encoding genes in environmental isolates of *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas jandaei*. **Lett. Appl. Microbiol.** v. 1, p. 1-4, 2009.

*De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023:** informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BIEDENBACH, D. J.; TOLEMAN, M. A.; WALSH, T. R.; JONES, R. N. Characterization of fluoroquinolone-resistant beta-hemolytic *Streptococcus* spp. isolated in North America and Europe including the first report of fluoroquinolone-resistant *Streptococcus dysgalactiae*subspecies *equisimilis*: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2004). **Diagn. Microbiol. Infect. Dis**. v. 55, n. 2, p. 119-127, 2006.

BIRNBOIM, H. C.; DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acids Res.**v. 7, n. 6, p. 1513-1523, 1979.

BOLON, M. K. The newer fluoroquinolones. **Med. Clin. North Am.** v. 95, n. 4, p. 793-817, 2011.

BROTZU, G. Ricerche su di un nuovo antibiotico. **Lav. Ist. Igiene di Cagliari,** v.1, p. 1-7, 1948.

BRUUN, M. S.; MADSEN, L.; DALSGAARD, I. Efficiency of oxytetracycline treatment in rainbow trout experimentally infected with *Flavobacterium psychrophilum* strains having different in vitro antibiotic susceptibilities. **Aquaculture**, v. 215, p. 11-20, 2003.

BUSH, K.; JACOBY, G. A. Update functional classification of beta-lactamases.A**ntimicrob. Agents Chemother.**, v. 54, n. 3, p. 969-976, 2010.

BUSH, K. New beta-lactamases in gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. **Clin. Infect. Dis.** v. 32, n. 7, p. 1085-1089, 2001.

BUSH, L. M.; CALMON, J.; JOHNSON, C. C. Newer penicillins and beta-lactamase inhibitors. : **Infect. Dis. Clin. North Am.** v. 9, n. 3, p.653-686, 1995.

BUTAYE, P.; CLOECKAERT, A.; SCHWARZ, S. Mobile genes coding for efflux-mediated antimicrobial resistance in Gram-positive and Gram-negative bacteria.**Int. J. Antimicrob. Agents.**v. 22, n. 3, p. 205-210, 2003.

CANTÓN, R.; RUIZ-GARBAJOSA, P. Co-resistance: an opportunity for the bacteria and resistancegenes.**Curr. Opin. Pharmacol.** v. 11, n. 5, p.477-485, 2011.

CARATTOLI, A.; BERTINI, A.; VILLA, L.; FALBO, V.; HOPKINS, K. L.; THRELFALL, E. J. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. **J. Microbiol. Methods.**v. 63, n. 3, p. 219-228, 2005.

CARNEIRO, D. O.; FIGUEIREDO, H. C. P.; PEREIRA JÚNIOR, D. J.; LEAL, C. A. G.; LOGATO, P. V. R. Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de bactérias isoladas em diferentes sistemas de cultivo de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*). **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**. vol. 59 n. 4, 2007.

CARTER, M. W.; OAKTON, K. J.; WARNER, M.; LIVERMORE, D. M. Detection of extended-spectrum beta-lactamases in *Klebsiella* with the Oxoid combination disk method. **J. Clin. Microbiol.** v. 38, n. 11, p. 4228-4232, 2000.

CASTANHEIRA, M.; PEREIRA, A. S.; NICOLETTI, A. G.; PIGNATARI, A. C.; BARTH, A. L.; GALES, A. C. First report of plasmid-mediated *qnr*A1 in a ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* strain in Latin America. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 51, n. 4, p. 1527-1529, 2007.

CATTOIR, V. ; WEILL, F. X. ; POIREL, L.; FABRE, L.; SOUSSY, C. J.; NORDMANN, P. Prevalence of *qnr* genes in *Salmonella* in France.**J. Antimicrob. Chemother**; v. 59, p. 751–754, 2007.

CATTOIR, V. ; POIREL, L. ; ROTIMI, V. ; SOUSSY, C. J.; NORDMANN, P. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance *qnr* genes in ESBL-producing enterobacterial isolates. **J. Antimicrob. Chemother.** v. 60, p. 394–397, 2007.

CATTOIR, V.; POIREL, L.; NORDMANN, P. Plasmid-mediated quinolone resistance determinant *Qnr*B4 identified in France in an *Enterobacter cloacae* clinical isolate co-expressing a *Qnr*S1 determinant. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 51, p. 2652–2653, 2007.

CATTOIR, V.; NORDMANN, P. Plasmid-mediated quinolone resistance in gram-negative bacterial species: an update. **Curr. Med. Chem.** v. 16, n. 8, p. 1028-1046, 2009.

CAVACO, L. M.; HASMAN, H.; XIA, S.; AARESTRUP, F. M. *qnr*D, a novel gene conferring transferable quinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar Kentucky and Bovismorbificans strains of human origin. **Antimicrob.Agents Chemother.** v. 53, p. 603-608, 2009.

CHAPMAN, P. A.; ELLIN, M.; ASHTON, R.; SHAFIQUE, W. Comparison of culture, PCR and immunoassays for detecting *Escherichia coli* O157 following enrichment culture and immunomagnetic separation performed on naturally contaminated raw meat products. **Int. J. Food Microbiol.** v. 68, n. 1-2, p. 11-20, 2001.

CHENIA, H. Y.; PILLAY, B.; PILLAY, D. Analysis of the mechanisms of fluoroquinolone resistance in urinary tract pathogens. **J. Antimicrob. Chemother**. v. 58, n. 6, p. 1274-1278, 2006.

CLERMONT, O.; BONACORSI, S.; BINGEN, E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group.**Appl. Environ. Microbiol.** v. 66, n. 10, p. 4555-4558, 2000.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE.Normas de desempenho para testes de sensibilidade a agents antimicrobianos por diluição para crescimento de bactérias aeróbias. 21st suplemento informativo. **CLSI document M100-S21**, USA, 2011.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Normas de desempenho para testes de sensibilidade a agents antimicrobianos por diluição para crescimento de bactérias aeróbias. 15st suplemento informativo.**CLSI document M100-S19**, USA, 2009.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE.Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals **CLSI document M31-A3**, USA, 2009.

COQUE, T. M.; BAQUERO, F.; CANTON, R. Increasing prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in Europe. **Euro Surveill**. v. 13, n. 47, 2008

CORNAGLIA, G. Mezzo secolo di cefalosporine: le basi razionali di un sucesso. **Le infezioni in medicina.**: v. 1, p. 18-23, 2000.

COSTA, M. M. et al. Caracterização epidemiológica, molecular e perfil de resistência aos antimicrobianos de *Escherichia coli* isoladas de criatórios suínos do sul do Brasil. **Pesq. Vet. Bras**., v. 26, n. 1, p. 5-8, 2006.

DALLA-COSTA, L. M.; COELHO, J. M.; SOUZA, H. A. P. H. M.; CASTRO, M. E. S.; STIER, C. J. N.; BRAGAGNOLO, K. L.; RIA-NETO, A.; PENTEADO-FILHO, S. R.; LIVERMORE, D. M.; WOODFORD, N. Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baummannii* producing the OXA-23 enzyme in Curitiba, Brazil. **J. Clin. Microbiol..** v. 41, p. 3403-3406, 2003.

DENTON, M.Enterobacteriaceae. **Int. J. Antimicrob. Agents.** v. 3, Suppl. S9-S22, 2007.

DHANJI, H.; MURPHY, N. M.; DOUMITH, M.; DURMUS, S.; LEE, S. S.; HOPE, R.; WOODFORD, N.; LIVERMORE, D. M. Cephalosporin resistance mechanisms in *Escherichia coli* isolated from raw chicken imported into the UK. **J. Antimicrob. Chemother.** v. 65, n. 12, p. 2534-2537, 2010.

DOYLE, J. S.; BUISING, K. L.; THURSKY, K. A.; WORTH, L. J.; RICHARDS, M. J. Epidemiology of infections acquired in intensive care units. **Semin. Respir. Crit. Care Med.** v. 32, n. 2, p. 115-138, 2011.

FERNANDES, S. A.; PATERSON, D. L.; GHILARDI-RODRIGUES, A. C.; ADAMS-HADUCH, J. M.; TAVECHIO, A. T.; DOI, Y. CTX-M-2-producing *Salmonella typhimurium* isolated from pediatric patients and poultry in Brazil. **Microb. Drug Resist**. v. 15, n. 4, p. 317-321, 2009.

FONTES, L. C.; NEVES, P. R.; OLIVEIRA, S.; SILVA, K. C.; HACHICH, E. M.; SATO, M. I.;LINCOPAN N. Isolation of *Pseudomonas aeruginosa* coproducing metallo-β-lactamase SPM-1 and 16S rRNA methylase RmtD1 in an urban river. **Antimicrob. Agents Chemother**. v. 55, n. 6, p. 3063-3064, 2011.

FUENTEFRIA, D. P.; FERREIRA, A. E.; CORÇÃO, G. Antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* from hospital wastewater and superficial water: Are they genetically related? **Journal of Environmental Management.** v. 92, n. 1, p. 250–255, 2011.

GALES, A. C.; MENEZES, L. C.; SILBERT, S.; SADER, H. S.Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo-β-lactamase. **J. Antimicrob. Chemother.** v. 52, p. 699-702, 2003.

GELDREICH E. E. The bacteriology of water. In: **Microbiology and microbial infections**. 9th ed. London: Arnold; 1998.

GILBERT, D. N.; MOELLERING Jr. R. C.; SANDE, M. A. In the Sanford guide to antimicrobial therapy. **Antimicrob. Therapy.** Inc., 1998.

GOULART, M.; CALLISTO, M. Bioindicadores de qualidade de água como ferramenta em estudos de impacto ambiental. **Rev. FAPAM**, V. 2, n. 1, 2003.

GUSATTI, C. de .;, FERREIRA, A. E.; FUENTEFRIA, D. B.; CORÇÃO, G. Resistance to beta-lactams among *Acinetobacter* spp isolated from hospital sewage in southern Brazil]. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**. v. 42, n. 2, p. 183-187, 2009.

HERNADEZ, J. R.; MARTINEZ-MARTINEZ, L.; CANTÓN, R.; COQUE, T. M.; PASCUAL, A. Nationwide study of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum beta-lactamases in Spain. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 49, p. 2122-2125, 2005.

HÖLMSTROM, K.; GRÄSLUND, S.; WAHLSTRÖM, A.; POUNGSHOMPOO, S.; BENGTSSON, B.; KAUTSKY, N. Antibiotic use in shrimp farming and implications for environmental impacts and human health. **Int. J. Food Sci. Technol.**, v.38, p.255-266, 2003.

HURST, M.; LAMB, H. M.; SCOTT, L. J.; FIGGITT, D. P. Levofloxacin: an updated review of its use in the treatment of bacterial infections. **Drugs**, v. 62, p. 2127-67, 2002.

JACKSON, L. C.; REYES, L. A. M.; HAMILTON, M. L. Quinolonas y terapia Antimicrobiana. **Acta Médica**; v. 8, n. 1, p. 58-65, 1998.

JACOBY, G. A.; MUNOZ-PRICE, L. S. The new beta-lactamases. **N. Engl. J. Med**. v. 352, n. 4, p. 380-391, 2005.

JOHNSON, L.; SABEL, A.; BURMAN, W. J. Emergence of fluoroquinolone resistance in outpatient urinary *Escherichia coli* isolates. **Am. J. Med.** v. 121, n. 10, p. 876-884, 2008.

KIFFER, C.; HSIUNQ, A.; OPLUSTIL, C.; SAMPAIO, J.; SAKAQAMI, E.; TUNER, P.; MENDES, C.; MYSTIC Brazil Group. Antimicrobial susceptibility of Gram-negative bacteria in Brazilian hospitals: the MYSTIC Program Brazil 2003. **Braz. J. Infect. Dis**; v. 9, n. 3, p. 216-224, 2005.

KIM, M. S.; JUN, L. J.; SHIN, S. B.; PARK, M. A.; JUNG, S. H.; KIM, K.; MOON, K. H.; JEONG, H. D. Mutations in the *gyrB*, *parC*, and *parE*genes of quinolone-resistant isolates and mutants of *Edwardsiella tarda*. **J. Microbiol. Biotechnol**. 2010 Dec;20(12):1735-43.

KNOTHE, H.; SHAH, P.; KRCMERY, V.; ANTAL, M.; MITSUHASHI, S. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. **Infection.** v. 11, n. 6, p. 315-317, 1983.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN, W. C. J. Diagnóstico Microbiológico. **Medsi,** Rio de Janeiro, 2001.

LI, C. R. ; LI, Y. ; ZHANG, P. A. Dissemination and spread of CTX-M extended spectrum beta-lactamases among clinical isolates of *Klebsiella pneumonia* in central China. **Int. J. Antimicrob. Agents**; v. 22, p. 521-525, 2003.

LINCOPAN, N.; LEIS, R.; VIANELLO, M. A.; de ARAUJO, M. R.; RUIZ, A. S.; MAMIZUKA, E. M. Enterobacteria producing extended-spectrum beta-lactamases and IMP-1 metallo-beta-lactamases isolated from Brazilian hospitals. **J. Med. Microbiol.**, v. 55, p. 1611-1613, 2006.

LINCOPAN, N.; McCULLOCH, J. A.; REINERT, C.; CASSETTARI V. C.; GALES, A.C.; MAMIZUCA, E. M. First isolation of metallo-beta-lactamase-producing multiresistant *Klebsiella pneumoniae* from a patient in Brazil. **J. Clin. Microbiol.** v. 43, n. 1, p. 516-519, 2005.

LIVERMORE, D. M. Beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. **Clin. Microbiol.** v. 8, n. 4, p. 557-584, 1995.

LOCATELLI, M. A.; SODRÉ, F. F.; JARDIM, W. F. Determination of antibiotics in Brazilian surface waters using liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. **Arch. Environ. Contam. Toxicol**. v. 60, n. 3, p. 385-393, 2011.

LU, S. Y.; ZHANG, S. N.; GENG, T. Y.; LI, C. M.; YE, D. S.; ZHANG, F.; ZOU, H. W. High diversity of extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria in an urban river sediment habitat. **Appl. Environ. Microbiol**.; v. 76, p. 5972-5976, 2010.

LUBICK, N. Tools for tracking antibiotic resistance. **Environ. Health Perspect**. v. 119, n. 5, p. 214-217, 2011.

MAGIORAKOS, A. P.; SRINIVASAN, A.; CAREY, R. B.; CARMELI, Y.; FALAGAS, M. E.; GISKE, C. G.; HARBARTH, S.; HINDLER, J. F.; KAHLMETER, G.; OLSSON-LILJEQUIST, B.; PATERSON, D. L.; RICE, L. B.; STELLING, J.; STRUELENS, M. J.; VATOPOULOS, A.; WEBER, J. T.; MONNET, D. L. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clin. Microbiol. Infect**. May 7. 2011

MARRA, A. R.; WEY, S. B.; CASTELO, A.; GALES, A. C.; CAL, R. G.; FILHO, J. R.; EDMOND, M. B.; PEREIRA, C. A. Nosocomial bloodstream infections caused by *Klebsiellapneumoniae* : impact of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) production on clinical outcome in a hospital with high ESBL prevalence. **B. M. C. Infect. Dis**. v. 6, p. 24, 2006.

MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L.; ELIECER CANO, M.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ J.; CALVO, J.; PASCUAL, A. Plasmidmediated quinolone resistance. **Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.** v. 6, p. 685-711, 2008.

MEDEIROS, A. A.; CRELLIN, J. Comparative susceptibility of clinical isolates producing extended spectrum beta-lactamases to ceftibuten: effect of large inocula. **Pediatr. Infect. Dis. J.**v. 16, Suppl. n. 3, S49-55, 1997.

MINARINI, L. A.; POIREL, L.; TREVISANI, N. A.; DARINI, A. L.; NORDMAN, P. Predominance of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamase genes among enterobacterial isolates from outpatients in Brazil. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis**. v. 65, n. 2, p. 202-206, 2009.

MINARINI, L. A. ; POIREL, L. ; CATTOIR, V. ; DARINI, A. L. ; NORDMAN, P. Plasmid-mediated quinolone resistance determinants among enterobacterial isolates from outpatients in Brazil. **J. Antimicrob. Chemother**. v. 62, n. 3, p. 474-478, 2008.

MINARINI, L. A.; GALES, A. C.; DARINI, A. L. First report of plasmidmediated resistance to quinolones and cefotaxime in an *Enterobacter cloacae* strain isolated from an outpatient in Brazil. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 51, p. 401–402, 2007.

MINARINI, L. A.; GALES, A. C.; PALAZZO, I. C.; DARINI, A. L. Prevalence of community-occurring extended spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in Brazil. **Curr. Microbiol.** v. 54, n. 5, p. 335-341, 2007.

NAHEED A, KALLURI P, TALUKDER KA, FARUQUE AS, KHATUN F, NAIR GB, MINTZ ED, BREIMAN RF. Fluoroquinolone-resistant *Shigella dysenteriae* type 1 in northeastern Bangladesh**. Lancet. Infect. Dis**. v. 4, n. 10, p. 607-608, 2004.

NAKAMURA, S.;NAKAMURA, M.;KOJIMA, T,;YOSHIDA, H. *gyrA* and *gyrB* Mutations in Quinolone-Resistant Strains of *Escherichia coli*. **Antimicrob. Agents Chemoth**. v. 33, n. 2, p. 254-255, 1989.

NORDMANN P, POIREL L. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes**. Clin. Microbiol. Infect.** v. 8, p. 321-331, 2002.

OLIVEIRA, S.; FONTES, L. C.; SILVA, K. C.; PUSZTAI,J.; HACHICH, E. M.; SATO, M. I. Z.; LINCOPAN, N.Dissemination of kpc-2-producing *Klebsiella pneumoniae* and oxa-23-positive Acinetobacter baumannii in urban rivers, São Paulo, Brazil. In: CONGRESSO

BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 26., 2011. Foz de Iguaçu. **Abstracts.**..São Paulo: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2011. p. 2017-1.

PARK, C. H.; ROBICSEK, A.; JACOBY, G. A.; SAHM, D.; HOOPER, D. C. Prevalence in the United States of *aac(6')-Ib-cr* Encoding a Ciprofloxacin-Modifying Enzyme. **Antimicrob. Agents Chemother**.;v**.** 50, n. 11, p. 3953–3955, 2003.

PAN XS, FISHER LM. Cloning and characterization of the *parC* and *parE*genes of *Streptococcus pneumoniae* encoding DNA topoisomerase IV: role in fluoroquinolone resistance. **J Bacteriol.** 1996 Jul;178(14):4060-9.

PAVEZ, M.; NEVES, P.; DROPA, M.; MATTE, M. H.; GRINBAUM, R.; DE ARAUJO, M. R. E.; MAMIZUKA, E. M.; LINCOPAN, N. Emergence of carbapenem-resistant *Escherichia coli* producing CMY-2-type AmpC beta-lactamase in Brazil. **J. Med. Microbiol.** v. 57, n. 12, p. 1590-1592, 2008.

PEREIRA, A. S.; ANDRADE, S. S.; MONTEIRO, J. et al. Evaluation of the susceptibility profiles, genetic similarity and presence of *qnr* gene in *Escherichia coli* resistant to ciprofloxacin isolated in Brazilian hospitals. **Braz. J. Infect. Dis.** v. 11, p. 40–43, 2007.

PÉRICHON, B.; COURVALIN, P.; GALIMAND, M. Transferable resistance to aminoglycosides by methylation of G1405 in 16S rRNA and to hydrophilic fluoroquinolones by QepA-mediated efflux in *Escherichia coli*. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 51, p. 2464-2469, 2007.

PITOUT, J. D.; LAUPLAND, K. B.; CHURCH, D. L.; MENARD, M. L., JOHNSON, J. R. Virulence factors of *Escherichia coli* isolates that produce CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases. **Antimicrob. Agents Chemother**. v. 49, n. 11, p. 4667-4670, 2005.

PRADO, T.; PEREIRA, W. C.; SILVA, D. M.; SEIKI, L. M.; CARVALHO, A. P.; ASENSI, M. D. Detection of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in effluents and sludge of a hospital sewage treatment plant. **Lett. Appl. Microbiol.** v. 46, n. 1, p. 136-141, 2008.

RADICE, M.; POWER, P.; DI CONZA, J.; GUTKIND, G.Early dissemination of CTX-M-derived enzymes in South America. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 46, n. 2, p. 602-604, 2002.

REGITANO, J. B.; LEAL, R. M. P. Comportamento e impacto ambiental de Antibióticos usados na produção animal brasileira. **R. Bras. Ci. Solo,**v, 34, p.:601-616, 2010

RIBEIRO, V. B. **Caracterização de determinantes de virulência, resistência e integrons classe 1 em cepas de Salmonella enterica isoladas a partir de alimentos e fontes relacionadas.** 2007. [s.p]. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - Microbiologia) – Faculdade de Farmácia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

RIVERA-TAPIA, J. A. Antibiotic resistance, public health problem. **An. Med. Hosp. ABC**. v. 48, p. 42-47, 2003.

ROBICSEK, K.; JACOBY, G. A.; HOOPER, D. C.The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. **Lancet. Infect. Dis.** v. 6, n. 10, p. 629-640, 2006.

ROBICSEK, A.; STRAHILEVITZ, J.; JACOBY, G. A. Fluoroquinolone- modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. **Nat. Med.** v. 12, p. 83-88, 2006.

ROBICSEK, A.; STRAHILEVITZ, J.; SAHM, D. F.; JACOBY, G. A.; HOOPER, D. C. *qnr* prevalence in ceftazidime-resistant Enterobacteriaceae isolates from the United States. **Antimicrob. Agents Chemother**. v. 50, n. 8, p. 2872-2874, 2006.

ROSÁRIO, N. A.; GRUMACH, A. S. Alergia a beta-lactâmicos na clínica pediátrica: uma abordagem prática. **J. Pediatr**. v. 82, n. 5 suppl 0, 2006.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T.; eds. Molecular cloning: a laboratory manual. 2ª ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, v.3, 1989.

SADER, H. S.; GALES, A. C.; PFALLER, M. A .; MENDES, R. E.; ZOCCOLI, C.; BARTH, A.; JONES, R.N. Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Braz. J. Infect. Dis.** v. 5, n. 4, p. 200-214, 2001.

Secretaria do Estado do Meio Ambiente. SMA - São Paulo. Coordenadoria de Planejamento Ambiental. Informações básicas para o planejamento ambiental. São Paulo, SMA, 84p. 2002.

SANDERS, C. C.; SANDERS, W. E. Jr .beta-Lactam resistance in gram-negative bac-teria: global trends and clinical impact. **Clin. Infect. Dis.** v.15, n. 5, p. 824-839, 1992.

SEIFRTOVÁ, M.; NOVÁKOVA, L.; LINO, C.; PENA, A.; SOLICH, P. An overview of analytical methodologies for the determination of antibiotics in environmental waters. **Anal Chim. Acta.** v. 649, n. 2, p.158-179, 2009.

SHAH, A. A.; HASAN, F.; AHMED, S.; HAMEED, A. Extended-spectrum beta-lactamases (ESbLs): characterization, epidemiology and detection. **Crit. Rev. Microbiol.** v. 30, n. 1, p. 25-32, 2004.

SHAKIBAIE, M. R.; JALILZADEH, K. A.; YAMAKANAMARDI, S. M. Horizontal transfer of antibiotic resistance genes among gram negative bacteria in sewage and lake water and influence of some physico-chemical parameters of water on conjugation process. **J. Environ. Biol**. v. 30, n. 1, p. 45-49, 2009.

SNEATH, P. H.; SOKAL, R. R. Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification. San Francisco: W.H. Freeman, p. 573, 1973.

SORUM, H.; ABÉE-LUND, T. M. Antibiotic resistance in food-related bacteria _ a result of interfering with the global web of bacterial genetics. **Int. J. Food Microbiol**., v. 78, p. 43-56, 2002.

STÜRENBURG, E.; MACK, D. Extended-spectrum beta-lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory, therapy, and infection control. **J. Infect**. v. 47, n. 4, p. 273-295, 2003.

STÜRENBURG, E.; SOBOTTKA, I.; LAUFS, R.; MACK, D. Evaluation of a new screen agar plate for detection and presumptive identification of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-lactamases. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.** v. 51, n. 1, p. 51-55, 2005.

SUARES ROCHA, P.; AZAB, E.; SCHIMIDT, B.; STORCH, V.; HOLLERT, H.; BRAUNBECK, T. Changes in toxicity and dioxin-like activity of sediments from the Tietê River (São Paulo, Brazil). **Ecotoxicol. Environ. Saf.** v. 73, n. 4, p. 550-558, 2010.

THORSTEINSDOTTIR, T. R.; HARALDSSON, G.; FRIDRIKSDOTTIR, V.; KRISTINSSON, K. G.; GUNNARSSON, E. Prevalence and Genetic Relatedness of Antimicrobial-Resistant *Escherichia coli* Isolated From Animals, Foods and Humans in Iceland. **Zoonoses Public Health.** Nov 13. 2009.

TOSIN, I.; SILBERT, S.; SADER, H. S.The use of molecular typing to evaluate the dissemination of antimicrobial resistance among Gram-negative rods in Brazilian Hospitals. **Braz. J. Infect. Dis.** v. 7, p. 360-369, 2003.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. Microbiologia. 5 ed. Atheneu, São Paulo, 2008.

VETTING, M. W.; PARK, C. H.; HEGDE, S. S.; JACOBY, G. A.; HOOPER, D. C.; BLANCHARD, J. S. Mechanistic and structural analysis of aminoglycoside N-acetyltransferase AAC(6')-Ib and its bifunctional, fluoroquinolone-active AAC(6')-Ib-cr variant. **Biochemistry**. v. 16, p. 9825-9835, 2008.

XI, C.; ZHANG, Y.; MARRS, C. F.; YE, W.; SIMON, C.; FOXMAN, B.; NRIAGU, J. Prevalence of antibiotic resistance in drinking water treatment and distribution systems. **Appl. Environ. Microbiol**. v. 75, n. 17, p. 5714-5718, 2009.

YAMANE, K.; WACHINO, J.; SUZUKI, S. New plasmidmediated fluoroquinolone efflux pump, QepA, found in an *Escherichia coli* clinical isolate. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 51, p. 3354-3360, 2007.

WALSH, T. R.; WEEKS, J.; LIVERMORE, D. M.; TOLEMAN, M. A. Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: an environmental point prevalence study. **Lancet. Infect. Dis.** v. 11, n. 5, p. 355-362, 2011.

WANG, M. H.; XU, X.; WU, S. et al. A new plasmid-mediated gene for quinolone resistance, *qnr*C, found in a clinical isolate of Proteus mirabilis. Antimicrob. Agents Chemother. v. 53, n. 5, p. 1892-1897, 2009.

WARBURG, G.; KOREM, M.; ROBICSEK, A. Changes in aac(6')-Ib-cr prevalence and fluoroquinolone resistance in nosocomial isolates of *Escherichia coli* collected from 1991 through 2005. **J. Antimicrob. Agents Chemother**. v. 53, p. 1268-1270, 2009.

WARREN, R. E.; HARVEY, G.; CARR, R.; WARD, D.; DOROSHENKO, A. Control of infections due to extended-spectrum beta-lactamase-producing organisms in hospitals and the community. **Clin. Microbiol. Infect**. v. 14, Suppl. n. 1, p. 124-133, 2008.

WEGENER, H. C.; MOLLER, N. F. Reducing the use of antimicrobial agents in animals and man.**J. Med. Microbiol.** v.49, p.111-113, 2000.

WOODFORD N, ZHANG J, WARNER M, KAUFMANN ME, MATOS J, MACDONALD A, BRUDNEY D, SOMPOLINSKY D, NAVON-VENEZIA S, LIVERMORE DM. *Arrival of Klebsiella pneumoniae* producing *KPC carbapenemase* in the United Kingdom. v. 62, n. 6, p. 1261-1264, 2008.

ZAVASCKI, A. P.; GASPARETO, P. B.; MARTINS, A. F.; GONÇALVES, A. L.; BARTH, A. L. Outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1 metallo-β-lactamase in a teaching hospital in southern Brazil. **J. Antimicrob. Chemother.** v.56, p. 1148-1151, 2005.

51st ICAAC ~ SEPT. 17-20, 2011 ~ CHICAGO

Session: 199-Increasing the Awareness of Animals and Environment as Reservoirs for Resistance Genes

C2-1559

Dissemination of *bla*$_{CTX-M}$, *qnr, bla*$_{SPM-1}$ and RmtD Genes in an Urban River, Brazil

L. C. Fontes, Other - *MSc*[1], S. Oliveira - *BSc*[1], M. I. Sato - *Doctor*[2], E. Hachich - *Doctor*[2], N. Lincopan - *PhD*[1];

[1]Univ.e de São Paulo, São Paulo, Brazil, [2]CETESB, São Paulo, Brazil.

Background: Antibiotics are widely used to human infections or to promote growth in food animals, contributing to the emergence and dissemination of multidrug-resistant (MDR) bacteria. The aim of this study was to determine clonal diversity and prevalence of ESBL, MBL, *Qnr* and RmtD encoding genes in MDR *Escherichia coli,Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa* strains recovered from water samples in an urban river, in São Paulo, Brazil. **Methods:** From 2009 to 2010, 85 MDR *E. coli* (n=45)*, K. pneumoniae* (n=37)and *P. aeruginosa* (n=3) strains were isolated from eight locations throughout Tietê River. Isolates were identified by biochemical tests; antimicrobial susceptibility testing was performed by CLSI disk-difussion and agar dilution methods; resistance genes were screened by PCR; and molecular genotyping was performed by ERIC-PCR. **Results:** Presence of *bla*$_{CTX-M}$-like genes was confirmed in 4/45 (9%) and 4/37 (11%) *E. coli* and *K. pneumoniae* isolates*,* respectively, and *qnr*-like genes were identified in 7/45 (15.5%) *E. coli* and 3/37 (8.1%) *K. pneumoniae* strains. In this regard, while the *qnrB* gene was identified in 3 *E. coli* and 2 *K. pneumoniae* strains, the identification of the *qnrS* gene was confirmed in 4 *E. coli* and 1 *K. pneumoniae*, respectively. *K. pneumoniae* isolates were unclonally related, whereas *E. coli* strains were grouped in two clusters (>90% similarity). Isolates harboring *bla*$_{CTX-M}$ and *qnr* genes were collected from all sites on Tietê River. Finally, the presence of *bla*$_{SPM-1}$ and *rmtD1* genes was confirmed in three *P. aeruginosa* strains collected from two different sites in the river. Surprisingly, these isolates were clonally related (> 90% similarity) to clinical MDR *P. aeruginosa*. **Conclusions:** Presence of *bla*$_{CTX-M}$, *qnr*B*, qnr*S, *bla*$_{SPM-1}$ and *Rmt*D genes in Gram-negative bacteria confirm the environmental contamination of urban rivers in Brazil. These isolates could act as a source and/or reservoir of resistance genes with clinical relevance, and with potential for dissemination in communities through river environments.