TATIANE NASCIMENTO

**OCORRÊNCIA E DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS
GRAM-NEGATIVAS MULTIRRESISTENTES EM AMBIENTES
AQUÁTICOS PÚBLICOS NO ESTADO DE SÃO PAULO**

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
2015

TATIANE NASCIMENTO

**OCORRÊNCIA E DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS
GRAM-NEGATIVAS MULTIRRESISTENTES EM AMBIENTES
AQUÁTICOS PÚBLICOS NO ESTADO DE SÃO PAULO**

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 eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
2015

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

Nascimento, Tatiane.

Ocorrência e diversidade de bactérias gram-negativas multirresistentes em ambientes aquáticos públicos no estado de São Paulo / Tatiane Nascimento. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Prof. Dr. Nilton Erbet Lincopan Huenuman.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Resistência bacteriana.

Versão do título para o inglês: Occurrence and diversity of multidrug-resistant gram-negative bacteria in public aquatic environments in southeastern Brazil.

1. Resistência aos antibacterianos 2. Gram-negativos 3. Cefalosporinas 4. Carbapenêmicos 5. Beta-lactamases 6. PMQR I. Huenuman, Prof. Dr. Nilton Erbet Lincopan II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB025/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Tatiane Nascimento.

Título da Dissertação: Ocorrência e diversidade de bactérias gram-negativas
multirresistentes em ambientes aquáticos públicos no estado de São
Paulo.

Orientador(a): Prof. Dr. Nilton Erbet Lincopan Huenuman.

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

☐ **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) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 546/12 referente ao projeto intitulado: "*Prevalência de bactérias multirresistentes em ambientes aquáticos públicos no estado de São Paulo: impacto clínico e ambiental*" sob a responsabilidade de **Tatiane Nascimento**, 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 utilizará animais que estejam sob a égide da lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP n°196 de 1996.

São Paulo, 23 de agosto de 2012.

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

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

Aos meus pais todas as minhas conquistas.
Todo meu esforço por vocês, sempre.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de deixar meus agradecimentos a todas as pessoas que de alguma forma me ajudaram durante todo este período.

- 1) Em especial sou grata ao professor Nilton Lincopan, meu orientador ao longo desta jornada, pelo aprendizado, dicas e por se dedicar a este projeto;
- 2) Para toda a equipe do departamento de Microbiologia: Selminha, Jacinta, Seu Zé, Elaine, Carol e Gisele;
- 3) Aos colegas de laboratório Luciana Sartori, Juan, Ednei, Priscilia, Lúcia Nhambe, Helena, Leandro, Enyd, Rodrigo Moura, Priscila e Patrícia pela convivência diária;
- 4) Ao Edmir Fraga e ao Prof. Dr. Jorge Sampaio, por disponibilizarem e auxiliarem na utilização do MALDI-TOF;
- 5) A Luana Melo pelo acompanhamento durante todo o trajeto do mestrado, por sua disposição em resolver meus problemas, sendo na bancada, com revisões ou conselhos;
- 6) Ao Rodrigo Cantamessa que me auxiliou na coleta das amostras de água e foi um grande amigo em todos os momentos;
- 7) A Quézia Moura por estar sempre prontamente disposta a ajudar, com quem dividi dificuldades, mas principalmente dividimos bons momentos regados de risadas;
- 8) A Lucianne que me auxiliou e acompanhou sempre que necessário nos experimentos;
- 9) A Livia Castelani, com quem compartilhei aflições e dúvidas, que esteve sempre presente e me espelho como profissional;
- 10) Ao Michel Mauch que com muita paciência me apoiou, me auxiliou com documentações, e foi imprescindível para finalização deste trabalho;
- 11) Para meus amigos, Matheus e Mariane, pelo incentivo nas fases difíceis;
- 12) Aos meus irmãos, Tiago Mistura e Caio Mistura, pelo apoio incondicional;
- 13) Principalmente, a Selma, ao Sergio e ao Ezio, meus pais por serem minha motivação constante, sendo indispensáveis para enfrentar todos os desafios decorrentes do projeto;
- 14) Por fim, ao CNPq e a FAPESP pela concessão da bolsa para a realização deste projeto.

Meus sinceros, obrigada.

RESUMO

NASCIMENTO, T. **Ocorrência e diversidade de bactérias gram-negativas multirresistentes em ambientes aquáticos públicos no estado de São Paulo.** 2015. 80 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

A resistência bacteriana é uma ameaça global que afeta diretamente à saúde pública, cujas atividades antropogênicas relacionadas ao uso destes compostos tem favorecido para que ambientes aquáticos sejam importantes locais para a seleção e disseminação de bactérias multirresistentes (MRs), assim como, para a aquisição e transferência de elementos genéticos associados. A resistência aos beta-lactâmicos e às fluoroquinolonas tem sido de grande preocupação, pois são considerados tratamento de escolha para um grande número de infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS). Deste modo, visando contribuir com informações referentes à disseminação de bactérias gram-negativas MRs no ambiente, o presente estudo teve por objetivo monitorar a sua ocorrência em ambientes aquáticos públicos no estado de São Paulo, caracterizando genótipos de resistência adquirida de importância clínica, mediados por plasmídeos. O perfil de resistência dos isolados bacterianos, identificados por MALDI-TOF, foi avaliado por antibiograma qualitativo (Kirby-Bauer) e quantitativo (CIM) seguindo as recomendações do CLSI. A produção de beta-lactamases adquiridas (ESBL, KPC) foi avaliada fenotipicamente utilizando inibidores específicos. Genes mediados por plasmídeos, conferindo resistência às cefalosporinas de amplo espectro e aos carbapenêmicos, ou codificando resistência às quinolonas (PMQR: *aac(6')-Ib-cr*, *qnr*, *oqxA*, *oqxB*) foram identificados por PCR e sequenciamento. Para *Escherichia coli*, grupos filogenéticos de virulência foram determinados por PCR, enquanto que a origem clonal de espécies representativas foi determinada por ERIC-PCR e MLST. No período entre outubro/2012 a outubro/2013, foram coletadas amostras de água superficial de ambientes aquáticos com acesso público, em cinco diferentes locais situados no estado de São Paulo. Dentre os 50 isolados de bactérias gram-negativas recuperadas, 35 (70%) isolados (enterobactérias e bactérias não fermentadoras) apresentaram perfil de multirresistência, identificando-se os genes *bla*_{CTX-M-2} (*n*= 5), *bla*_{CTX-M-9} (*n*= 1), *bla*_{CTX-M-15} (*n*= 2), *bla*_{KPC-2} (*n*= 3), *qnrB* (*n*= 1), *oqxA* (*n*= 3), *oqxB* (*n*= 3) e, *aac(6')Ib-cr* (*n*= 7). Enquanto que a diversidade clonal de *E. coli* produtora de CTX-M foi associada com grupos filogenéticos de baixa virulência, a presença de *Klebsiella pneumoniae* produtora de KPC-2 foi associada com cepas pertencentes ao complexo clonal CC11 (ST11), endêmico em hospitais brasileiros. Destaca-se também a primeira detecção de KPC-2 em *Acinetobacter calcoaceticus*. Desta forma, ambientes aquáticos de acesso público podem ser importantes fontes para a disseminação e/ou transmissão de uma ampla variedade de espécies bacterianas MRs, e/ou seus determinantes genéticos de resistência, tanto para seres humanos como para ecossistemas associados, sendo que a presença de genótipos endêmicos sugere contaminação por esgoto doméstico e/ou hospitalar.

Palavras-chave: Beta-lactamases. PMQR. Ambiente Aquático. Resistência aos Antibacterianos. Cefalosporinas. Carbapenêmicos. Fluoroquinolonas. Gram-Negativos.

ABSTRACT

NASCIMENTO, T. **Ocurrence and diversity of multidrug-resistant gram-negative bacteria in public aquatic environments in southeastern Brazil.** 2015. 80 p. Masters thesis (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Bacterial resistance is a global threat that directly affects the public health, whose anthropogenic activities, related to the use of these compounds, have contributed to the selection and spread of multidrug-resistant (MDR) and/or for the acquisition and transfer of resistance genes, into the aquatic environment. Of particular concern has been the resistance to beta-lactam and fluoroquinolone antibiotics, considered the treatment of choice for a large number of healthcare-associated infections. In order to contribute with information about the spread of MDR gram-negative bacteria in the environment, this study aimed to monitor its occurrence in public aquatic environments, in the state of São Paulo, characterizing clinically important genotypes of acquired (plasmid-mediated) resistance. The antimicrobial susceptibility profile of the bacterial isolates, which were previously identified by MALDI-TOF, was assessed by qualitative (Kirby-Bauer) and quantitative (CIM) susceptibility methods (CLSI). Production of acquired beta-lactamases (ESBL, KPC) was phenotypically assessed by using specific inhibitors. Plasmid-mediated genes, conferring resistance to broad-spectrum cephalosporins and carbapenems, or encoding resistance to quinolones (PMQR: *aac(6')-Ib-cr*, *qnr*, *oqxA*, *oqxB*) were identified by PCR and sequencing. While, phylogenetic groups of *Escherichia coli* were determined by PCR, the clonal origin of representative species was determined by ERIC-PCR and MLST. From October/2012 to October/2013, surface water samples from aquatic environments with public access were collected from five different places, in the state of São Paulo. Of the 50 gram-negative isolates recovered, 35 (70%) isolates (including, non-fermentative bacteria and *Enterobacteriaceae*) exhibited a MDR profile. Indeed, *bla*_{CTX-M-2} (*n*= 5), *bla*_{CTX-M-9} (*n*= 1), *bla*_{CTX-M-15} (*n*= 2), *bla*_{KPC-2} (*n*= 3), *qnrB* (*n*= 1), *oqxA* (*n*= 3), *oqxB* (*n*= 3) and *aac(6')-Ib-cr* (*n*= 7) genes were identified. On the other hand, while clonal diversity among CTX-M-producing *E. coli* was associated with a low-virulence phylogenetic background, the presence of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* was associated with the MDR clonal complex CC11 (ST11), endemic in Brazilian hospitals. Finally, we report the first detection of KPC-2-producing *Acinetobacter calcoaceticus*. Aquatic environments, with public access, may be important sources for the dissemination and/or transmission of a wide variety of MDR bacterial species, and/or their genetic determinants of resistance to both humans and associated ecosystems. Moreover, the presence of endemic genotypes suggests contamination by domestic and/or hospital sewage.

Keywords: Beta-lactamases. PMQR. Aquatic Environment. Antibiotic Resistance. Cephalosporins. Carbapenems. Fluoroquinolones. Gram-Negative Bacteria.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Esquema de situações que contribuem para a resistência aos antibióticos	18
Figura 2. Exemplos de estruturas químicas representativas de cefalosporinas de 1 ^a a 5 ^a geração	19
Figura 3. Número de variantes de beta-lactamases (dos grupos funcionais 1, 2 e 3) identificadas em função do tempo (1970 a 2009)	21
Figura 4. Distribuição das variantes de ESBL no Brasil	25
Figura 5. Estruturas químicas representativas de quinolonas e fluoroquinolonas	28
Figura 6. Fluxograma da Metodologia Etapa 1 – Ensaios Fenotípicos	32
Figura 7. Esquema do método de filtração, isolamento e identificação de bactérias gram-negativas	34
Figura 8. Fluxograma da Metodologia Etapa 2 – Ensaios Genotípicos	39
Figura 9. Teste fenotípico para triagem de KPC (<i>Klebsiella pneumoniae carbapenemase</i>) .	50
Figura 10. Perfil fenotípico de resistência às quinolonas	51
Figura 11. Teste fenotípico para triagem de ESBL (<i>Extended-Spectrum Beta-Lactamase</i>) ..	53
Figura 12. Perfil genotípico obtido por ERIC-PCR de <i>E. coli</i>	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Relação de locais onde foram coletadas as amostras de água no estado de São Paulo.....	33
Tabela 2. Antimicrobianos utilizados no teste de susceptibilidade através do teste de Kirby-Bauer	36
Tabela 3. Iniciadores específicos para determinantes de resistência	41
Tabela 4. Iniciadores específicos para os genes determinantes dos grupos filogenéticos	42
Tabela 5. Esquema de classificação de grupos filogenéticos para <i>Escherichia coli</i>	43
Tabela 6. Iniciadores específicos para o MLST de <i>Escherichia coli</i> (<i>The University of Warwick - MLST Databases at UoW</i>)	45
Tabela 7. Iniciadores específicos para o MLST para <i>Klebsiella pneumonia</i> (Instituto Pasteur - MLST Databases)	46
Tabela 8. Identificação de bactérias gram-negativas isoladas das amostras de água, realizada por MALDI-TOF® e perfil de resistência avaliado pelo método de Kirby-Bauer	48
Tabela 9. Percentual de resistência das bactérias gram-negativas isoladas ($n= 50$), coletadas de 5 locais durante outubro/2012 a outubro/2013	49
Tabela 10. Caracterização fenotípica e genotípica para carbapenemases	50
Tabela 11. Caracterização fenotípica de classes de fluoroquinolonas para os isolados bacterianos gram-negativos recuperados de amostras de água, realizado pelo método de Kirby-Bauer e a CIM, realizada por diluição em ágar para enrofloxacina e por E-test® para ciprofloxacina	52
Tabela 12. Caracterização genotípica de fluoroquinolonas para os isolados bacterianos gram-negativos recuperados de amostras de água e grupo filogenético dos isolados de <i>E. coli</i>	52

Tabela 13. Caracterização fenotípica de ESBL para os isolados bacterianos gram-negativos recuperados de amostras de água, realizado através de CHROMagar® ESBL e a CIM, realizada por E-test® para ceftazidima e por diluição em ágar para ceftiofur	54
Tabela 14. Caracterização genotípica de ESBL para os isolados bacterianos gram-negativos recuperados de amostras de água e grupo filogenético dos isolados de <i>E. coli</i>	54
Tabela 15. Caracterização genotípica de AmpC para os isolados bacterianos gram-negativos recuperados de amostras de água e grupo filogenético dos isolados de <i>E. coli</i> resistentes à cefoxitina	55
Tabela 16. Perfil de virulência, através de análise por grupos filogenéticos, para cepas de <i>Escherichia coli</i>	56
Tabela 17. Classificação do <i>Sequence Type</i> , realizado através da análise de MLST, para cepas de <i>E. coli</i> e <i>K. pneumoniae</i>	57

ABREVIATURAS E SIGLAS

AMI	Amicacina
AMC	Amoxicilina + Ácido clavulânico
AMP	Ampicilina
APB	Ácido Fenil Burónico
ATB	Antibiótico
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATM	Antimicrobianos
<i>bla</i>	Gene codificador de β -lactamases
CAZ	Ceftazidima
CEF	Ceftiofur
CIP	Ciprofloxacina
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standard Institute</i>
CIM	Concentração inibitória mínima
CFO	Cefoxitina
CRO	Ceftriaxona
CTX	Cefotaxima
DNA	Ácido desoxiribonucleico
dNTPp	Deoxinucleotídeo trifosfato
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ENO	Enrofloxacina
ESBL	<i>Extended-Spectrum Beta-Lactamases</i>
CPM	Cefepime
CTX	Cefotaxima
GEN	Gentamicina
IMP	Imipenem
ITU	Infecção do Trato Urinário
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae carbapenemase</i>
MLST	Multilocus sequence typing
MR	Multirresistente

ml	Mililitro
mm	Milímetros
NAL	Ácido nalidíxico
nd	Não determinado
pb	Pares de bases
PBP	<i>Penicilium Binding Protein</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PMQR	<i>Plasmid Mediated Quinolone-Resistant</i>
rpm	Rotações por minuto
ST	<i>Sequence type</i>
SUT	Sulfametoxazol-Trimetoprim
TET	Tetraciclina
UV	Ultravioleta
µg	Micrograma

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	Antibióticos beta-lactâmicos	18
1.1.1	<i>Classificação dos beta-lactâmicos</i>	<i>19</i>
1.1.2	<i>Mecanismo de ação dos beta-lactâmicos</i>	<i>20</i>
1.1.3	<i>Resistência bacteriana aos antibióticos beta-lactâmicos mediada por beta-lactamases</i>	<i>20</i>
1.1.4	<i>Classificação das beta-lactamases.....</i>	<i>21</i>
1.1.5	<i>Resistência adquirida por beta-lactamases de amplo espectro (ESBL)</i>	<i>22</i>
1.1.6	<i>Resistência adquirida por carbapenemases.....</i>	<i>23</i>
1.1.7	<i>Panorama mundial de ESBL e carbapenemases em ambientes aquáticos</i>	<i>24</i>
1.1.8	<i>Identificação de ESBLs no Brasil: impacto clínico e ambiental</i>	<i>24</i>
1.1.9	<i>Identificação de carbapenemases no Brasil: impacto clínico e ambiental</i>	<i>26</i>
1.2	Fluoroquinolonas (FQ)	27
1.2.1	<i>Mecanismo de ação das fluoroquinolonas</i>	<i>28</i>
1.2.2	<i>Mecanismos de resistência adquirida às fluoroquinolonas: PMQR (Plasmid-Mediated Quinolone Resistance).....</i>	<i>29</i>
1.2.3	<i>PMQR no Brasil: impacto clínico e ambiental</i>	<i>30</i>
2	OBJETIVOS	31
2.1	Objetivos Gerais	31
2.2	Objetivos Específicos	31
3	MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1	Amostras de água	33
3.2	Método de filtração e isolamento de bactérias gram-negativas de interesse.....	33
3.3	Identificação das espécies por MALDI-TOF®	34
3.4	Armazenamento das espécies isoladas	35
3.5	Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos.....	35
3.5.1	<i>Antibiograma (Kirby-Bauer).....</i>	<i>35</i>
3.5.2	<i>E-test®.....</i>	<i>36</i>
3.5.3	<i>Macrodiluição em Ágar.....</i>	<i>37</i>
3.6	Detecção de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL)	37
3.7	Detecção de <i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase (KPC).....	38

3.8	Extração de DNA total bacteriano para análises moleculares.....	40
3.9	Amplificação de genes de resistência aos antibióticos por PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>).....	40
3.10	Determinação do grupo filogenético de <i>E. coli</i>	42
3.11	Avaliação da relação clonal por ERIC-PCR	43
3.12	Técnica de <i>Multilocus Sequence Typing</i> (MLST).....	44
3.12.1	MLST para <i>Escherichia coli</i>	44
3.12.2	MLST para <i>Klebsiella pneumoniae</i>	45
3.13	Sequenciamento.....	46
4	RESULTADOS	47
4.1	Identificação de bactérias gram-negativas com perfil de resistência às quinolonas e aos beta-lactâmicos de amplo espectro em ambientes aquáticos urbanos.....	47
4.2	Caracterização fenotípica e genotípica de KPC	49
4.3	Caracterização fenotípica e genotípica de PMQR.....	51
4.4	Caracterização fenotípica e genotípica de ESBL	53
4.5	Análise do dendograma	55
4.6	Grupo filogenético de <i>E. coli</i>	56
4.7	Análise do MLST	57
5	DISCUSSÃO	58
6	CONCLUSÃO.....	64
	REFERÊNCIAS	65
	ANEXOS	78

1 INTRODUÇÃO

Bactérias e hospedeiros coexistem dentro de um mesmo ecossistema, estabelecendo interações biológicas harmônicas ou desarmônicas, ambos em constante evolução, decorrente da própria interação e das alterações do ambiente do qual fazem parte. Especificamente, para bactérias comensais ou patogênicas a evolução está associada à adaptação a ambientes hostis, onde mutações genéticas randômicas e/ou direcionadas dão origem a uma seleção natural, mediante a regulação do metabolismo de forma a privilegiar o aparecimento de sistemas de defesa cada vez mais eficazes, resultando na perpetuação das diferentes espécies (BECEIRO; TOMÁS; BOU, 2013).

Assim, surge o conceito de resistência bacteriana, que como um fenômeno ecológico se origina em resposta da bactéria frente ao uso exacerbado de compostos antimicrobianos (antibióticos, antissépticos ou desinfetantes) e por sua presença no meio ambiente (BAQUERO; MARTÍNEZ; CANTÓN, 2008; BUTAYE; CLOECKAERT; SCHWARZ, 2003). Bactérias se multiplicam rapidamente, sofrem mutações e são promíscuas geneticamente, podendo trocar material genético entre linhagens da mesma espécie ou de espécies diferentes através dos processos de conjugação, transformação ou transdução (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010; WOODFORD et al., 2013; ZHANG; ZHANG; FANG, 2009).

Consequentemente, existe na atualidade um aumento exponencial de infecções causadas por bactérias resistentes a antibióticos, muitas das quais estão sendo identificadas em ambientes aquáticos, o que deve ser considerado um problema de saúde pública, visto que afeta a medicina humana e veterinária (AIZAWA et al., 2014; CAMARGO; GILMORE; DARINI, 2006; DROPA et al., 2010; FONTES et al., 2011b; LEIGUE et al., 2014; MINARINI et al., 2007, 2008; OLIVEIRA et al., 2014).

A disseminação de bactérias multirresistentes pode ocorrer em diversos nichos ecológicos, sendo o ambiente aquático extremamente eficaz para esta seleção. Este ambiente é propenso a constantes mudanças e, quando relacionadas à urbanização, é suscetível a ações antropogênicas que exercem uma pressão seletiva, favorecendo a evolução destes microrganismos com relação ao processo de adaptação a diversos agentes antimicrobianos (WOODFORD et al., 2013).

Dentre as alterações antropogênicas no ambiente que contribuem para a disseminação e resistência bacteriana, destacam-se duas vertentes: I) a utilização do ambiente aquático como depósito de resíduos industriais (ex. alterações drásticas da sua composição química, desestabilização da proporção de acidez e da distribuição de oxigênio); e II) contaminação por resíduos humanos (doméstico ou hospitalar) contendo, principalmente, esgoto (BAQUERO; MARTÍNEZ; CANTÓN, 2008; LAPARA et al., 2011; LU et al., 2010).

Desta forma, microrganismos patogênicos são veiculados pelas águas e através da troca de genes de resistência, por meio de elementos genéticos móveis, tem adquirido um fenótipo de multirresistência que pode contribuir para o estabelecimento de infecções em humanos e animais (CABRAL, 2010).

Apesar de existir critérios de qualidade da água utilizada para consumo (WHO, 2011), no cenário atual estes padrões não são sempre empregados. Consequentemente, grande parcela da população é suscetível à exposição à água potencialmente contaminada, o que do ponto de vista sanitário deveria ser considerado como um grave problema de saúde pública (WALSH et al., 2011).

O consumo de antibióticos na medicina humana e veterinária tem aumentado nos últimos anos, seja pelo consumo direto na prática médica ou pelo seu uso na produção agropecuária (ALI ABADI; LEES, 2000). Desta forma, o hospedeiro que entra em contato com o antimicrobiano, seja diretamente pela exposição ao composto ou indiretamente pela ingestão de alimentos que possam conter resquícios do mesmo, pode apresentar uma modificação na sua microbiota, que se traduz na seleção de microrganismos resistentes aos antibióticos expostos.

Tanto a eliminação de resíduos antimicrobianos, quanto a própria descarga de bactérias resistentes e/ou seus determinantes de resistência, veiculados, por exemplo, pelo esgoto, acabam contribuindo com a modificação do ecossistema, principalmente no ambiente aquático (Figura 1) (BAQUERO; MARTÍNEZ; CANTÓN, 2008; GUSATTI et al., 2009; LUBICK, 2011; WALSH et al., 2011).

Figura 1. Esquema de situações que contribuem para a resistência aos antibióticos, onde o intercâmbio de informação genética e a recombinação moldam a evolução da resistência. Bactérias provenientes da microbiota humana/animal (círculo preto) se misturam com bactérias ambientais (círculo branco), levando ao aumento da variação genética, o que possibilita para o aparecimento de novos mecanismos de resistência que podem ser reintroduzidos em ambientes humanos e animais (setas laterais). Adaptado de BAQUERO, MARTÍNEZ e CANTÓN, 2008.

1.1 Antibióticos beta-lactâmicos

Antibióticos beta-lactâmicos são largamente prescritos na clínica humana e veterinária. A principal razão do seu uso massivo é devido ao amplo espectro de atividade antibacteriana e por suas características farmacocinéticas e farmacodinâmicas que apresentam baixa toxicidade (BECEIRO; TOMÁS; BOU, 2013; BROLUND, 2014; LIVERMORE, 1995).

Entre os antibióticos beta-lactâmicos, as cefalosporinas e os carbapenêmicos são prescritos como alternativa terapêutica de última escolha (VON NUSSBAUM et al., 2006).

Consequentemente, a emergência e disseminação de cepas resistentes aos beta-lactâmicos tem sido gradual em função do tempo de uso e do tipo de beta-lactâmico lançado no mercado (DALMARCO; BLATT; CÓRDOVA, 2006; DRAWZ; BONOMO, 2010; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ; GONZALEZ-LOPEZ, 2014; NORDMANN; NAAS; POIREL, 2011; SILVA; LINCOPAN, 2012; ZHANG; ZHANG; FANG, 2009).

1.1.1 Classificação dos beta-lactâmicos

Estes compostos são subdivididos em penicilinas, cefamicinas (cefoxitina), cefalosporinas, monobactâmicos (aztreonam) e carbapenêmicos (ertapenem, imipenem, meropenem, doripenem). As cefalosporinas caracterizam-se pelo seu amplo espectro de ação no combate de uma ampla gama de infecções bacterianas e são classificadas de primeira a quinta geração (Figura 2) (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010; VON NUSSBAUM et al., 2006).

Figura 2. Exemplos de estruturas químicas representativas de cefalosporinas de 1^a a 5^a geração. Exemplos: cefalosporinas de 1^a geração (cefalotina), 2^a geração (cefoxitina), 3^a geração (cefotaxima), 4^a geração (cefepime) e 5^a geração (ceftobiprole). Embora cefoxitina seja estruturalmente uma cefamicina, ela frequentemente é agrupada dentro do grupo de cefalosporinas de segunda geração (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

1.1.2 Mecanismo de ação dos beta-lactâmicos

Esta classe de antibióticos possui em comum, no seu núcleo estrutural, um anel beta-lactâmico que interage com proteínas denominadas PBPs (*Penicillin-Binding Proteins*), que bioquimicamente são representadas por enzimas do tipo transpeptidase. As PBPs são responsáveis pela formação de ligações cruzadas entre as cadeias peptídicas do peptidoglicano, o que confere à parede celular uma estrutura rígida importante para a proteção da célula bacteriana contra as variações osmóticas do meio. Desta forma, o beta-lactâmico, através da inibição da síntese da parede celular bacteriana e da perda de rigidez da mesma, confere atividade bactericida (BECEIRO; TOMÁS; BOU, 2013; DRAWZ; BONOMO, 2010; GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

A natureza química da cadeia lateral dos beta-lactâmicos define o seu espectro de ação e propriedades farmacológicas. Portanto, modificações estruturais nas cadeias laterais destes compostos podem modular: a estabilidade em meio ácido (fundamental para a atividade por via oral destes fármacos); a estabilidade frente às beta-lactamases (enzimas bacterianas relacionadas à resistência, que hidrolisam o grupo farmacofórico destes antibióticos); e o espectro de ação frente a bactérias gram-negativas (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010; VON NUSSBAUM et al., 2006).

1.1.3 Resistência bacteriana aos antibióticos beta-lactâmicos mediada por beta-lactamases

Os mecanismos de resistência aos beta-lactâmicos visam impedir a ligação do antibiótico a seu alvo enzimático (PBP) através da impermeabilidade da membrana externa (deleção ou perda de porinas) e/ou ativação de bombas de efluxo e/ou alteração das PBPs e/ou hidrólise direta por beta-lactamases (BECEIRO et al., 2013; GUIMARÃES et al., 2010, WALSH et al., 2011).

Em bactérias gram-negativas a produção de beta-lactamases é o principal mecanismo de resistência contra estes compostos, e dentre as diferentes classes de enzimas as mais prevalentes são as beta-lactamases de amplo espectro (ESBL) que pertencem à classe molecular A de Ambler (grupo funcional 2be) (Figura 3) (BUSH; JACOBY, 2010).

Figura 3. Número de variantes de beta-lactamases (dos grupos funcionais 1, 2 e 3) identificadas em função do tempo (1970 a 2009). Cefalosporinases do grupo funcional 1/Classe molecular C (linha preta). Beta-lactamases do grupo 2/Classe A e D (linha azul). Metallo-beta-lactamases do grupo 3/classe B (linha vermelha). Adaptado de BUSH e JACOBY, 2010.

1.1.4 Classificação das beta-lactamases

Embora bioquimicamente as beta-lactamases sejam divididas em metalo-enzimas ou serino-enzimas, dependendo do sítio catalítico, a sua classificação atual é baseada nos esquemas propostos por Ambler (molecular, baseada na sequência de aminoácidos) e por Bush e Jacoby (classificação funcional baseada na especificidade de substrato e no perfil de inibição) (BUSH; JACOBY, 2010):

- I. a **classificação molecular** é baseada na sequência de aminoácidos e divide estas enzimas em quatro classes (A, B, C e D), nas quais as enzimas podem utilizar serina como resíduo catalítico para a hidrólise do anel beta-lactâmico (classes A, C e D), ou as metalo- β -lactamases (classe B), na qual a enzima requer como substrato íons de zinco divalentes (AMBLER et al., 1991);
- II. a **classificação funcional** é dividida em três grupos, considerando o substrato e o perfil de inibição enzimático a fim de agrupar as enzimas de forma com que possam ser correlacionadas com o seu fenótipo (BUSH; JACOBY; MEDEIROS, 1995).

Neste sistema atualizado, o grupo 1 (classe C) inclui as cefalosporinas; no grupo 2 (classes A e D) estão as cefalosporinas de amplo espectro, as resistentes aos inibidores comerciais (ex. clavulanato e tazobactam), as beta-lactamases de espectro estendido, e as serino-carbapenemases; e o grupo 3 que abrange as metalo- β -lactamases. Vários novos subgrupos de cada um dos principais grupos foram descritos, com base em atributos específicos para cada enzima (BUSH; JACOBY, 2010).

1.1.5 Resistência adquirida por beta-lactamases de amplo espectro (ESBL)

Membros da família *Enterobacteriaceae* comumente expressam beta-lactamases de espectro restrito, porém, o uso massivo das cefalosporinas, muitas vezes utilizadas como último recurso em esquemas terapêuticos instaurados em humanos e animais (BUSH; JACOBY; MEDEIROS, 1995; LIVERMORE, 1995) levou ao aparecimento e disseminação de beta-lactamases de amplo espectro (ESBLs), que conferem resistência às penicilinas e cefalosporinas, sendo codificadas por plasmídeos (MEDEIROS; CRELLIN, 1997). Este tipo de enzima tem sido prevalente em membros da família *Enterobacteriaceae*, como em *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, e também em bacilos gram-negativos não fermentadores de glicose, como *Pseudomonas aeruginosa* (AMBLER, 1980; PFEIFER; CULLIK; WITTE, 2010).

As ESBLs, geralmente podem ser bloqueadas por inibidores de beta-lactamases como, por exemplo, clavulanato, sulbactam e tazobactam (DHANJI et al., 2010; WARREN et al., 2008).

Com relação às variantes enzimáticas, existe uma alta prevalência de enzimas do tipo TEM e SHV, porém nos últimos anos seguindo uma tendência mundial ESBL do tipo CTX-M tem adquirido um caráter endêmico, destacando-se a endemicidade de CTX-M-15 na Europa, assim como, a disseminação de CTX-M-2, na América Latina (NASEER; SUNDSFJORD, 2011; VILLEGAS et al., 2008).

Ampla diversidade de variantes ESBL já foi descrita, por exemplo, para ESBL do tipo CTX-M (pertencentes ao grupo 2be) existem aproximadamente 158 variantes (<http://www.lahey.org/>).

1.1.6 Resistência adquirida por carbapenemases

A resistência aos carbapenêmicos em enterobactérias e em bactérias não fermentadoras é um problema de saúde pública de âmbito mundial, particularmente pela elevada mortalidade associada e pelo reduzido número de opções terapêuticas (NORDMANN; NAAS; POIREL, 2011; NORDMANN et al., 2011).

Dentre os mecanismos de resistência aos carbapenêmicos (doripenem, ertapenem, imipenem e meropenem) a produção de carbapenemases tem apresentado um impacto significativo na saúde humana, seja por sua eficiência hidrolítica, pela sua codificação por genes localizados em elementos genéticos móveis como plasmídeos e transposons, ou pela sua rápida disseminação em âmbito mundial, além de poderem hidrolisar efetivamente grande parte dos beta-lactâmicos (QUEENAN; BUSH, 2007). Na identificação presuntiva, carbapenemases do tipo serina (KPC) e MBLs podem ser detectadas fenotipicamente utilizando inibidores específicos como ácido fenil borônico (APB) e EDTA, respectivamente.

Em enterobactérias, três grandes tipos de carbapenemases foram identificados no mundo inteiro: I) as metalo-beta-lactamases, sendo os tipos IMP, VIM e NDM os mais frequentemente detectados; II) as OXA-carbapenemases, sendo a mais frequente em enterobactérias a OXA-48; e III) as carbapenemases do tipo KPC, cuja variante KPC-2 é a mais prevalente (ANVISA, 2013).

Em *Acinetobacter* spp, as oxacilinasases da classe D (OXA-23, OXA-58, OXA-72 e OXA-143) são de grande importância (KARAH et al., 2011; MEDEIROS; LINCOPAN, 2013).

O contexto genético das carbapenemases é baseado no princípio de que genes cassetes são carregados por integrons classe 1 (*bla_{VIM}* e *bla_{IMP}* codificando para MBLs) ou transposons (ex. *Tn4401* carregando o gene *bla_{KPC}* que codifica para carbapenemase do tipo serina), os quais são transferidos por plasmídeos conjugativos, dado confirmado em estudos utilizando cepas isoladas de amostras clínicas e de rios urbanos no Brasil (ANDRADE et al., 2011; LINCOPAN et al., 2005, 2006; OLIVEIRA et al., 2014; PICÃO et al., 2013).

1.1.7 Panorama mundial de ESB� e carbapenemases em ambientes aquáticos

No panorama mundial, a presença de bactérias produtoras de ESB� no ambiente aquático foi reportada em rios urbanos na China (LU et al., 2010), e em outros ambientes aquáticos, como águas superficiais, residuais e domiciliares, na Malásia (TISSERA; LEE, 2013), na África (ALOUACHE et al., 2014) e na Índia (TALUKDAR et al., 2013), respectivamente.

Por outro lado, uma urgência epidemiológica esta sendo a identificação de beta-lactamases do tipo KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) em isolados recuperados de rios localizados na França (GIRLICH; POIREL; NORDMANN, 2010), Portugal (POIREL et al., 2012) e no Brasil (OLIVEIRA et al., 2014); e de amostras de esgoto na China (ZHANG; LU; ZONG, 2012), no Brasil (CHAGAS et al., 2011; PICÃO et al., 2013) e na Áustria (GALLER et al., 2014); assim como, a descrição de bactérias produtoras de metalo-beta-lactamases do tipo NDM (New Delhi metalo-beta-lactamase) em água para consumo em Nova Deli, na Índia (JOHNSON; WOODFORD, 2013; WALSH et al., 2011) e em um rio localizado no Vietnã (ISOZUMI et al., 2012).

1.1.8 Identificação de ESB�s no Brasil: impacto clínico e ambiental

No Brasil, a produção de ESB�s em bactérias gram-negativas é alarmante, uma vez que variantes do tipo TEM, SHV, CTX-M, OXA, BES, GES e VEB foram descritas (Figura 4) (LEIGUE et al., 2015; SILVA; LINCOPAN, 2012). Em relação à família *Enterobacteriaceae*, o isolamento de ESB�s é descrito em diversos patógenos de origem hospitalar e comunitária. Contudo, o ponto de urgência clínica tem sido a alta prevalência de ESB�s em *Klebsiella* spp. e *Escherichia coli*, os principais enteropatógenos associados às IRAS (infecções relacionada a assistência à saúde) (SILVA; LINCOPAN, 2012).

Com relação ao grupo predominante de ESB�, CTX-M, durante muito tempo as variantes mais frequentemente identificadas em território brasileiro eram os grupos CTX-M-2, CTX-M-8 e CTX-M-9 (SILVA; LINCOPAN, 2012), porém, nos últimos anos, a variante CTX-M-15 tem aparecido com maior frequência denotando uma tendência a constituir-se na principal ESB� isolada em enterobactérias (LEIGUE et al., 2015).

No Brasil, a presença de bactérias produtoras de ESB� em esgoto hospitalar (PRADO et al., 2008) e a presença de genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, e *bla*_{CTX-M} em efluente hospitalar

(CHAGAS et al., 2011) foi reportada no estado do Rio de Janeiro. Em Porto Alegre-RS, cepas multirresistentes de *Acinetobacter* spp produtoras de ESBLs foram identificadas em amostras de efluente hospitalar (GUSATTI et al., 2009).

Estes resultados evidenciam que os sistemas de remoção de microrganismos resistentes não possuem eficácia satisfatória, permitindo, dessa forma, que esgotos hospitalares se tornem rotas de disseminação de bactérias multirresistentes e/ou genes de resistência para o meio ambiente, contaminando fontes de água e, conseqüentemente, causando um impacto negativo na saúde pública (CHAGAS et al., 2011; GUSATTI et al., 2009; PICÃO et al., 2013).

Figura 4. Distribuição das variantes de ESBL no Brasil. As variantes sem destaque representam isolados recuperados de humanos, enquanto que as variantes em negrito representam isolados recuperados de animais e as variantes sublinhadas representam isolados recuperados de humanos e animais (LEIGUE et al., 2015).

1.1.9 Identificação de carbapenemases no Brasil: impacto clínico e ambiental

A disseminação de enterobactérias produtoras de KPC é um grave problema clínico e epidemiológico em diversas instituições de saúde brasileira. Desde a descrição inicial de KPC no Brasil (MONTEIRO et al., 2009; PAVEZ; MAMIZUKA; LINCOPAN, 2009), várias publicações tem demonstrado a sua disseminação em todo o país. Carbapenemases do tipo KPC-2 estão sendo frequentemente identificadas em diversos gêneros e espécies bacterianas de isolados clínicos de enterobactérias, como *Klebsiella pneumoniae* (ANDRADE et al., 2011; PAVEZ; MAMIZUKA; LINCOPAN, 2009; PEIRANO et al., 2009, PEREIRA et al., 2013), *Enterobacter cloacae* (ZAVASCKI et al., 2009) e *Kluyvera georgiana* (RIBEIRO et al., 2012); e em bactérias gram-negativas não fermentadoras como *Pseudomonas aeruginosa* (JÁCOME et al., 2012) e *Pseudomonas putida* (ALMEIDA et al., 2012).

Casos esporádicos de *K. pneumoniae* produtoras da metalo-beta-lactamase IMP-1 (LINCOPAN et al., 2006; PENTEADO et al., 2009), de *Pseudomonas aeruginosa* produtoras de metalo-beta-lactamase SPM (GALES et al., 2003), e de *Acinetobacter baumannii* produtora de OXA-23 e OXA-143 também foram reportados (ANTONIO et al., 2011; DALLA-COSTA et al., 2003).

No ambiente aquático, no Brasil, bactérias produtoras de carbapenemases do tipo KPC-2 foram identificadas nos estados do Rio de Janeiro (PICÃO et al., 2013; MONTEZZI et al., 2015) e em São Paulo (OLIVEIRA et al., 2014).

Mais recentemente cepas de *A. baumannii* OXA-23 e *P. aeruginosa* SPM-1 foram isoladas em amostras de água coletadas em rios urbanos do estado de São Paulo, sendo que estas cepas apresentaram similaridade genética com isolados clínicos, o que denota o potencial de disseminação hospital-ambiente-comunidade (FONTES et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2011). Aparentemente, a problemática relacionada à disseminação de bactérias produtoras de KPC-2 tem sido subestimada. De fato, recentes estudos realizados no estado do Rio de Janeiro reportaram a presença de *Klebsiella spp.*, produtora de KPC em ambientes aquáticos do litoral (praias) e em esgoto hospitalar (MONTEZZI et al., 2015; CHAGAS et al., 2011).

Estes dados elucidam quanto à disseminação de bactérias hospitalares para ambientes aquáticos e ecossistemas associados. E a detecção desses casos no meio ambiente aponta para a necessidade de controle da disseminação desse tipo de mecanismo de resistência no Brasil (ANVISA, 2013).

1.2 Fluoroquinolonas (FQ)

Fluoroquinolonas (FQ) são agentes antibacterianos bactericidas sintéticos, ou seja, são considerados quimioterápicos e são amplamente utilizados na medicina humana e veterinária. Sendo que o aumento do consumo de FQ é proporcional ao aumento dos mecanismos de resistência para as mesmas (LINDER et al., 2005; NEUHAUSER et al., 2003).

A ciprofloxacina foi a primeira fluoroquinolona lançada no mercado, com amplo espectro de atividade, sendo considerada o agente antimicrobiano mais consumido em todo o mundo dentre da classe das fluoroquinolonas (JACOBY; STRAHILEVITZ; HOOPER, 2014; KIFFER et al., 2011).

Alguns autores classificam as quinolonas em diferentes gerações com base em seu espectro de atividade e data de comercialização (Figura 5) (BALL, 2000). A primeira geração de quinolona foi representada pelo ácido nalidíxico, o qual foi descoberto em 1962 (LESHER et al., 1962). No entanto, seu uso foi restrito ao tratamento de infecções do trato urinário (ITUs), produzidos por enterobactérias, devido ao seu restrito espectro de atividade. Assim, foram sintetizadas as quinolonas de segunda geração, denominadas de fluoroquinolonas, uma vez que foi adicionado um átomo de flúor na posição C-6 do núcleo da estrutura de quinolona (PATON; REEVES, 1988).

As FQs de segunda geração (ex. norfloxacina, ofloxacina, ciprofloxacina e enrofloxacina e levofloxacina) apresentam níveis séricos elevados e mostram alta atividade contra gram-negativos, gram-positivas e espécies de bactérias intracelulares. Além disso, a ciprofloxacina e a levofloxacina são ativas contra *Pseudomonas aeruginosa*. Recentemente, FQs de terceira e quarta geração (ex. moxifloxacina, trovafloxacina, gatifloxacina e gemifloxacina) foram desenvolvidas apresentando um aumento da atividade contra as bactérias gram-positivas e potente atividade contra bactérias anaeróbicas (VAN BAMBEKE et al., 2005). Como resultado da sua atividade de espectro estendido, da farmacocinética destes agentes e de suas propriedades metabólicas, as FQs são utilizadas por via oral ou por via intravenosa para tratar uma grande variedade de infecções (ANDRIOLE, 2005; VAN BAMBEKE et al., 2005).

Figura 5. Estruturas químicas representativas de quinolonas e fluoroquinolonas. Adaptado de CATTOIR e NORDMANN, 2009.

1.2.1 Mecanismo de ação das fluoroquinolonas

O alvo das quinolonas e fluoroquinolonas são as enzimas topoisomerases: DNA girase (topoisomerase II) e DNA topoisomerase IV. Estas enzimas regulam o superenrolamento do DNA e medeiam a segregação das fitas replicadas de DNA, portanto, são essenciais para o crescimento bacteriano. A associação das quinolonas a estas enzimas impede que as mesmas exerçam a sua função, levando ao efeito bactericida (DRLICA; ZHAO, 1997).

DNA girase e DNA topoisomerase IV são os principais alvos das quinolonas, respectivamente, em bactérias gram-negativas e em gram-positivas. A DNA girase é uma enzima tetramérica composta por duas subunidades A (GyrA, 97 kDa), codificada pelo gene *gyrA*, e duas subunidades B (GyrB, 90 kDa), pelo gene *gyrB*. Enquanto que a topoisomerase IV possui duas subunidades A (Parc, 75 kDa), codificadas pelo gene *parC*, e duas subunidades B (ParE, 70 kDa), codificadas pelo gene *parE* (DRLICA; ZHAO, 1997; HAWKEY, 2003).

1.2.2 Mecanismos de resistência adquirida às fluoroquinolonas: PMQR (*Plasmid-Mediated Quinolone Resistance*)

A resistência às quinolonas pode ser cromossomal, através de mutações nos genes que codificam para as enzimas bacterianas visadas pelas fluoroquinolonas (DNA girase e DNA topoisomerase IV), ou plasmidial, sendo este mecanismo denominado de PMQR (JOHNSON; SABEL; BURMAN, 2008; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ et al., 2008; ROBICSEK; JACOBY; HOOPER, 2006).

Esta resistência às quinolonas mediada por plasmídeos (PMQR) é codificada por diferentes genes (CATTOIR; NORDMANN, 2009; CAVACO et al, 2009; KIM et al., 2009; MARTINEZ-MARTINEZ et al, 2008; PÉRICHON; COURVALIN; GALIMAND, 2007; ROBICSEK; JACOBY; HOOPER, 2006; YAMANE; WACHINO; SUZUKI, 2007), exemplificados a seguir:

- I) os genes *qnr* (*qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *qnrC* e *qnrD*) que codificam a expressão de proteínas que protegem alostericamente a DNA girase e a topoisomerase IV da inibição por quinolonas;
- II) o gene *qepA* que codifica para a expressão de uma bomba de efluxo envolvida na expulsão das fluoroquinolonas para fora da célula bacteriana;
- III) os genes *oqxA* e *oqxB* que codificam a expressão do sistema de bomba de efluxo OqxAB;
- IV) o gene *aac(6')-Ib-cr* que codifica um aminoglicosídeo acetiltransferase capaz de acetilar e subsequentemente reduzir a atividade de norfloxacin e ciprofloxacina. Esse gene originou-se como uma subvariante de outra acetilase, *aac(6')-Ib*, e é caracterizado por duas mutações pontuais que permitem a ligação ao sítio ativo da molécula com posterior acetilação (ROBICSEK; STRAHILEVITZ; JACOBY, 2006; VETTING et al., 2008; WARBURG; KOREM).

A resistência às quinolonas mediada por PMQR reportada em águas residuais, na produção suína, na China, indica uma via em potencial de resistência bacteriana na agricultura (LI et al, 2012). Outras pesquisas tem evidenciado a presença de genes *qnr* em amostra de água ambiental e em fezes de frango na Espanha (MARTI; BALCAZAR, 2013), assim como, a presença de *oqxAB* em isolados de *Escherichia coli* obtidos de amostras animais, trabalhadores agrícolas e do meio ambiente na China (ZHAO et al., 2010).

1.2.3 PMQR no Brasil: impacto clínico e ambiental

No Brasil, o aumento de infecções no trato urinário (ITU) causadas por bactérias resistentes as FQs tem crescido alarmantemente, na clínica humana, incluindo em pacientes ambulatoriais (MINARINI et al., 2008) e na clínica veterinária (MELO; LINCOPAN, 2013).

A resistência às quinolonas associada com PMQR foi relatada pela primeira vez, no Brasil, em 2006, sendo identificado o gene *qnrA1* em cepas de *Escherichia coli* (CASTANHEIRA et al., 2006).

Outros estudos tem reportado um percentual de positividade para os genes *aac(6')-Ib-cr* e *qnrB* de 44% e 16%, respectivamente, em isolados de *E. coli* resistentes à ciprofloxacina recuperadas de amostras hospitalares do Rio de Janeiro (PEIRANO et al., 2011).

Enquanto que a presença dos genes *qnrA1* e *qnrB19* foi reportada em cepas de *Salmonella enterica* isoladas de aves domésticas, humanos e alimentos de origem animal, onde 88,8% das cepas apresentaram resistência ao ácido nalidíxico e 23,01% mostraram susceptibilidade reduzida à ciprofloxacina (FERRARI et al., 2011).

Recentemente foi reportada a identificação de genes *qnr* em bactérias gram-negativas isoladas em rios urbanos de São Paulo-SP, alertando para a importância de estudos de vigilância que identifiquem fontes potenciais (FONTES et al., 2011).

Assim, a resistência adquirida aos beta-lactâmicos de amplo espectro e fluoroquinolonas em bactérias gram-negativas parece já não ser restrita aos hospitais, podendo ser um fenômeno dinâmico que se reproduz em ambientes aquáticos suscetíveis à contaminação antropogênica por esgoto doméstico, hospitalar e/ou industrial (BAQUERO; MARTÍNEZ; CANTÓN, 2008; GUSATTI et al., 2009). Desta forma, ambientes aquáticos atingidos por bactérias comensais e patogênicas tornam-se um importante objeto de investigação a ser contemplado por estudos epidemiológicos representativos da atividade antropogênica dos grandes centros urbanos (BAQUERO; MARTÍNEZ; CANTÓN, 2008; CABRAL, 2010; KUMMERER, 2009; PINDI; YADAV; SHANKER, 2013; SOUZA et al., 2009; ZHANG; ZHANG; FANG, 2009).

A priori, a pesquisa direcionada ao estudo da prevalência e diversidade de bactérias gram-negativas multirresistentes em ambientes aquáticos públicos pode contribuir com um problema de saúde negligenciado, uma vez que identifica precocemente fontes ambientais urbanas com potencial para selecionar e disseminar bactérias multirresistentes e/ou seus determinantes genéticos de resistência.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Avaliar a ocorrência e a diversidade de bactérias gram-negativas, com perfil de resistência aos antibióticos de uso humano e veterinário em amostras de água coletadas de ambientes aquáticos de áreas públicas, no estado de São Paulo, investigando os genes relacionados com fenótipos de resistência adquirida aos beta-lactâmicos de amplo espectro e às fluoroquinolonas, e a sua relação clonal com isolados clínicos.

2.2 Objetivos Específicos

- Isolar e identificar bactérias gram-negativas com fenótipo de resistência aos beta-lactâmicos e às fluoroquinolonas em ambientes aquáticos de áreas públicas, no estado de São Paulo;
- Caracterizar o perfil de susceptibilidade, dos isolados recuperados, aos antibacterianos de uso humano e veterinário;
- Caracterizar os principais fenótipos de resistência adquirida aos beta-lactâmicos de amplo espectro (ex. ESBL, KPC) e seus determinantes genéticos de resistência;
- Caracterizar o perfil de resistência às fluoroquinolonas, identificando os genótipos de PMRQ (*aac(6')-Ib-cr*, *oqxAB*, *qepA*, *qnr*);
- Determinar os grupos filogenéticos de virulência para as linhagens de *E. coli*;
- Avaliar a origem clonal das principais espécies bacterianas de importância médica que apresentem genótipos de resistência adquirida prevalentes em hospitais brasileiros.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

A metodologia baseou-se em duas etapas, a primeira referente aos ensaios fenotípicos (Figura 6) e a segunda referente aos ensaios genotípicos (Figura 8).

A **Metodologia Etapa 1** teve como finalidade selecionar isolados bacterianos de interesse para o estudo. Os ensaios realizados, desde a obtenção dos isolados bacterianos até a detecção fenotípica de resistência aos beta-lactâmicos e/ou às fluoroquinolonas, estão apresentados no fluxograma abaixo.

Figura 6. Fluxograma da Metodologia Etapa 1 – Ensaios Fenotípicos.

3.1 Amostras de água

As amostras de água superficiais utilizadas neste projeto foram coletadas de locais públicos (Reservatório Guarapiranga, Universidade de São Paulo – USP, Parque do Ibirapuera, Lindoia) com prévio consentimento da autoridade responsável respectiva (Tabela 1). As amostras de água foram coletadas em frascos estéreis e transportadas sob refrigeração para o laboratório de Resistência Bacteriana do ICB-USP.

Tabela 1. Relação de locais onde foram coletadas as amostras de água no estado de São Paulo.

Localidade	Amostra de água	Coleta Mês/Ano	Coordenadas do Local
Reservatório Guarapiranga	Represa	Outubro/2012	-23.738931, -46.763213
Pirajussara – USP*	Córrego	Novembro/2012	-23.560194, -46.713805
Rua do Lago – USP	Lago	Dezembro/2012	-23.562970, -46.728147
Parque Ibirapuera -1	Lago das Garças	Janeiro/2013	-23.586614, -46.660355
Lindoia	Lago	Janeiro/2013	-22.519504, -46.634953
Parque Ibirapuera -2	Lago das Garças	Janeiro/2013	-23.583498, -46.661394
Parque Ibirapuera -3	Lago das Garças	Outubro/2013	-23.586614, -46.660355

*USP, Universidade de São Paulo.

3.2 Método de filtração e isolamento de bactérias gram-negativas de interesse

Visando à concentração bacteriana, 100 µL das amostras de água coletadas foram filtradas, utilizando membranas de nitrocelulose (Millipore) com poros de 0,45 µm, através da técnica da membrana filtrante (APHA, 2012). Em seguida, a fim de obter apenas crescimento de bactérias gram-negativas, estas membranas foram posicionadas em placas contendo meio de cultura seletivo, Ágar MacConkey, e incubadas a 37 °C por 24 horas.

Para realização do antibiograma qualitativo (Kirby-Bauer), as membranas foram transferidas para caldo Mueller-Hinton, sendo realizada a diluição bacteriana do caldo, para a escala 0,5 de McFarland® (Cefar, São Paulo, 2011). A partir das colônias resistentes aos antibióticos testados e/ou observadas como colônias satélites aos halos de inibição foi realizado um *screening* de resistência, com posterior re-isolamento para obtenção de colônias puras. As placas semeadas foram incubadas a 37 °C durante 24 horas (Figura 7).

A partir destas colônias puras o teste de susceptibilidade aos antimicrobianos foi repetido, determinando de acordo com o perfil fenotípico apresentado, quais os isolados de interesse para o projeto. Os isolados resistentes a quinolonas (PMQR) ou com perfil fenotípico de KPC ou ESBL foram selecionados para serem armazenados, identificados e para posterior caracterização molecular. Meios seletivos como CHROMagar® KPC e

CHROMagar® ESB (Probac do Brasil, São Paulo, 2013), foram utilizados para confirmação do perfil fenotípico de KPC e de ESB, respectivamente.

Figura 7. Esquema do método de filtração, isolamento e identificação de bactérias gram-negativas.

3.3 Identificação das espécies por MALDI-TOF®

A fim de identificar as diversas espécies bacterianas, as culturas puras foram submetidas à técnica de MALDI-TOF® (Bruker Daltonik, Bremen, 2002), sendo esta análise realizada no laboratório Fleury.

O MALDI-TOF® (Matrix Associated Laser Desorption-Ionization – Time of Flight) é um teste de espectrometria de massas baseado no resultado das variações das impressões digitais espectrais entre microrganismos, onde a espécie bacteriana é identificada pelas moléculas de proteínas captadas pelo aparelho. O método consiste em um sistema no qual uma colônia bacteriana é acrescentada em um poço da placa metálica do aparelho onde também é adicionada uma matriz polimérica composta por ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico. Após, essa placa é irradiada com um laser que vaporiza a amostra e há ionização de várias moléculas, que são aspiradas num tubo de vácuo e levadas a um detector: conforme a molécula, o tempo de chegada ao detector (*time of flight*) é diferente. Estes dados gerados são

colocados em um gráfico de picos e, para cada espécie bacteriana, obtém-se um gráfico específico. Através de um software, há a interpretação dos picos e análise da porcentagem de similaridade com as cepas registradas no banco de dados do programa que, por fim, fornece o resultado da espécie bacteriana (PASTERNAK, 2012).

3.4 Armazenamento das espécies isoladas

Após identificação e caracterização fenotípica dos isolados de interesse, os mesmos foram armazenados em duplicatas de criotubos contendo glicerol a 80% na temperatura de -20 °C e em criotubos contendo Ágar TSA semi-sólido (1%) mantidos em temperatura ambiente.

3.5 Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos

O perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos (quinolonas, beta-lactâmicos, tetraciclina, sulfas, aminoglicosídeos) foi avaliado através da caracterização fenotípica por métodos qualitativos (Kirby-Bauer) e quantitativos (concentração inibitória mínima – CIM, através de fitas de E-test® e por microdiluição em ágar) (CLSI, 2013a).

3.5.1 Antibiograma (Kirby-Bauer)

O teste de susceptibilidade microbiana dos isolados foi realizado utilizando o teste de Kirby-Bauer (BAUER et al., 1966). Para a realização do teste, isolados foram diluídos na escala 0,5 de McFarland® e distribuídos de maneira uniforme em placa de Petri contendo Ágar Muller Hinton. Em seguida, discos de antimicrobianos (Tabela 2) foram dispostos na placa com uma distância de 3 cm entre si. Por fim, as placas foram incubadas a 36 °C por 16 horas. O resultado, através dos halos inibição, foi interpretado conforme os padrões descritos no CLSI (2013a). Os antibióticos testados foram da marca Cefar® (São Paulo, 2012).

Tabela 2. Antimicrobianos utilizados no teste de susceptibilidade através do teste de Kirby-Bauer.

Antimicrobiano	Sigla	Concentração do disco (µg)
Amoxicilina + Ácido Clavulânico	AMC	30
Cefoxitina	CFO	30
Cefotaxima	CTX	30
Cotrimoxazol	SUT	25
Ceftriaxona	CRO	30
Ertapenem	ETP	10
Ceftazidima	CAZ	30
Imipenem	IMP	10
Tigeciclina	TIG	15
Ciprofloxacina	CIP	5
Gentamicina	GEN	10
Cefepima	CPM	30
Fosfomicina	FOS	200
Amicacina	AMI	30

3.5.2 *E-test*®

A concentração inibitória mínima (CIM) determinada através de fitas de *E-test*® (Biomérieux, Jacarepaguá, 2012) específicas foi utilizada para a detecção de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) e para PMQR, contendo, respectivamente, diferentes concentrações dos antibióticos ceftazidima e ciprofloxacina. De acordo com o halo de inibição dos antibióticos, o resultado da concentração inibitória mínima foi interpretado pelo CLSI, 2013a.

Para os testes com *E-test*®, os isolados foram submetidos à diluição na escala 0,5 de McFarland®, distribuídos de maneira uniforme em placa contendo Ágar Muller Hinton. Em seguida, tiras de *E-test*® foram sobrepostas ao centro e, por fim, as placas foram incubadas a 36 °C por 16 horas. A interpretação foi realizada a partir do valor obtido no ponto de intersecção entre a elipse de inibição com a borda da fita, segundo a recomendação do fabricante. Os antibióticos testados foram da marca Cefar® (São Paulo, 2012).

3.5.3 Macrodiluição em Ágar

Para os agentes antimicrobianos enrofloxacin e ceftiofur, a CIM foi realizada através da macrodiluição em Ágar. Placas de Mueller Hinton foram preparadas contendo diferentes concentrações seriadas de cada antibiótico de interesse. O padrão de concentração foi obtido através do perfil de resistência de cada espécie registrado na CLSI humana (2013b) e animal (2013a). Os isolados foram incubados em Caldo Mueller Hinton por 24 horas a 36 °C. Posteriormente foi realizada a diluição na escala de 0,5 de McFarland® utilizando o espectrofotômetro, seguida de outra diluição 1:10 em caldo Mueller Hinton. Após, 200 µL dessa suspensão foram transferidos para o replicador/inoculador de *Steers*. As placas de Ágar Mueller Hinton contendo diferentes concentrações de antibióticos foram então inoculadas simultaneamente com os isolados e incubadas em estufa por 16 horas a 36 °C. O resultado da CIM foi determinado como a menor concentração de cada antimicrobiano capaz de inibir o crescimento bacteriano e foi interpretada conforme os critérios de sensibilidade estabelecidos pela CLSI (2013a e 2013b). A cepa de *E. coli* ATCC® 25922 foi utilizada como controle e para validação do teste.

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

A presença de ESBL foi avaliada através de uma triagem por meio do teste de dupla difusão com disco utilizando como substrato, ceftazidima (30 µg), cefotaxima (30 µg), ceftriaxona (30 µg) e cefepima (30 µg) (JARLIER et al., 1998). 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. O resultado foi considerado positivo para os isolados que apresentaram resistência aos antimicrobianos testados e/ou formação da zona de sinergismo, comumente denominada de “zona fantasma” (DALMARCO; BLATT; CÓRDOVA, 2006). Os antibióticos utilizados foram provenientes da marca Probac®.

Para complementar a confirmação da produção de ESBL também foram utilizadas fitas de E-test® e meio seletivo (CHROMagar® ESBL). A interpretação foi realizada de acordo com a presença ou ausência de crescimento da cepa e pela sua coloração no meio, seguindo as recomendações da bula da Probac® do Brasil.

3.7 Detecção de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)

Realizamos uma triagem dos isolados que apresentaram resistência ou foram intermediários aos antibióticos imipenem e/ou ertapenem, através do teste de Kirby-Bauer. Em seguida, para estes isolados selecionados, testes fenotípicos específicos para KPC foram aplicados, como teste de Hodge, teste de APB e CHROMagar® KPC

Para o teste de Hodge, utilizamos uma cepa de *E. coli* ATCC 25922, sensível ao antibiótico imipenem, e após atingir a escala 0,5 de McFarland® e realizar diluição de 1:10, a cepa ATCC foi semeada de forma uniforme na placa contendo Ágar Muller Hinton. Um disco de imipenem (IMP) foi acrescido ao centro da placa e ao redor do disco, com o auxílio de uma alça, foi estriada uma colônia da cepa teste. As placas foram incubadas por 24 h a 37 °C. A interpretação de positividade no teste de Hodge se deu pela observação de crescimento da cepa ATCC ao redor do disco de IMP, pois cepas que produzem carbapenemases degradam a ação do antibiótico IMP e permitem o crescimento da cepa ATCC.

Para o teste com ácido fenilborônico (APB), os isolados foram submetidos à diluição na escala de 0,5 McFarland® e distribuídos de maneira uniforme em placa contendo Ágar Muller Hinton. Em seguida, dois discos de IMP e dois de ceftazidima (CAZ) foram sobrepostos na placa, e em um de cada foi aplicado 10 µl de APB. Por fim, as placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas. A interpretação foi considerada positiva quando houve um aumento de 4 mm no halo do disco contendo APB em relação ao halo do disco de antibiótico correspondente sem APB.

Os antibióticos utilizados nos testes foram provenientes da marca Probac®. Para complementar a confirmação da produção de KPC também foi utilizado o meio seletivo (CHROMagar® KPC). O resultado foi interpretado de acordo com a presença ou ausência de crescimento da cepa e pela sua coloração no meio, seguindo as recomendações da bula da Probac® do Brasil.

Através dos ensaios fenotípicos realizamos a seleção dos isolados bacterianos de interesse do estudo, ou seja, isolados com perfil fenotípico de ESBL, KPC e/ou PMQR. Para estes isolados, foram realizados, adicionalmente, ensaios genotípicos para confirmação genética do perfil de resistência dos mesmos. Os ensaios genotípicos da **Metodologia Etapa 2** constam no fluxograma abaixo (Figura 8).

Figura 8. Fluxograma da Metodologia Etapa 2 – Ensaios Genotípicos.

3.8 Extração de DNA total bacteriano para análises moleculares

Para os testes genotípicos o DNA dos isolados de interesse foi extraído pelo método da fervura (CHAPMAN et al., 2001). A extração de DNA total bacteriano consiste em dispor 2 ml de cultura bacteriana em Eppendorf® (Axygen, Union City, 2012), de isolados previamente incubados em Caldo Mueller Hinton por 24 horas a 36 °C, e submeter a centrifugação durante 15 minutos a 5000 rpm (rotações por minutos) a 4 °C. O precipitado obtido é ressuspensionado em 100 µl de água Milli-Q estéril, submetido à fervura por 10 minutos e posteriormente deixado em banho de gelo por 5 minutos. Em seguida, a suspensão é novamente centrifugada durante 15 minutos a 9000 rpm a 4 °C. O sobrenadante originado, contendo o DNA bacteriano, é então aliquoteado em Eppendorf® e armazenado a temperatura de -20 °C.

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

Isolados que apresentaram resistência aos antibióticos de interesse foram submetidas à pesquisa dos principais genes de resistência pela técnica de PCR. Os iniciadores utilizados constam na Tabela 3.

As reações de amplificação foram realizadas com volume final da reação de 50 µL contendo: 30 µL de H₂O; 5 µL de dNTP; 5 µL de Taq Buffer; 5 µL de MgCl₂; 1 µL do iniciador molde *Foward*, 1 µL do iniciador molde *Reverse* e 0,5 µL da enzima DNA Taq Polimerase para cada 2 µL de DNA testado. Os produtos utilizados para as reações de PCR foram todos da marca Fermentas® (Thermo Fisher Scientific, 2013).

Os genes alvos foram amplificados em termociclador *Mastercycler Gradient* da marca Eppendorf® nas seguintes condições: desnaturação a 94 °C por 5 minutos; 30 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 30 ciclos de anelamento com temperatura específica para cada iniciador, por 1 minuto; 30 ciclos de 72 °C por 1 minuto para extensão; seguido de um passo de extensão final de 72 °C por 5 minutos. Após o término da amplificação, os produtos de PCR foram detectados através de eletroforese em gel de agarose a 1%, correndo em paralelo um marcador de DNA de peso molecular de 100bp (*Fermentas Life Sciences*). Para validação das reações de PCR, utilizamos controles positivos para cada gene, provenientes de cepas previamente caracterizadas por sequenciamento pelo nosso grupo de pesquisa (FONTES et al., 2011b).

Tabela 3. Iniciadores específicos para determinantes de resistência.

<i>Característica</i>	<i>Gene alvo</i>	<i>Sequência do iniciador (5'-3')</i>	<i>Pb*</i>	<i>T(°C)</i>	<i>Referência</i>
ESBL	<i>bla</i> _{CTX-M}	F: CGCTTTGCGATGTGCAG R: ACCCGCGATATCGTTGGT	550	56	BONNET et al., 2001
ESBL	<i>bla</i> _{CTX-M-2}	F: ATGATGACTCAGAGCATTCG R: TGGGTTACGATTTTCGCCGC	865	57	PARK et al., 2005
ESBL	<i>bla</i> _{CTX-M-8}	F: CTGGAGAAAAGCAGCGGGGG R: ACCCACGATGTGGGTAGCCC	580	59	MINARINI et al., 2007
ESBL	<i>bla</i> _{CTX-M-9}	F: ATGGTGACAAAGAGAGTGCA R: CCCTTCGGCGATGATTCT	833	56	GUESSENND et al., 2008
ESBL	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	F: CACACGTGGAATTTAGGGACT R: GCCGTCTAAGGCGATAAACA	995	56	MUZAHEED et al., 2008
ESBL	<i>bla</i> _{SHV}	F: ATGCGTTATATTCGCTGTG R: GTTAGCGTTGCCAGTGCTCG	860	58	MINARINI et al., 2007
ESBL	<i>bla</i> _{TEM}	F: ATGAGTATTCAACATTTCCGTG R: TTACCAATGCTTAATCAGTGAG	860	56	HOSOGLU et al., 2007
Quinolonas	<i>qnrA</i>	F: ATTTCTCACGCCAGGATTTG R: TGCCAGGCACAGATCTTGAC	570	55.5	JACOBY et al., 2009
Quinolonas	<i>qnrB</i>	F: CGACCTKAGCGGCACTGAAT R: GAGCAACGAYGCCTGGTAGYTG	510	60	JACOBY et al., 2009
Quinolonas	<i>qnrD</i>	F: CGAGATCAATTTACGGGGAATA R: AACAAGCTGAAGCGCCTG	580	54	CAVACO et al., 2009
Quinolonas	<i>qnrS</i>	F: ACTGCAAGTTCATTGAACAG R: GATCTAAACCGTCGAGTTCG	430	55	JACOBY et al., 2009
Quinolonas	<i>Aac(6')-1b</i>	F: TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA R: CTCGAATGCCTGGCGTGT	480	55	PARK et al., 2006
Quinolonas	<i>QepA</i>	F: AACTGCTTGAGCCCGTAGAT R: GTCTACGCCATGGACCTCAC	595	57	KIM, 2009
Bomba de Efluxo	<i>oqxA</i>	F: CTTGCACTTAGTTAAGCGCC R: GAGGTTTTGATAGTGGAGGTAGG	865	56	BAO-TAO et al., 2011
Bomba de Efluxo	<i>oqxB</i>	F: GCGGTGCTGTCGATTTTA R: TACCGGAACCCATCTCGAT	785	57	BAO-TAO et al., 2011
KPC-2	<i>bla</i> _{KPC-2}	F: CGTTACGGCAAAAATGCGCT R: CAGAGCCTTACTGCCGTTGA	605	58	Grupo de pesquisa
Sorogrupo O25	O25v	F: TCCAGCAGGTGCTGGATCGT R: GCGAAATTTTCGCCGTACTGT	313	59	CLERMONT et al., 2006
AmpC	<i>bla</i> _{CMY-1}	F: TGAGCAAGACCTGACTGC R: GGAATGTCTGCTCGGTGAC	654	52	AGUILAR et al., 2009
AmpC	<i>bla</i> _{CMY-2}	F: ATAACCACCCAGTCACGC R: CAGTAGCGAGACTGCGCA	631	58	POPPE et al., 2005
AmpC	<i>bla</i> _{DHA-1}	F: TCTGCCGCTGATAATGTCC R: GCCGCCGGATCATTACGCGC	262	52	YUM et al., 2005
AmpC	<i>bla</i> _{DHA-2}	F: TCTGCCGCTGATAATGTCTG R: TCTGCCGGGTCATTCAACAT	298	52	YUM et al., 2005
AmpC	<i>bla</i> _{FOX}	F: AACATGGGGTATCAGGGAGATG R: CAAAGCGCGTAACCGATTGG	190	52	PÉREZ-PÉREZ e HANSON, 2002
AmpC	<i>bla</i> _{MIR/ACT}	F: TCGGTAAAGCCGATGTTGCCG R: CTTCCACTGCGGCTGCCAGTT	302	56	PÉREZ-PÉREZ e HANSON, 2002
ERIC-PCR	<i>Eric-2</i>	AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG	-	52	SNEATH e SOKAL, 1973

*Pb – Pares de bases; **T(°C) – Temperatura de anelamento em graus Celsius/ Padronizações das temperaturas realizadas neste projeto; ***F – Forward; R – Reverse.

3.10 Determinação do grupo filogenético de *E. coli*

A determinação dos grupos filogenéticos de virulência das linhagens de *E. coli*, foi realizada através da amplificação dos genes *chuA*, *yjaA*, *arpA*, *trpA* e do fragmento TspE4 por PCR, conforme metodologia descrita por Clermont e colaboradores (2013). A reação de PCR utilizou iniciadores e temperatura de anelamento, conforme descrito na Tabela 4 e foi realizada nas seguintes condições: desnaturação inicial por 5 minutos a 94 °C; desnaturação com 30 ciclos de 30 segundos a 94 °C, anelamento com 30 ciclos de 30 segundos a 55 °C, extensão com 30 ciclos de 30 segundos a 72 °C; e uma extensão final de 7 minutos a 72 °C (CLERMONT et al., 2013). O produto amplificado de cada reação foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 1%, coradas com GelRed® Nucleic Acid Stain (Biotium, Hayward, 2013), visualizado em UV (312 nm) com auxílio de um transiluminador ultravioleta e foto documentado pelo sistema *L-Pix* (Loccus Biotecnologia, Cotia, 2012).

Os grupos filogenéticos foram classificados através do esquema de identificação proposto por Clermont e colaboradores (2013) (Tabela 5).

Tabela 4. Iniciadores específicos para os genes determinantes dos grupos filogenéticos (CLERMONT, et al., 2013).

<i>Característica</i>	<i>Gene alvo</i>	<i>Sequência do iniciador (5'-3')</i>	<i>Pb</i>	<i>T(°C)</i>
Filogenia de Virulência	<i>chuA</i>	F: ATGGTACCGGACGAACCAAC R: TGCCGCCAGTACCAAAGACA	288	59
	<i>yjaA</i>	F: CAAACGTGAAGTGTCTCAGGAG R: AATGCGTTCCTCAACCTGTG	211	59
	TspE4C2	F: CACTATTCGTAAGGTCATCC R: AGTTTATCGCTGCGGGTCGC	152	59
	<i>arpA</i>	F: AACGCTATTCGCCAGCTTGC R: TCTCCCCATACCGTACGCTA	400	59
	<i>trpA</i> (Grupo C)	F: AGTTTTATGCCCAGTGCGAG R: TCTGCGCCGGTCACGCC	219	59

Tabela 5. Esquema de classificação de grupos filogenéticos para *Escherichia coli* (CLERMONT et al., 2013).

Genótipo Quadraplex				Grupo Filogenético
arpA	chuA	yjaA	TspE4.C2	
+	-	-	-	A
+	-	-	+	B1
-	+	-	-	F
-	+	+	-	B2
-	+	+	+	B2
-	+	-	+	B2
+	-	+	-	A ou C
+	+	-	-	D ou E
+	+	-	+	D ou E
+	+	+	-	E ou clado I
-	-	+	-	Clado I ou II
-	-	-	+	Desconhecido
-	-	+	+	Desconhecido
+	-	+	+	Desconhecido
+	+	+	+	Desconhecido
-	-	-	-	Desconhecido

3.11 Avaliação da relação clonal por ERIC-PCR

Foram determinadas as relações clonais entre cepas de *Escherichia coli* através da técnica de ERIC PCR. A análise de ERIC PCR é um método de tipagem baseado na amplificação de segmentos conservados presentes no DNA das Enterobactérias. A amplificação destas regiões foi realizada segundo a técnica de PCR, a partir de um *primer* único denominado ERIC-2 (Tabela 3) (SNEATH e SOKAL, 1973), que é específico para estes segmentos.

A reação de PCR ocorreu nas seguintes condições: etapa de desnaturação inicial a 94 °C por 10 min; etapa de amplificação com 30 ciclos de desnaturação à 94 °C por 1 min, anelamento à 52 °C por 1 min, extensão à 72 °C por 8 min; e extensão final a 72 °C por 16 minutos. A avaliação dos segmentos foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado com Gel Red®, visualizado em UV (312 nm) com auxílio de um transiluminador ultravioleta e foto documentado pelo sistema *L-Pix* (Loccus Biotecnologia, Cotia, 2012).

A análise da clonalidade foi realizada a partir do perfil de amplificação obtido, sendo comparado mediante a construção de um dendrograma utilizando o software *Bionumerics*® (*Applied Maths, Kortrijk, Belgium*). As cepas que apresentaram coeficiente de similaridade igual ou superior a 90% foram considerados clonais.

3.12 Técnica de *Multilocus Sequence Typing* (MLST)

A técnica de MLST avalia a presença e a variação da sequência de nucleotídeos de genes conservados, denominados *housekeeping genes*, específicos de uma espécie bacteriana. Sendo assim, a amplificação destes genes conservados foi realizada utilizando iniciadores específicos de MLST para cepas de *Escherichia coli* (Tabela 6) e de *Klebsiella pneumoniae* (Tabela 7).

3.12.1 MLST para *Escherichia coli*

A tipagem por *Multilocus Sequence Typing* (MLST) foi realizada para o isolado de *Escherichia coli* ESBL, produtor da enzima CTX-M-15 e positivo para a sorotipagem O:25.

A reação de PCR ocorreu nas seguintes condições: etapa de desnaturação inicial a 94 °C por 5 min; etapa de amplificação com 30 ciclos de desnaturação à 94 °C por 1 min, anelamento a 62.5 °C por 1 min, extensão à 72 °C por 1 min; e etapa de extensão final a 72 °C por 7 minutos.

Os produtos de PCR obtidos foram purificados com o kit de purificação GFX™ (fabricante GE Healthcare®, São Paulo, 2014) seguindo as recomendações do fabricante. E o produto purificado foi sequenciado pela empresa Genomic – Engenharia Molecular.

As sequências nucleicas convertidas em arquivo FASTA foram analisadas com o programa SeqMan Pro™ (Lasergene®). E, posteriormente, inseridas no *site* do *The University of Warwick - MLST Databases at UoW* (<http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli/>) e avaliadas para obtenção das *sequence types* (ST).

Tabela 6. Iniciadores específicos para o MLST de *Escherichia coli* (*The University of Warwick - MLST Databases at UoW*).

<i>Característica</i>	<i>Gene alvo</i>	<i>Sequência do iniciador (5'-3')</i>	<i>Pb*</i>	<i>T(°C)</i>
MLST de <i>E. coli</i>	<i>adK</i>	F: ATTCTGCTTGGCGCTCCGGG R: CCGTCAACTTTCGCGTATTT	583	62.5
	<i>gyrB</i>	F: TCGGCGACACGGATGACGGC R: ATCAGGCCTTCACGCGCATC	911	62.5
	<i>fumC</i>	F: TCACAGGTCGCCAGCGCTTC R: GTACGCAGCGAAAAAGATTTC	806	62.5
	<i>lcd</i>	F: ATGGAAAAGTAAAGTAGTTGTTCCGGC R: GGACGCAGCAGGATCTGTT	878	62.5
	<i>recA</i>	F: CGCATTCGCTTTACCCTGACC R: TCGTCGAAATCTACGGACCGGA	780	62.5
	<i>purA</i>	F: CGCGCTGATGAAAGAGATGA R: CATA CGGTAAGCCACGCAGA	816	62.5
	<i>mdh</i>	F: AGCGCGTTCTGTTCAAATGC R: CAGGTT CAGAACTCTCTCTGT	932	62.5

*Pb – Pares de bases; **T(°C) – Temperatura de anelamento em graus Celsius; ***F – Forward; R – Reverse.

3.12.2 MLST para *Klebsiella pneumoniae*

A tipagem por *Multilocus Sequence Typing* (MLST) foi realizada para o isolado de *Klebsiella pneumoniae* com perfil genotípico confirmado de KPC-2. A amplificação dos genes conservados foi realizada utilizando iniciadores específicos para MLST de *Klebsiella pneumoniae*, os quais constam na Tabela 7.

A reação de PCR ocorreu nas seguintes condições: etapa de desnaturação inicial a 94 °C por 5 min; etapa de amplificação com 40 ciclos de desnaturação à 94 °C por 2 min, temperatura de anelamento específico para cada iniciador por 2,15 min, extensão à 72 °C por 1,15 min; e etapa de extensão final a 72 °C por 10 minutos.

Os produtos de PCR obtidos foram purificados com o kit de purificação GFX™ (fabricante GE Healthcare®, São Paulo, 2014) seguindo as recomendações do fabricante. E o produto purificado foi sequenciado pela empresa Genomic – Engenharia Molecular.

As sequências nucleicas convertidas em arquivo FASTA foram analisadas com o programa SeqMan Pro™ (Lasergene®). E, posteriormente, inseridas no *site* do Instituto Pasteur - MLST Databases (www.pasteur.fr/mlst) e avaliadas para obtenção das *sequence types* (ST).

Tabela 7. Iniciadores específicos para o MLST para *Klebsiella pneumonia* (Instituto Pasteur - MLST Databases).

Característica	Gene alvo	Sequência do iniciador (5'-3')	Pb*	T(°C)
MLST de <i>K. pneumoniae</i>	<i>pgi</i>	F: GAGAAAAACCTGCCTGTACTGCTGGC R: CGCGCCACGCTTTATAGCGGTTAAT	432	50
	<i>gapA</i>	F: TGAAATATGACTCCACTCACGG R: CTTCAGAAGCGGCTTTGATGGCTT	450	60
	<i>infB</i>	F: CTCGCTGCTGGACTATATTCG R: CGCTTTCAGCTCAAGAACTTC	318	50
	<i>mdh</i>	F: CCCAACTCGCTTCAGGTTTCAG R: CCGTTTTTCCCCAGCAGCAG	477	50
	<i>rpoB</i>	F: GGCAGAAATGGCWWGAGAACCA R: GAGTCTTCGAAGTTGTAACC	501	50
	<i>phoE</i>	F: ACCTACCGCAACACCGACTTCTTCGG R: TGATCAGAACTGGTAGGTGAT	420	50
	<i>tonB</i>	F: CTTTATACCTCGGTACATCAGGTT R: ATTCGCCGGCTGRGCRGAGAG	414	48

*Pb – Pares de bases; **T(°C) – Temperatura de anelamento em graus Celsius; ***F – Forward; R – Reverse.

3.13 Sequenciamento

O sequenciamento das cepas foi realizado para as cepas representantes de cada um dos genes de resistência aos β -lactâmicos e fluoroquinolonas para consolidação dos resultados moleculares; posterior publicação; bem como uma complementação do banco de cepas controles do laboratório de Resistência Bacteriana do Instituto de Ciências Biomédicas II – USP.

4 RESULTADOS

Os resultados, apresentados abaixo, descrevem a presença e caracterização de bactérias gram-negativas MRs, carregando genes de resistência adquirida aos beta-lactâmicos de amplo espectro e às fluoroquinolonas, em ambientes aquáticos de áreas públicas, no estado de São Paulo, uma das regiões mais urbanizada do Brasil.

4.1 Identificação de bactérias gram-negativas com perfil de resistência às quinolonas e aos beta-lactâmicos de amplo espectro em ambientes aquáticos urbanos

As amostras de água analisadas foram coletadas de cinco locais de acesso público listados a seguir: Reserva da Guarapiranga, Universidade de São Paulo (Rua do Lago e Pirajussara), Parque do Ibirapuera e Lindoia, com prévio consentimento das autoridades responsáveis respectivas.

No teste de sensibilidade antimicrobiana pelo método de Kirby-Bauer foram testados 50 isolados para uma pré-triagem bacteriana. Este teste, utilizando 14 antimicrobianos, revelou um percentual de resistência (Tabela 9), onde trinta e cinco isolados (70%) se mostraram multirresistentes, ou seja, apresentaram resistência $\geq$ a 3 agentes antibacterianos pertencentes a diferentes classes de antibióticos (MAGIORAKOS et al., 2012). Os perfis fenotípicos individuais de resistência das bactérias gram-negativas isoladas, realizado pelo método de Kirby-Bauer estão apresentados no Anexo 1

Os locais de coleta, o perfil de multirresistência de cada um dos isolados, bem como a identificação das espécies, constam na Tabela 8.

Bactérias gram-negativas fermentadoras ($n= 17$) e não fermentadoras ($n= 18$) foram identificadas pela técnica de MALDI-TOF®. Sendo divididas em 13 diferentes espécies, as quais foram: *Escherichia coli* ($n= 12$), *Pseudomonas aeruginosa* ($n= 5$), *Klebsiella pneumoniae* ($n= 4$), *Enterobacter kobei* ($n= 3$), *Pseudomonas putida* ($n= 2$), *Aeromonas hydrophila* ($n= 2$), *Acinetobacter calcoaceticus* ($n= 1$), *Enterobacter asburiae* ($n= 1$), *Providencia rettgeri* ($n= 1$), *Pseudomonas fulva* ($n= 1$), *Ochrobactrum intermedium* ($n= 1$), *Stenotrophomonas maltophilia* ($n= 1$), *Citrobacter freundii* ($n= 1$). Quinze isolados não foram identificados, pois não apresentaram o perfil de interesse, ou seja, não apresentaram resistência aos beta-lactâmicos e/ou às quinolonas (Tabela 8).

Tabela 8. Identificação de bactérias gram-negativas isoladas das amostras de água, realizada por MALDI-TOF® e perfil de resistência avaliado pelo método de Kirby-Bauer.

Localidade	Coleta	Isolados	Espécie	Perfil de multirresistência* (Fenótipo)
Reserva Guarapiranga	16.10.12	A1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	MR+
		A2	<i>Escherichia coli</i>	MR-
		A3	<i>Escherichia coli</i>	MR+
		A4	<i>Pseudomonas putida</i>	MR+
		A5	<i>Escherichia coli</i>	MR-
		A6	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	MR+ (ESBL)
Rua do Lago - Universidade de São Paulo (USP)	10.12.12	B1	nd	MR-
		B2	nd	MR-
		B3	nd	MR+
		B4	nd	MR+
		B5	<i>Enterobacter asburiae</i>	MR+ (KPC)
		B6	nd	MR+
Pirajussara - Universidade de São Paulo (USP)	07.11.12	C1	nd	MR+
		C2	nd	MR+
		C3	nd	MR-
		C4	nd	MR+
		C5	nd	MR+
		C6	nd	MR+
		C7	nd	MR-
		C8	nd	MR-
		C9	nd	MR-
		C10	nd	MR-
Parque Ibirapuera	15.01.13	D1	<i>Providencia rettgeri</i>	MR+
		D2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	MR+ (KPC)
		D3	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	MR+ (KPC)
		D4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	MR+
		D5	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	MR+ (KPC)
		D6	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	MR+ (KPC)
		D7	<i>Escherichia coli</i>	MR+ (ESBL)
		D8	<i>Escherichia coli</i>	MR-
		D9	<i>Escherichia coli</i>	MR-
		D10	<i>Escherichia coli</i>	MR+ (ESBL)
		D11	<i>Escherichia coli</i>	MR+
Lindóia	06.01.13	F1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	MR+
		F2	<i>Escherichia coli</i>	MR- (ESBL)
		F3	<i>Escherichia coli</i>	MR- (ESBL)
Parque Ibirapuera	15.01.13	G1	<i>Pseudomonas fulva</i>	MR+
		G2	<i>Aeromonas hydrophila</i>	MR+
		G3	<i>Aeromonas hydrophila</i>	MR+
		G4	<i>Enterobacter kobei</i>	MR-
		G5	<i>Enterobacter kobei</i>	MR-
		G6	<i>Ochrobactrum intermedium</i>	MR+
Parque Ibirapuera	23.10.13	H1	<i>Enterobacter kobei</i>	MR+ (KPC)
		H2	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	MR+ (KPC)
		H3	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	MR+ (ESBL)
		H4	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	MR+ (ESBL)
		H5	<i>Pseudomonas putida</i>	MR+ (ESBL)
		H6	<i>Citrobacter freundii</i>	MR+ (ESBL)
		H7	<i>Escherichia coli</i>	MR+
		H8	<i>Escherichia coli</i>	MR+

nd, não determinado; *MR+, multirresistente; MR-, não multirresistente; Multirresistência interpretada seguindo a definição de Magiorakos e colaboradores (MAGIORAKOS et al., 2012). *Enterobactérias ($n=17$); Não fermentadores ($n=18$); Bactérias não identificadas com perfil de sensibilidade aos beta-lactâmicos e/ou quinolonas ($n=15$). ¹ Perfil determinado pelo método de Kirby-Bauer e interpretação pelo CLSI, 2013b.

Tabela 9. Percentual de resistência das bactérias gram-negativas isoladas ($n= 50$), coletadas de 5 locais durante outubro/2012 a outubro/2013*

Antimicrobiano	Sigla	Concentração do disco	Percentual de isolados resistentes % (n isolados/n total) ¹
Amoxicilina + Ácido Clavulânico	AMC	30 µg	72 (36/50)
Cefoxitina	CFO	30 µg	62 (31/50)
Cefotaxima	CTX	30 µg	58 (29/50)
Cotrimoxazol	SUT	25 µg	56 (28/50)
Ceftriaxona	CRO	30 µg	54 (27/50)
Ertapenem	ETP	10 µg	48 (24/50)
Ceftazidima	CAZ	30 µg	38 (19/50)
Imipenem	IMP	10 µg	36 (18/50)
Tigeciclina	TIG	15 µg	36 (18/50)
Ciprofloxacina	CIP	5 µg	32 (16/50)
Gentamicina	GEN	10 µg	22 (11/50)
Cefepima	CPM	30 µg	14 (7/50)
Fosfomicina	FOS	200 µg	12 (6/50)
Amicacina	AMI	30 µg	8 (4/50)

*Enterobactérias ($n= 17$); Não fermentadores ($n= 18$); Bactérias não identificadas com perfil de sensibilidade aos beta-lactâmicos e quinolonas ($n= 15$) (Tabela 8). ¹ Perfil determinado pelo método de Kirby-Bauer e interpretação pelo CLSI (2013b).

4.2 Caracterização fenotípica e genotípica de KPC

Isolados multirresistentes com perfil fenotípico para produção de carbapenemases (KPC) foram analisados através do teste de Hodge, pelo CHROMagar® KPC e teste de APB, como exemplificado na Figura 9.

Do total de 9 isolados selecionados, todos foram positivos no meio seletivo CHROMagar®, 6 foram positivos no teste de APB e apenas 4 apresentaram positividade no teste de Hodge. Adicionalmente, neste grupo a análise molecular por PCR confirmou a produção de carbapenemases em 33,3% (3/9) dos isolados, conforme ilustrado na Tabela 10.

Figura 9. Teste fenotípico para triagem de KPC (*Klebsiella pneumoniae carbapenemase*). Cepa utilizada: *Klebsiella pneumoniae* (D5) - proveniente de amostra de água. A: Teste de Hodge positivo para KPC. B: CHROMagar® com coloração azulada indicando produção de KPC por *Klebsiella pneumoniae*. C: Teste de APB positivo, contendo nos discos superiores, ceftazidima e imipenem, e nos discos inferiores, ceftazima e imipenem acrescidos de 10 µl de ácido fenil borônico (APB).

Tabela 10. Caracterização fenotípica e genotípica para carbapenemases.

Isolados	Identificação	Perfil fenotípico			Perfil genotípico
		Teste de Hodge	CHROMagar® KPC	Teste APB	KPC-2
D2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	+	+	-
D3	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	+	+	+
D5	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	+	+	+
D6	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	+	+	-
B5	<i>Enterobacter asburiae</i>	+	+	+	-
F2	<i>Escherichia coli</i>	-	+	-	-
F3	<i>Escherichia coli</i>	-	+	-	-
H1	<i>Enterobacter kobei</i>	-	+	-	-
H2	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	+	+	+	+

Sombreado indicando isolados confirmados para o perfil genotípico.

4.3 Caracterização fenotípica e genotípica de PMQR

Os isolados que apresentaram resistência à ciprofloxacina foram, adicionalmente, caracterizados fenotipicamente para as demais classes de fluoroquinolonas (ácido nalidíxico – 1ª geração, ciprofloxacina, enrofloxacina e levofloxacina – 2ª geração). A confirmação da concentração inibitória mínima (CIM) para as PMQR-positivas foi realizada através dos testes de diluição em ágar e E-test®, para os antibióticos enrofloxacina e ciprofloxacina, respectivamente (Tabela 11 e Figura 10).

O mecanismo de resistência às fluoroquinolonas foi avaliado através de análise genotípica. O gene mais prevalente foi o *aac(6`)-Ib-cr* em 46,6% (7/15) dos isolados, seguido por *oqx A* 20% (3/15), *oqx B* em 20% (3/15) e apenas um isolado apresentou-se positivo para o gene *qnr B* com 6,6% (1/15), conforme ilustrado na Tabela 12. Enquanto que os demais genes do subgrupo de *qnr* e de *qep A*, não foram identificados nos isolados. Os grupos filogenéticos foram determinados para os isolados de *E. coli* ($n=10$), interpretados seguindo a definição de Clermont e colaboradores (2013) e identificados nos grupos: B1 ($n= 3$), B2 ($n= 3$) e C ($n= 4$).

Figura 10. Perfil fenotípico de resistência às quinolonas. Cepa utilizada: *Escherichia coli* (D7) - proveniente de amostra de água. A: Teste de Kirby Bauer indicando resistência para as diferentes gerações de quinolonas, sendo testados, em sequência, os antibióticos: ciprofloxacina (CIP), ácido nalidíxico (NAL), levofloxacina (LVX) e enrofloxacina (ENO). B: Fita de E-test® de ciprofloxacina indicando positividade para resistência às quinolonas.

Tabela 11. Caracterização fenotípica de classes de fluoroquinolonas para os isolados bacterianos gram-negativos recuperados de amostras de água, realizado pelo método de Kirby-Bauer e a CIM, realizada por diluição em ágar para enrofloxacin e por E-test® para ciprofloxacina.

Isolados	Identificação	Classes das fluoroquinolonas				Perfil fenotípico*	
		Gerações				CIM	
		1ª NAL	2ª CIP	2ª ENO	2ª LVX	Diluição em ágar (µg)	E-test® (µg)
						Enrofloxacin	Ciprofloxacina
D3	<i>K. pneumoniae</i>	I	I	I	S	0,125	0,19
D5	<i>K. pneumoniae</i>	R	R	R	R	32	> 32
D6	<i>P. aeruginosa</i>	R	R	R	R	> 32	> 32
D7	<i>E. coli</i>	R	R	R	R	> 32	> 32
D9	<i>E. coli</i> ¹	R	R	R	R	-	-
D10	<i>E. coli</i>	R	R	R	R	> 32	> 32
D11	<i>E. coli</i>	R	R	R	R	> 32	> 32
G2	<i>A. hydrophila</i> ¹	R	R	R	R	-	-
A3	<i>E. coli</i>	R	R	R	R	> 32	> 32
A5	<i>E. coli</i>	R	R	R	R	32	> 32
A6	<i>K. pneumoniae</i>	R	R	R	R	> 32	> 32
F2	<i>E. coli</i>	R	R	R	R	> 32	> 32
F3	<i>E. coli</i>	R	R	R	R	> 32	> 32
H7	<i>E. coli</i>	R	R	R	R	> 32	> 32
H8	<i>E. coli</i>	R	R	R	R	> 32	> 32

NAL = ácido nalidíxico, CIP = ciprofloxacina, ENO = enrofloxacin, LVX = levofloxacina, S = sensível, I = Intermediário, R = resistente. * (CLSI, 2013a, 2013b). ¹ Isolados não recuperados para estudos posteriores.

Tabela 12. Caracterização genotípica de fluoroquinolonas para os isolados bacterianos gram-negativos recuperados de amostras de água e grupo filogenético dos isolados de *E. coli*.

Isolados	Identificação	Perfil genotípico								Grupo Filogenético dos isolados de <i>E. coli</i> *
		Subgrupos de <i>qnr</i>				<i>qepA</i>	<i>oqxA</i>	<i>oqxB</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	
		<i>qnrA</i>	<i>qnrB</i>	<i>qnrD</i>	<i>qnrS</i>					
D3	<i>K. pneumoniae</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	<i>nd</i> **
D5	<i>K. pneumoniae</i>	-	-	-	-	-	+	+	-	<i>nd</i>
D6	<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	<i>nd</i>
D7	<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	C
D9	<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	B2
D10	<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	C
D11	<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	C
G2	<i>A. hydrophila</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	<i>nd</i>
A3	<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	C
A5	<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	B1
A6	<i>K. pneumoniae</i>	-	-	-	-	-	+	+	-	<i>nd</i>
F2	<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	B1
F3	<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	B1
H7	<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	B2
H8	<i>E. coli</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	B2

*Grupo filogenético, interpretado seguindo a definição de Clermont e colaboradores (CLERMONT et al., 2013).

**nd, não determinado. Sombreado indicando isolados positivos para os genes de resistência.

4.4 Caracterização fenotípica e genotípica de ESBL

Através do método de aproximação de discos realizada comumente ao teste de Kirby-Bauer, foi realizada uma triagem dos isolados que apresentaram sinergismo (zona fantasma) e/ou resistência aos antibióticos testados, indicando assim, fenotipicamente a presença de ESBL. Para confirmação da produção de ESBL, os isolados foram semeados em meio seletivo CHROMagar® ESBL e analisados através de fita de E-test® ESBL, como exemplificado na Figura 11 e indicado na Tabela 13.

Figura 11. Teste fenotípico para triagem de ESBL (*Extended-Spectrum Beta-Lactamase*). As cepas utilizadas foram provenientes de amostra de água. Sendo a parte A e C da figura representada por uma *Klebsiella pneumoniae* (A6), e a parte B por uma *Escherichia coli* (F2). A: Sinergismo característico de ESBL em antibiograma. B: CHROMagar® com coloração rosada indicando produção de ESBL por *Escherichia coli*. C: Fita de E-test indicando positividade para ESBL.

Onze isolados foram considerados fenotipicamente positivos para ESBL, porém apenas quatro isolados (D7, D10, A6 e H4) multirresistentes apresentaram zona fantasma. Após indicação fenotípica, os isolados foram testados quanto ao genótipo de resistência pela técnica de PCR, no qual foi confirmada a presença de genes codificando ESBL como CTX-M-15 ($n=2$), CTX-M-2 ($n=4$), CTX-M-9 ($n=1$), SHV ($n=4$) e TEM ($n=3$), como apresentado na Tabela 14. Os grupos filogenéticos foram determinados para os isolados de *E. coli*, interpretados seguindo a definição de Clermont e colaboradores (2013) e identificados nos grupos: B1 ($n=2$) e C ($n=2$). Para os isolados de *E. coli* resistentes à cefoxitina foi realizada uma caracterização genotípica de AmpC (Tabela 15).

Tabela 13. Caracterização fenotípica de ESBL para os isolados bacterianos gram-negativos recuperados de amostras de água, realizado através de CHROMagar® ESBL e a CIM, realizada por E-test® para ceftazidima e por diluição em ágar para ceftiofur.

Isolados	Identificação	Perfil fenotípico				
		CIM				CHROMagar® ESBL
		E-test®			Diluição em ágar	
		Ceftazidima (µg/ml)				
		TZ	TZL	Interpretação		
D7	<i>E. coli</i>	16	0,5	+	32	+
D10	<i>E. coli</i>	16	0,5	+	32	+
A6	<i>K. pneumoniae</i>	12	> 4	<i>Ind</i> *	> 32	+
F2	<i>E. coli</i>	> 32	> 4	<i>Ind</i>	> 32	+
F3	<i>E. coli</i>	> 32	> 4	<i>Ind</i>	8	+
H4	<i>K. pneumoniae</i>	16	0,125	+	1	+
H5	<i>P. putida</i>	> 32	> 4	<i>Ind</i>	16	+
H6	<i>C. freundii</i>	> 32	> 4	<i>Ind</i>	16	+
H2	<i>A.calcoaceticus</i>	4	1	-	8	+
D3	<i>K. pneumoniae</i>	3	> 4	-	8	+
D5	<i>K. pneumoniae</i>	> 32	> 4	<i>Ind</i>	2	-

*Ind, indeterminado de acordo com a bula do E-test® ESBL.

Tabela 14. Caracterização genotípica de ESBL para os isolados bacterianos gram-negativos recuperados de amostras de água e grupo filogenético dos isolados de *E. coli*.

Isolados	Identificação	Perfil genotípico								Grupo Filogenético* dos isolados de <i>E. coli</i>
		Subgrupos de CTX-M					O25	SHV	TEM	
		CTX-M	CTX-M-2	CTX-M-8	CTX-M-9	CTX-M-15				
D7	<i>E. coli</i>	+	-	-	-	+	+	-	-	C
D10	<i>E. coli</i>	+	-	-	-	+	+	-	-	C
A6	<i>K. pneumoniae</i>	+	+	-	-	-	nd	+	+	nd**
F2	<i>E. coli</i>	+	+	-	-	-	nd	-	+	B1
F3	<i>E. coli</i>	+	+	-	-	-	nd	-	+	B1
H4	<i>K. pneumoniae</i>	+	-	-	-	-	nd	+	-	nd
H5	<i>P. putida</i>	+	-	-	+	-	nd	-	-	nd
H6	<i>C. freundii</i>	-	-	-	-	-	nd	-	-	nd
H2	<i>A. calcoaceticus</i> ¹	-	-	-	-	-	nd	+	-	nd
D3	<i>K. pneumoniae</i> ¹	-	-	-	-	-	nd	-	-	nd
D5	<i>K. pneumoniae</i> ¹	+	+	-	-	-	nd	+	-	nd

*Grupo filogenético interpretado seguindo a definição de Clermont e colaboradores (CLERMONT et al., 2013).

**nd, não determinado. Sombreado indicando isolados positivos para os diversos genes de resistência.

¹ Cepas produtoras de KPC-2.

Tabela 15. Caracterização genotípica de AmpC para os isolados bacterianos gram-negativos recuperados de amostras de água e grupo filogenético dos isolados de *E. coli* resistentes à cefoxitina.

Isolados	Identificação	Perfil genotípico						Grupo Filogenético* dos isolados de <i>E. coli</i>
		CMY-1 (654 bp)	CMY-2 (631 bp)	DHA-1 (262 bp)	DHA-2 (298 bp)	FOX (190 bp)	MIR/ACT (302 bp)	
F2	<i>E. coli</i>	-	+	-	-	-	-	B1
F3	<i>E. coli</i>	-	+	-	-	-	-	B1

*Grupo filogenético, interpretado seguindo a definição de Clermont e colaboradores (CLERMONT et al., 2013). Sombreado indicando isolados positivos para os genes de resistência.

4.5 Análise do dendograma

O perfil genotípico, obtido através do teste de ERIC-PCR, foi determinado para os 10 isolados de *E. coli* *bla*_{CTX-M} positivo e/ou *qnr* positivo. A análise do teste foi realizada pelo programa *BioNumerics* (Applied Maths), com tolerância a 1% e otimização a 0,5%, originando um dendograma (Figura 12). Os isolados apresentaram grande diversidade genética demonstrando que não são clonalmente relacionadas. Apenas 4 cepas apresentaram similaridade igual ou maior a 90%, o que caracteriza duas cepas como clones, como observado entre a cepa D7 com a D10 e a cepas F2 com a F3, as quais foram proveniente do mesmo local de coleta.

Figura 12. Perfil genotípico obtido por ERIC-PCR de *E. coli*. Dendograma realizado através do software *BioNumerics* (Applied Maths). Tolerância 1% e otimização a 0,5%.

4.6 Grupo filogenético de *E. coli*

A análise filogenética agrupa as linhagens de *E. coli* 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 filogenéticos A e B1, de baixa virulência (CLERMONT; BONACORSI; BINGEN, 2000). Uma classificação mais atual referente aos grupos filogenéticos foi formulada (CLERMONT et al, 2013), onde houve a inclusão de novos grupos (C, F e E).

Confrontamos os dados obtidos no estudo, para as duas classificações, e do total de 10 isolados de *E. coli* ESBL e/ou PMQR positivos, na classificação atualizada (CLERMONT et al., 2013), foram identificados 3 grupos filogenéticos; B1 ($n= 3$), B2 ($n= 3$) e C ($n= 4$); e na classificação original (CLERMONT; BONACORSI; BINGEN, 2000), 4 grupos filogenéticos foram identificados; A ($n= 4$), B1 ($n= 3$), B2 ($n= 2$) e D ($n= 1$) como representado na Tabela 16.

Tabela 16. Perfil de virulência, através de análise por grupos filogenéticos, para cepas de *Escherichia coli*.

Isolados de <i>E. coli</i>	Genes do Clermont					Grupo Filogenético*	
	<i>arpA</i>	<i>chuA</i>	<i>yjaA</i>	TspE4	<i>trpA</i>	Clermont et al., 2013	Clermont; Bonacorsi; Bingen, 2000
A3	+	-	+	-	+	C	A
A5	+	-	-	+	nd**	B1	B1
D7	+	-	+	-	+	C	A
D9	-	+	+	+	nd	B2	B2
D10	+	-	+	-	+	C	A
D11	+	-	+	-	+	C	A
F2	+	-	-	+	nd	B1	B1
F3	+	-	-	+	nd	B1	B1
H7	-	+	+	+	nd	B2	B2
H8	-	+	-	+	nd	B2	D

*Grupo filogenético, interpretado seguindo a definição de Clermont (CLERMONT; BONACORSI; BINGEN, 2000; CLERMONT et al., 2013). **nd, não determinado.

4.7 Análise do MLST

Para a análise de MLST (*Multilocus Sequence Typing*) de *E. coli*, foram selecionadas cepas ESBL e positivas para o sorogrupo O:25 (D7 e D10) - grupo de maior endemicidade mundial em cepas virulentas – mas devido a classificação clonal entre D7 e D10, obtido pelo ERIC-PCR, apenas a cepa D7 foi analisada. Através da amplificação dos genes *housekeeping*, a cepa foi identificada como pertencente ao *Sequence Type* 617 (ST617). Enquanto que o MLST para a cepa de *Klebsiella pneumoniae* (D5) foi classificada como pertencente ao *Sequence Type* 11 (ST11) que está incluso no Complexo Clonal 11 (CC11), como exemplificado na Tabela 17.

Tabela 17. Classificação do *Sequence Type*, realizado através da análise de MLST, para cepas de *E. coli* e *K. pneumoniae*.

MLST (<i>Multilocus Sequence Typing</i>)			
Cepa	Identificação	Perfil	ST
D7	<i>Escherichia coli</i>	CTX-M-15/O:25	ST617
D5	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC-2	ST11 (CC11)

5 DISCUSSÃO

A resistência bacteriana é uma ameaça global que afeta diretamente à saúde pública, visto que a versatilidade dos mecanismos de resistência, atualmente expressos por espécies clinicamente importantes, tem limitado o uso dos antibióticos comercialmente disponíveis na prática médica humana e veterinária.

Esta versatilidade genética tem facilitado à emergência de bactérias multirresistentes (MRs), muitas das quais tem adquirido um caráter de endemidade em centros médicos. Adicionalmente, estes fenótipos MRs estão sendo identificados na medicina veterinária, tanto na clínica quanto na produção agropecuária. Ponto que tem levantado alerta epidemiológico, devido ao fato de que muitas das bactérias MRs identificadas em animais de produção e alimentos derivados fazem parte da microbiota intestinal, apresentando, portanto, um caráter zoonótico.

Independente do setor, motivo ou finalidade pelo qual um determinado composto antimicrobiano é utilizado, fica evidente que o princípio darwiniano de sobrevivência do mais forte tem sido negligenciado, e consequentemente a seleção de bactérias resistentes tem ocorrido em diferentes ecossistemas. Neste cenário, o ambiente aquático (principalmente em setores urbanizados) tem constituído um meio no qual convergem resíduos antimicrobianos e bactérias, de forma com que o genótipo mais o ambiente determinem o fenótipo de cada microrganismo.

A contaminação dos ambientes aquáticos pode ocorrer pela atividade antropogênica, por diferentes vias:

- i. Através do uso domiciliar de produtos antimicrobianos (ATMs), cujos resíduos são eliminados na rede de esgoto domiciliar, afetando este reservatório aquático. O consumo de antimicrobianos predispõe para a colonização de pacientes por bactérias multirresistentes, que muitas vezes tem uma origem endógena, desta forma, bactérias MRs são selecionadas e direcionadas para o ambiente aquático. Por outro lado, resíduos de antibióticos também podem ser eliminados pelas fezes e urina, transformando-se em uma fonte de contaminação constante e acumulativa para o ambiente aquático relacionado (LOCATELLI; SODRÉ; JARDIM, 2011).
- ii. Em ambientes hospitalares, a situação é mais grave uma vez que o próprio nicho hospitalar propicia para a seleção de bactérias MRs, podendo ocorrer sua eliminação direta em ambientes aquáticos junto com resíduos de ATMs (PICÃO et

al., 2013), visto que muitas vezes estas unidades não possuem tratamento de esgoto adequado se tornando grandes responsáveis pelo despejo de microrganismos patogênicos portadores de genes de resistência aos antimicrobianos no ambiente (GUSATTI et al., 2009).

- iii. E, por atividades do agronegócio, em especial na produção animal, onde há a utilização de antibióticos, de modo profilático ou terapêutico, sendo este consumo regular no que se refere à criação de frangos, suínos, bovinos ou mesmo peixes (AIZAWA et al., 2014; SILVA; LINCOPAN, 2012).

Outro conceito importante que direcionou a presente investigação foi a presença de elementos genéticos que participam da transferência e mobilização de genes de resistência, como plasmídeos e transposons, ou mesmo o gene cassete. É pertinente comentar que a versatilidade genética bacteriana não é restrita à mobilização vertical de genes para a progênie ou à transferência horizontal via conjugação, mas também, e talvez mais importante, pela capacidade das bactérias de realizarem o processo de transformação, no qual segmentos de DNA livre no meio aquático podem ser diretamente incorporados para o genoma microbiano. Desta forma, mesmo após um processo de tratamento que vise à destruição total ou parcial de microrganismos, o DNA bacteriano ou parte dele pode ficar livre e retornar ao ambiente, sendo incorporados por bactérias presentes no ecossistema (MARQUES, 2012; NAQUIN et al., 2015).

Deste modo, tendo em vista a possibilidade de contaminação de ambientes aquáticos urbanos por resíduos de antimicrobianos, além da presença de bactérias multirresistentes, endêmicas em estabelecimentos hospitalares, e sua associação com mobilização plasmidial; estabelecemos como estratégia da presente pesquisa, monitorar ambientes aquáticos públicos, com foco na identificação e caracterização de fenótipos/genótipos de resistência adquirida aos beta-lactâmicos (ESBLs e KPC) e às fluoroquinolonas (PMQR) em bactérias gram-negativas que poderiam ser utilizadas como marcadores de contaminação ambiental, lembrando que ambientes aquáticos urbanos possuem grande potencial como fonte de transmissão de bactérias zoonóticas, para seres humanos e/ou animais.

No período do estudo, entre outubro/2012 a dezembro/2014, identificamos bactérias gram-negativas multirresistentes em ambientes aquáticos públicos, sendo que, dos 50 isolados de bactérias gram-negativas, trinta e cinco (70%) apresentaram perfil de multirresistência (determinada quando há resistência $\geq$ a três agentes antibacterianos pertencentes a diferentes classes de antibióticos, como estabelecido por MAGIORAKOS et al., 2012) frente a 14 antibióticos testados.

Ressalta-se dentre os resultados, a presença de uma grande variabilidade de espécies de bactérias gram-negativas MRs ($n= 13$), fermentadoras e não fermentadoras identificadas, cujos fenótipos de resistência identificados apresentaram altas taxas de resistência (%) para antibióticos utilizados na medicina clínica humana e veterinária como: amoxilina + ácido clavulânico (72%), cefoxitina (62%), cefotaxima (58%), cotrimoxazol (56%), ceftriaxona (54%), ertapenem (48%), ceftazidima (38%), imipenem e tigeciclina (36%), ciprofloxacina (32%), gentamicina (22%), cefepima (14%), fosfomicina (12%) e por fim amicacina (8%). E, dentre as bactérias gram-negativas MRs, as espécies mais prevalentes foram *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae*.

Dando continuidade ao estudo, focamos na caracterização dos mecanismos de resistência às beta-lactamases de amplo espectro e às carbapenemases, e observamos que os principais genes envolvidos, identificados neste trabalho, foram *bla*_{CTX-M-2} ($n= 5$), *bla*_{CTX-M-9} ($n= 1$), *bla*_{CTX-M-15} ($n= 2$), *bla*_{SHV} ($n= 5$), *bla*_{TEM} ($n= 3$), *bla*_{KPC-2} ($n= 3$), os quais foram identificados em enterobactérias e bactérias não fermentadoras como *Pseudomonas* spp., e *Acinetobacter* spp. Enquanto que, os principais genes PMQR, que poderiam conferir uma resistência adquirida às fluoroquinolonas, foram: *qnrB* ($n= 1$), *oqxA* ($n= 3$), *oqxB* ($n= 3$) e, *aac(6')Ib-cr* ($n= 7$), também encontrados em enterobactérias e bactérias não fermentadoras.

A alta prevalência de bactérias gram-negativas MRs, carregando genes previamente identificados na medicina humana e veterinária, suporta a hipótese de que bactérias resistentes aos antibióticos podem chegar a colonizar diferentes nichos ecológicos além do hospital. Desta forma, nossos resultados corroboram com o conceito de que o ambiente aquático favorece para a disseminação ambiental e é um meio 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; LEES, 2000; LU et al., 2010; LUBRICK, 2011; WALSH et al., 2011).

Alguns ambientes aquáticos urbanos são suscetíveis à contaminação por bactérias de origem hospitalar. Por exemplo, rios urbanos podem ser afetados por esgoto hospitalar não tratado, ou mesmo se tratado, pode existir a possibilidade de que determinantes genéticos de resistência, não eliminados por processos de desinfecção convencional, utilizados em plantas de tratamentos, sejam despejados nestes rios urbanos. De fato, a presença de bactérias produtoras de carbapenemases em esgoto hospitalar e rios urbanos, no Brasil, tem sido recentemente reportada (CHAGAS et al., 2011; FONTES et al., 2011a; PICÃO et al., 2013).

Com relação a estes relatos, no presente estudo é reportada a identificação adicional de bactérias produtoras de KPC em ambiente aquático urbano de acesso público localizado

dentro de um parque (NASCIMENTO; CANTAMESSA; LINCOPAN, 2013). Para elucidar a possível origem deste tipo de isolado e/ou gene de resistência nossa hipótese aponta a uma contaminação indireta por esgoto hospitalar ou doméstico. Embora, em teoria, o local não apresente contaminação direta por qualquer tipo de esgoto, existe um córrego que poderia aportar para o fluxo contínuo de bactérias resistentes e ou seus determinantes de resistência. De fato, o córrego do Sapateiro está situado no parque municipal estudado, e as suas águas que recebem esgoto antes de cair no lago do parque, são unicamente processadas por uma estação de tratamento de flotação, na qual uma parte expressiva da matéria orgânica em suspensão é retirada da água através de floculação e micro-oxigenação, processo que foca na obtenção de água dentro do padrão adequado para uso paisagístico (TAKAHASHI et al., 2012).

Epidemiologicamente, uma hipótese a ser contemplada seria a possibilidade de que existam veículos e/ou vetores biológicos (ex. aves locais) que poderiam transitar entre ambientes aquáticos diversos (ex. rios e lagos), carregando na sua microbiota bactérias MRs que podem contaminar e disseminar nos ambientes aquáticos transitados, atingindo ecossistemas associados.

O aumento da resistência às beta-lactamases de espectro estendido e de carbapenemases em *Enterobacteriaceae* no meio ambiente, principalmente, nos ambientes aquáticos tem sido preocupante e de elevada importância dentre pesquisas científicas que abrangem estudos epidemiológicos (GALLER et al., 2014; PICÃO et al., 2013; POIREL et al., 2012; WOODFORD et al., 2014).

Revistas especializadas tem reportado que o aparecimento da resistência aos antibióticos, no ambiente aquático, é relevante para a saúde humana, apontando para a necessidade de instaurar programas de monitoramento e vigilância que detectem precocemente a emergência de patógenos multirresistentes de importância médica, os quais podem disseminar para a comunidade (ISOZUMI et al., 2012; LAPARA et al., 2011; WALSH et al., 2011; ZHANG; ZHANG; FANG, 2009).

Em relação à resistência, focamos nos genes plamídeos, pela sua elevada susceptibilidade de disseminação no ambiente, como já abordado anteriormente. Desta forma, analisamos as PMQR e observamos que 15 isolados apresentaram perfil fenotípico de resistência à ciprofloxacina, sendo a presença do gene *aac(6')-Ib-cr* confirmada em 46,66%, *oqxA* e *oqxB* em 20%, e *qnrB* em 6,66%. Para os demais isolados resistentes às quinolonas, a ausência de genes PMQR sugere que o principal mecanismo de resistência seria a mutação em genes que codificam para girases e/ou topoisomerases (MINARINI; DARINI, 2012).

Ainda referente aos dados de PMQR, a concentração inibitória mínima foi extremamente elevada. Visto que 80% dos isolados apresentaram CIM igual ou acima de 32 µg para enrofloxacina e ciprofloxacina.

Dentre as carbapenemases, o gene *bla*_{KPC-2} foi detectado em três cepas (*Klebsiella pneumoniae* *n*= 2 e *Acinetobacter calcoaceticus* *n*= 1). Destacando-se a primeira identificação de *Acinetobacter calcoaceticus* produtora de KPC-2. Sendo que, em relação à *Acinetobacter* spp apenas um caso foi reportado em Porto Rico quanto à produção de KPC (MARTÍNEZ et al., 2014; ROBLEDO et al., 2010).

A cepa de *K. pneumoniae*, produtora de KPC-2, foi definida como pertencente ao ST11 e inserida no complexo clonal CC11, o qual é correlacionado com cepas patogênicas de origem hospitalar, sugerindo e corroborando com dados que elucidam quanto a disseminação de bactérias hospitalares para o ambiente aquático e para ecossistemas associados (OLIVEIRA et al., 2014; PEREIRA et al., 2013).

Beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) caracterizam-se por apresentarem cefoxitina sensível. Porém, neste estudo observamos que duas cepas de *Escherichia coli*, positivas para os genes *bla*_{CTX-M2} e *bla*_{TEM}, apresentaram resistência à cefoxitina. Para melhor compreensão deste fenômeno, realizamos uma triagem genotípica para AmpC, também mediados por plasmídeos, os quais conferem resistência às cefalosporinas de amplo espectro e inibidores comerciais de beta-lactamases (ex. ácido clavulânico). E identificamos a presença do gene *bla*_{CMY-2} para ambas cepas de *Escherichia coli*. Deste modo, elucidamos que a resistência à cefoxitina ocorreu devido a presença concomitante de determinantes gênicos para AmpC e ESBL (MUNIER et al., 2010).

Através do teste de ERIC-PCR, observamos que entre os dez isolados de *Escherichia coli* ESBL e/ou PMQR positivos, houve grande diversidade gênica, demonstrando que não foram clonalmente relacionadas. Sendo que, apenas quatro cepas apresentaram similaridade igual ou maior a 90%, as quais foram provenientes do mesmo local de coleta.

Dando continuidade, referente aos isolados de *E. coli*, os grupos filogenéticos foram determinados, onde de acordo com a classificação atualizada de Clermont et al. (2013) foram identificados três grupos; B1 (*n*= 3), B2 (*n*= 3) e C (*n*= 4), e de acordo com a classificação original (CLERMONT; BONACORSI; BINGEN, 2000) foram identificados quatro grupos; A (*n*= 4), B1 (*n*= 3), B2 (*n*= 2) e D (*n*= 1). A partir destes dados, observamos que o grupo C da classificação atualizada está relacionado ao grupo A da classificação original, ou seja, em ambas as classificações houve predomínio de espécies de *Escherichia coli* de baixa virulência.

Duas cepas foram identificadas com o sorotipo de *Escherichia coli* produtor de ESBL do tipo CTX-M, mundialmente disseminado, O:25. Uma das cepas foi analisada e se enquadrou no grupo ST617, a qual é predominantemente encontrada no continente Europeu, em amostras de origem humana e consideradas não patogênicas de acordo com o banco de dados do MLST *Databases at UOW*. Dado que condiz com os nossos resultados, visto que identificamos a cepa de *E. coli* ST617 como pertencente ao grupo filogenético C, pela classificação atual, que corresponde ao grupo A, da classificação original (CLERMONT; BONACORSI; BINGEN, 2000; CLERMONT et al., 2013). Outras pesquisas também apontam para a correlação de cepas ST617 apresentando perfil comensal e inclusas dentro do grupo de virulência A (NOVAIS et al., 2012; SALLEM et al., 2014).

Atualmente, na prática médica, a resistência bacteriana aos beta-lactâmicos e às fluoroquinolonas tem atingido um nível alarmante, o que tem contribuído para o colapso da antibioticoterapia, uma vez que estes compostos são considerados tratamento de escolha para um grande número de infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS). Em decorrência ao uso massivo destes tipos de agentes antibacterianos, novos e abrangentes mecanismos de resistência adquirida estão sendo reportados mundialmente.

Recentemente, no Brasil, isolados bacterianos resistentes a estes grupos de antibióticos, com fenótipo/genótipo idêntico ao encontrado em hospitais brasileiros, estão sendo recuperados de rios urbanos, plantas de tratamento de esgoto e esgoto hospitalar, assim como, de animais de estimação e/ou produção, o que constitui uma urgência clínica e epidemiológica (CHAGAS et al., 2011; FONTES et al., 2011b; GALES et al., 2003; GUSATTI et al., 2009; LEIGUE et al., 2015; LINCOPAN et al., 2006; MELO; LINCOPAN., 2013; MINARINI et al., 2008; MONTEIRO et al., 2009; MONTEZZI et al., 2015; MOURA et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2014; PAVEZ; MAMIZUKA; LINCOPAN, 2009; PEIRANO et al., 2011; PENTEADO et al., 2009; PICÃO et al., 2013; PRADO et al., 2008; SILVA; LINCOPAN, 2012).

Estes resultados tem levantado à necessidade de monitorar ambientes que podem constituir uma fonte direta de infecção e/ou colonização para o ser humano e/ou ecossistemas associados. No presente estudo confirmamos estes dados reportando que ambientes aquáticos públicos também estão sendo amplamente atingidos pela resistência bacteriana, o que contribui com este problema de saúde publica negligenciado.

6 CONCLUSÃO

- Ampla diversidade de bactérias gram-negativas foi identificada com fenótipo de resistência aos beta-lactâmicos de amplo espectro e às fluoroquinolonas, sendo que as espécies mais prevalentes com perfil de resistência foram: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae*.
- 70% dos isolados (35/50) apresentaram perfil de multirresistência.
- O estudo descreve o primeiro reporte de *Acinetobacter calcoaceticus* produtor de KPC-2.
- Em enterobactérias e bactérias não fermentadoras, os genes identificados relacionados com fenótipos de resistência adquirida aos beta-lactâmicos foram: *bla*_{CTX-M}, *bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{CTX-M-9}, *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM} e *bla*_{KPC-2}; enquanto que para PMQR foram: *qnrB*, *oqxA*, *oqxB* e *aac(6')Ib-cr*.
- Os isolados de *Escherichia coli* apresentaram grande diversidade clonal, pertencendo principalmente aos grupos filogenéticos de baixa virulência (A e C).
- A cepa de *K. pneumoniae* produtora de KPC-2 pertenceu ao complexo clonal CC11 (ST11). Enquanto que a cepa de *E. coli* CTX-M-15 O:25 pertenceu ao ST617.
- Ambientes aquáticos de acesso público podem ser importantes fontes para a disseminação e/ou transmissão de uma ampla variedade de espécies bacterianas multirresistentes, e/ou seus determinantes genéticos de resistência, tanto para seres humanos como para ecossistemas associados, sendo que a presença de genótipos endêmicos sugere uma contaminação por esgoto doméstico e/ou hospitalar.

REFERÊNCIAS*

- AIZAWA, J.; NEUWIRT, N.; BARBATO, L.; NEVES, P. R.; LEIGUE, L.; PADILHA, J.; CASTRO, A. F. P.; GREGORY, L.; LINCOPAN, N. Identification of fluoroquinolone-resistant extended-spectrum β -lactamase (CTX-M-8)-producing *Escherichia coli* ST224, ST2179 and ST2308 in buffalo (*Bubalus bubalis*). **J Antimicrob Chemother.**, p. 2866-2869, 2014.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. Nota técnica nº 01/2013 – Medidas de prevenção e controle de infecções por enterobactérias multirresistentes. 2013.
- 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.
- ALMEIDA, A. C. S.; VILELA, M. A.; CAVALCANTI, F. L. S.; MARTINS, W. M. B. S, MORAIS, M. A. M, MORAIS, M. M. C. First description of KPC-2-producing *Pseudomonas putida* in Brazil. **Antimicrob. Agents Chemother.**, p. 2205-2206, 2012.
- ALOUACHE, S.; ESTEPA, V.; MESSAI, Y.; RUIZ, E.; TORRES, C.; BAKOUR, R. Characterization of ESBLs and associated quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from an urban wastewater treatment plant in Algeria. **Microb. Drug. Resistance.**, v. 20, n. 1, p. 30-38, 2014.
- 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, n. 1, p. 269-270, 1991.
- AMBLER, R. P. The structure of beta-lactamases. **Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.**, v. 289, n. 1036, p. 321-331, 1980.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). Standards methods for the examination of water and wastewater. 22 ed., APHA, 2012.
- ANDRADE, L. N.; CURIAO, T.; FERREIRA, J. C.; LONGO, J. M.; CLÍMACO, E. C.; MARTINEZ, R.; BELLISSIMO-RODRIGUES, F.; BASILE-FILHO, A.; EVARISTO, M. A.; DEL PELOSO, P. F.; RIBEIRO, V. B.; BARTH, A. L.; PAULA, M. C.; BAQUERO, F.; CANTÓN, R.; DARINI, A. L.; COQUE, T. M. Dissemination of blaKPC-2 by the spread of *Klebsiella pneumoniae* clonal complex 258 clones (ST258, ST11, ST437) and plasmids (IncFII, IncN, IncL/M) among *Enterobacteriaceae* species in Brazil. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 55, n. 7, p. 3579-3583, 2011.

*De acordo com:

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

ANDRIOLE, V. T. The quinolones: past, present, and future. **Clin. Infect. Dis.**, v. 41, p. 113-119, 2005.

ANTONIO, C. S.; NEVESM P. R.; MEDEIROS, M.; MAMIZUKA, E. M.; ARAÚJO, M. R. E.; LINCOPAN, N. High prevalence of carbapenem-resistance *Acinetobacter baumannii* carrying the *bla*_{OXA-143} gene in Brazilian hospitals. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 55, n. 3, p. 1322-1323, 2011.

BALL, P. Quinolone generations: natural history or natural selection? **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 46, p. 17-24, 2000.

BAO-TAO, L.; WANGT, X. M.; LIAO, X. P.; SUN, J.; ZHU, H. Q.; CHEN, X. Y.; LIU, Y. H. Plasmid-mediated quinolone resistance determinants *oqxAB* and *aac(6')-Ib-cr* and extended-spectrum β -lactamase gene *bla*_{CTX-M-24} co-located on the same plasmid in one *Escherichia coli* strain from China. **J. Antimicrobial Chemother.**, v. 66, p. 1638-1658, 2011.

BAQUERO, F; MARTÍNEZ, J; CANTÓN, R. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. **Cur. Opinion in Biotech.**, v. 19, p. 260-265, 2008.

BAUER, A. W.; KIRBY, W. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **J. Clin. Path.**, v. 45, n. 4, p. 493-496. 1966.

BECEIRO, A; TOMÁS, M; BOU, G. Antimicrobial resistance and virulence: a successful or deleterious association in the bacterial world? **Clin. Microbiology.**, p. 185-230, 2013.

BONNET, R.; DUTUOR, C.; SAMPAIO, J. L. M.; CHANAL, C.; SIROT, D.; LABIA, R., DE CHAMPS, C.; SIROT, J. Cefotaximase (CTX-M-16) with increased catalytic efficiency due to substitution Asp-240->Gly. **Antimicrob. Agents Chemother.**, p. 2269-2275, 2001.

BROLUND, A. Overview of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* from a Nordic perspective. **Inf. Ecology and Epidemiol.**, v. 4, p. 24555, 2014.

BUSH, K.; JACOBY, G. A.; MEDEIROS, A. A. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 39, p. 1211-1233, 1995.

BUSH, K; JACOBY, G. A. Updated functional classification of β -lactamases. **Antimicrobial Agents. Chemoth.**, v. 54, n. 3, p. 969-976, 2010.

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.

CABRAL, J. P. S. Water microbiology. Bacterial pathogens and water. **Int. J. Environ. Res. Public Health.**, v. 7, p. 3657-3703, 2010.

CAMARGO, I. L.; GILMORE, M. S.; DARINI, A. L. Multilocus sequence typing and analysis of putative virulence factors in vancomycin-resistant and vancomycin-sensitive

Enterococcus faecium isolates from Brazil. **Clin Microbiol Infect.**, v. 12, n. 11, p. 1123-30, 2006.

CASTANHEIRA, M.; PEREIRA, A. S.; NICOLETTI, A. G.; PIGNATARI, A. C.; BARTH, A. L.; GALES, A. C. First report of plasmid-mediated *qnrA1* in a ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* strain in Latin America. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 51, n. 4, p. 1527-1529, 2007.

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

CAVACO, L. M.; HASMAN, H.; XIA, S.; AARESTRUP, F. M. *qnrD*, 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.

CHAGAS, T. P. G.; SEKI, L. M.; SILVA, D. M.; ASENSI, M. D. Occurrence of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in hospital wastewater. **J. Hosp. Infect.**, v. 77, p. 274-283, 2011.

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.

CHEMALY, R. F.; SIMMONS, S.; DALE, C.; GHANTOJI, S. S.; RODRIGUEZ, M.; GUBB, J.; STACHOWIAK, J.; STIBICH, M. The role of the healthcare environment in the spread of multidrug-resistant organisms: update on current best practices for containment. **Ther. Adv. Infect. Dis.**, v. 2, p. 79-90, 2014.

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

CLERMONT, O.; CHRISTENSON, J. K.; DENAMUR, E.; GORDON, D. M. The clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. **Environ. Microbiol. Reports.**, v. 66, n. 1, p. 58-65, 2013.

CLERMONT, O.; JOHNSON, J. R.; MENARD, M.; DENAMUR, E. Determination of *Escherichia coli* O types by allele-specific polymerase chain reaction: application to the O types involved in human septicemia. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 57, p. 129-136, 2006.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals - fourth edition. **CLSI document VET01-A4**, v. 33, n. 7, USA, 2013a.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 23st supplemento informativo. **CLSI document M100-S23**, USA, 2013b.

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 baumannii* producing the OXA-23 enzyme in Curitiba, Brazil. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, p. 3403-3406, 2003.

DALMARCO, E.M.; BLATT, S.L.; CÓRDOVA, C.M.M. Identificação laboratorial de β -lactamases de espectro estendido (ESBLs) – Revisão. **RBAC.**, v. 38, n 3, p. 171-177, 2006.

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.

DRAWZ, A. M.; BONOMO, R. A. Three decades of β -lactamase inhibitors. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 23, n. 1, p. 160-201, 2010.

DRLICA, K.; ZHAO, X. DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 61, p. 377-392, 1997.

DROPA, M.; BALSALOBRE, L. C.; LINCOPAN, N.; MAMIZUKA, E. M.; CASSETTARI, V. C.; MATTÉ, G. R.; MATTÉ, M. H. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* carrying the novel extended-spectrum beta-lactamase gene variants *bla*(SHV-40), *bla*(TEM-116) and the class 1 integron-associated *bla*(GES-7) in Brazil. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 16, n. 6, p. 630-2, 2010.

FERRARI, R.; GALIANA, A.; CREMADES, R.; RODRÍGUEZ, J. C.; MAGNANI, M.; TOGNIM, M. C. B.; OLIVEIRA, T. C. R. M.; ROYO, G. Plasmid-mediated quinolone resistance by genes *qnrA1* and *qnrB19* in *Salmonella* spp. strains isolated in Brazil. **J. Infect. Dev. Ctries.**, v. 5, n. 6, p. 496-498, 2011.

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

FONTES, L.; OLIVEIRA, S. ; SATO, M. I. Z. ; HACHICHI, E. M. ; LINCOPAN, N. Dissemination of *bla*_{CTX-M}, *qnr*, *bla*_{SPM-1} and *rmtD* genes in an urban river, Brazil. In: **51st ICAAC Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy.**, Chicago, 2011b.

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.

GALLER, H.; FEIERL, G.; PETTERNEL, C.; REINTHALER, F. F.; HAAS, D.; GRISOLD, A. J.; LUXNER, J.; ZARFEL, G. KPC-2 and OXA-48 carbapenemase-harboursing *Enterobacteriaceae* detected in an Austrian wastewater treatment plant. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 20, 2014.

GUESSENND, N.; BREMONT, S.; GBONON, V.; KACOU-NDOUBA, A.; EKAZA, E.; LAMBERT, T.; DOSSO, M.; COURVALIN, P. Resistance aux quinolones de type qnr chez les enterobacteries productrices de beta-lactamases a spectre elargi a Abidjan en Cote d'Ivoire. **Path. Biol.**, v. 56, p. 439-446, 2008.

GIRLICH, D.; POIREL, L.; NORDMANN, P. Novel ambler class A carbapenem-hydrolyzing β -lactamase from a *Pseudomonas fluorescens* isolate from the Seine river, Paris, France. **Antimicrob. Agents and Chemother.**, v. 54, n. 1, p. 328-332, 2010.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Quim. Nova.**, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.

GUSATTI, C. S.; FERREIRA, A. E.; FUENTEFRIA, D. B.; CORÇÃO, G. Resistência a β -lactâmicos em *Acinetobacter* spp isolados de efluente hospitalar no sul do Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 42, n. 2, 2009.

HAWKEY, P. M. Mechanisms of quinolone action and microbial response. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 51, p. 29-35, 2003.

HOSOGLU, S.; GUNDES, S.; KOLAYH, F.; KARADENIZLI, A.; DEMIRDAG, K.; GUNAYDM, M.; ALTMDIS, M., CAYLAN, R.; UCMAN, H. Extended-spectrum beta-lactamases in ceftazidime-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates in Turkish hospitals. **Indian J. of Med. Microbiol.**, v. 25, n. 4, p. 346-350, 2007.

ISOZUMI, R.; YOSHIMATSU, K.; YAMASHIRO, T.; HASEBE, F.; NGUYEN, B. M.; NGO, T. C.; YASUDA, S. P.; KOMA, T.; SHIMIZU, K.; ARIKAWA, J. *bla*_{NDM-1}-positive *Klebsiella pneumoniae* from environment, Vietnam. **Emerging Infect. Dis.**, v. 18, n. 8, 2012.

JACOBY, G. A.; GACHARNA, N.; BLACK, T. A.; MILLER, G. H.; HOOPER, D. C. Temporal appearance of plasmid-mediated quinolone resistance genes. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 53, p. 1665-1666, 2009.

JACOBY, G. A.; STRAHILEVITZ, J.; HOOPER, D. C. Plasmid-mediated quinolone resistance. **Microbiol. Spectr.**, v. 2, n. 2, 2014.

JÁCOME, P. R. L. A.; ALVEZ, L. R.; CABRAL, A. B.; LOPES, A. C. S.; MACIEL, M. A. V. First report of KPC-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Brazil. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 2012.

JARLIER, V.; NICOLAS, M.H.; FOURNIER, G.; PHILIPPON, A. Extended broad-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. **Rev. Infect. Dis.**, v. 10, n. 4, p. 867-878, 1988.

JOHNSON, A. P.; WOODFORD, N. Global spread of antibiotic resistance: the example of New Delhi metallo- β -lactamase (NDM)-mediated carbapenem resistance. **J. Med. Microbiol.**, v. 62, p. 499-513, 2013.

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.

KARAH, N.; GISKE, C. G.; SUNDSFJORD, A.; SAMUELSEN, O. A diversity of OXA-carbapenemases and class 1 integrons among carbapenems-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Sweden belonging to different international clonal lineages. **Microbiol. Drug. Resist.**, v. 17, n. 4, 2011.

KIFFER, C. R. V.; CAMARGO, E. C. G.; SHIMAKURA, S. E.; RIBEIRO, P. J.; BAILEY, T. C.; PIGNATARI, A. C. C.; MONTEIRO, A. M. V. A spatial approach for the epidemiology of antibiotic use and resistance in community-based studies: the emergence of urban clusters of *Escherichia coli* quinolone resistance in Sao Paulo, Brazil. **Int. J. Health Geograph.**, v. 10, n. 17, 2011.

KIM, H. K.; PARK, C. H.; KIM, C. J.; KIM, E. C.; JACOBY, G. A.; HOOPER, D. C. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants over a 9-year period. **Antimicrob. Agents. Chemother.**, p. 639-645, 2009.

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.**, v. 20, n. 12, p. 1735-1743, 2010.

KUMMERER, K. Antibiotics in the aquatic environment – a review – part I. **Chemosp.**, v. 75, p. 417-434, 2009.

LAHEY HOSPITAL & MEDICAL CENTER. Disponível em: <www.lahey.org>. Acesso em 21 de fev. 2015.

LAPARA, T. M.; BURCH, T. R.; MCNAMARA, P. J.; TAN, D. T.; YAN, M.; EICHMILLER, J. J. Tertiary-treated municipal wastewater is a significant point source of antibiotic resistance genes into duluth-superior harbor. **Environ. Sci. Technol.**, v. 45, p. 9543-9549, 2011.

LEIGUE, L.; WARTH, J. F. G.; MELO, L. C.; SILVA, K. C.; MOURA, R. A.; BARBATO, L.; SILVA, L. C.; SANTOS, A. C. M.; SILVA, R. M.; LINCOPAN, N. MDR ST2179-CTX-M-15 *Escherichia coli* co-producing RmtD and AAC(6')-Ib-cr in a horse with extraintestinal infection, Brazil. **J. Antimicrob. Chemother.**, 2014.

LEIGUE, L.; MELO, L. C.; MOURA, Q.; NASCIMENTO, T.; SARTORI, L.; SILVA, K. C.; DROPA, M.; CASTRO, A. F. P.; MORENO, A. M.; LINCOPAN, N. Diversity of CTX-M extended-spectrum β -lactamase genes and phylogenetic background of human, veterinary and environmental *Escherichia coli* strains isolated from Brazil. **Submitted.**, 2015.

LESHER, G. Y.; FROELICH, E. J.; GRUETT, M. D.; BAILEY, J. H.; BRUNDAGE, R. P. 1, 8-Naphthyridine derivatives, a new class of chemotherapeutic agents. **J. Med. Pharm. Chem.**, v. 91, p. 1063-1065, 1962.

- LI, J.; WANG, T.; SHAO, B.; SHEN, J.; WANG, S.; WU, Y. Plasmid-mediated quinolone resistance genes and antibiotic residues in wastewater and soil adjacent to swine feedlots: potencial transfer to agricultural lands. **Environ. Health. Perspect.**, v. 120, n. 8, 2012.
- LINCOPAN, N.; LEIS, R.; VIANELLO, M. A.; 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.
- LINDER, J. A.; HUANG, E. S.; STEINMAN, M. A.; GONZALES, R.; STAFFORD, R. S. Fluoroquinolone prescribing in the United States: 1995 to 2002. **Am. J. Med.**, p. 259–268, 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.; KAHLMEYER, 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.**, v. 18, p. 268-281, 2012.
- MARQUES, M. V. Biologia molecular e genética bacteriana. – Ribeirão Preto. **Ed. Sociedade Brasileira de Genética.**, 2012.
- MARTI, E.; BALCÁZAR, J. L. Real-time PCR assays for quantification of qnr genes in environmental water samples and chicken feces. **Ap. Environ. Microbiol.**, v. 79, n. 5, p. 1743-1745, 2013.
- MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L.; ELIECER-CANO, M.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ J.; CALVO, J.; PASCUAL, A. Plasmid mediated quinolone resistance. **Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.**, v. 6, p. 685-711, 2008.

MARTÍNEZ, T.; VÁZQUEZ, G. J.; AQUINO, E. R.; MARTÍNEZ, I.; ROBLEDO, I. E. *ISEcp1*-mediated transposition of *bla_{KPC}* into the chromosome of a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii* from Puerto Rico. **J. Med. Microbiol.**, v 63, p. 1644-1648, 2014.

MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L.; GONZÁLEZ-LÓPEZ, J. J. Carbapenemases in *Enterobacteriaceae*: Types and molecular epidemiology. **Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.**, v. 32, n. 4, p. 4-9, 2014.

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, n. 3, p. 49-55, 1997.

MEDEIROS, M.; LINCOPAN, N. Oxacillinase (OXA)-producing *Acinetobacter baumannii* in Brazil: clinical and environmental impact and therapeutic options. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 49, n. 6, p. 391-405, 2013.

MELO, L. C.; LINCOPAN, N. Commensal microbiota of companion animals as reservoirs of *bla*CTX-M extended-spectrum beta-lactamase genes. In: 53th ICAAC - **International Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Denver, EUA, 2013.

MINARINI, L. A. R.; DARINI, A. L. C. Mutations in the quinolone resistance-determining regions of *gyrA* and *parC* in *Enterobacteriaceae* isolates from Brazil. **Brazilian J. Microbiol.**, p. 1309-1314, 2012.

MINARINI, L. A. R.; GALES, A. C.; PALAZZO, I. C. V.; DARINI, A. L. Prevalence of community-occurring extended spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Brazil. **Cur. Microbiol.**, v. 54, p. 335-341, 2007.

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

MLST DATABASES AT UOW. The University of Warwick. Disponível em: <<http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli/>>. Acesso em 01 de dez. 2014.

MLST DATABASES. Instituto Pasteur. Disponível em: <www.pasteur.fr/mlst>. Acesso em 01 de dez. 2014.

MONTEIRO, J.; SANTOS, A. F.; ASENSI, M. D.; PEIRANO, G.; GALES, A. C. First report of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. **Antimicrob. Agents. Chemother.**, v. 53, n. 1, p. 333-334, 2009.

MONTEZZI, L. F. ; CAMPANA, E. H. ; CORRÊA, L. L. ; JUSTO, L. H. ; PASCHOAL, R. P. ; SILVA, I. L. V. D. ; SOUZA, M. C. M. ; DROLSHAGEN, M.; PICÃO, R. C. Occurrence of carbapenemase-producing bacteria in coastal recreational waters. **Int. J. Antimicrob. Agents.**, v. 45, p. 174-177, 2015.

MOURA, R; OLIVEIRA, S.; SILVA, K.; PAVEZ, M.; HACHICH, E.; SATO, M.; MAMIZUKA, E.; PESTANA, A.; LINCOPAN, N. Environmental CC258 KPC-2-producing

Klebsiella pneumoniae, Brazil. In: **52st ICAAC Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, San Francisco, EUA, 2012.

MUNIER, G. K.; JOHNSON, C. L.; SNYDER, J. W.; MOLAND, E. S.; HANSON, N. D.; THOMSON, K. S. Positive extended-spectrum- β -lactamase (ESBL) screening results may be due to AmpC β -lactamases more often than to ESBLs. **J. Clin. Microbiol.**, v. 48, n. 2, p. 673-674, 2010.

MUZAHEED; DOI, Y.; ADAMS-HADUCH, J. M.; ENDIMIANI, A.; SIDJABAT, H. E.; GADDAD, S. M.; PATERSON, D. L. High prevalence of CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* among inpatients and outpatients with urinary tract infection in Southern India. **J. Antimicrob. Chemother.**, p. 1393-1394, 2008.

NAQUIN, A.; SHRESTHA, A.; SHERPA, M.; NATHANIEL, R.; BOOPATHY, R. Presence of antibiotic resistance genes in a sewage treatment plant in Thibodaux, Louisiana, USA. **Bioresour. Technol.**, 2015.

NASCIMENTO, T.; CANTAMESSA, R.; LINCOPAN, N. KPC-2 and CTX-M-1-Producing *Enterobacteriaceae* in an Urban Lake, Brazil, In: 53th ICAAC - **International Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Denver, EUA, 2013.

NASEER, U.; SUNDSFJORD, A. The CTX-M conundrum: dissemination of plasmids and *Escherichia coli* clones. **Microb. Drug Resist.**, v. 17, n. 1, p. 83-97, 2011.

NEUHAUSER, M. M.; WEINSTEIN, R. A.; RYDMAN, R.; DANZIGER, L. H.; KARAM, G.; QUINN, J. P. Antibiotic resistance among gram-negative bacilli in US intensive care units: implications for fluoroquinolone use. **JAMA.**, p. 885-888, 2003.

NORDMANN, P.; NAAS, T.; POIREL, L. Global spread of carbapenemases-producing *Enterobacteriaceae*. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 17, n. 10, p. 1791-1798, 2011.

NORDMANN, P.; POIREL, L.; WALSH, T. R.; LIVERMORE, D. M. The emerging NDM carbapenemases. **Trends. Microbiol.**, v. 19, n. 12, 2011.

NOVAIS, A.; VIANA, D.; BAQUERO, F.; MARTÍNEZ-BOTAS, J.; CANTÓN, R.; COQUE, T. M. Contribution of IncFII and broad-host IncA/C and IncN plasmids to the local expansion and diversification of phylogroup B2 *Escherichia coli* ST131 clones carrying *bla*_{CTX-M-15} and *qnrS1* genes. **Antimicrob. Agents. Chemoter.**, p. 2763-2766, 2012.

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: **26º Congresso Brasileiro de Microbiologia**, Foz de Iguaçu, 2011.

OLIVEIRA, S.; MOURA, R. A.; SILVA, K. C.; PAVEZ, M.; MCCULLOCH, J. A.; DROPA, M.; MATTÉ, M. H.; MAMIZUKA, E. M.; SATO, M. I.; CASTRO, P. A. F.; LINCOPAN, N. Isolation of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains belonging to the high-risk multiresistant clonal complex 11 (ST437 and ST340) in urban rivers. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 69, n. 3, p. 849-852, 2014.

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, p. 3953-3955, 2006.

PARK, Y. J.; LEE, S.; KIM, Y. R.; OH, E. J.; WOO, G. J.; LEE, K. Occurrence of extended-spectrum β -lactamases and plasmid-mediated AmpC β -lactamases among Korean isolates of *Proteus mirabilis*. **J. Antimicrob. Chemother.**, p. 156-158, 2005.

PASTERNAK, J. Novas metodologias de identificação de micro-organismos: MALDI-TOF. **Einstein (São Paulo)**, São Paulo, v.10, n. 1, p. 118-119, 2012.

PATON, J. H.; REEVES, D. S. Fluoroquinolone antibiotics. Microbiology, pharmacokinetics and clinical use. **Drugs**, v. 36, p. 193-228, 1988.

PAVEZ, M.; MAMIZUKA, E. M.; LINCOPAN, N. Early dissemination of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. **Antimicrob. Agents. Chemother.**, v. 53, n. 6, p. 2702, 2009.

PEIRANO, G.; ASENSI, M. D.; PITONDO-SILVA, A.; PITOUT, J. D. D. Molecular characteristics of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* from Rio de Janeiro, Brazil. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 17, n. 7, p. 1039–1043, 2011.

PEIRANO, G.; SEKI, L. M.; PASSOS, V. L.; PINTO, M. C. F. G.; GUERRA, L.; ASENSI, M. D. Carbapenem-hydrolysing β -lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 63, p. 265-268, 2009.

PENTEADO, A. P.; CASTANHEIRA, M.; PIGNATARI, A. C. C.; GUIMARÃES, T.; MAMIZUKA, E. M.; GALES, A. C. Dissemination of *bla*_{IMP-1}-carrying integron In86 among *Klebsiella pneumoniae* isolates harboring a new trimethoprim resistance gene *dfr23*. **Diag. Microbiol. Inf. Dis.**, v. 63, p. 87-91, 2009.

PEREIRA, P. S.; ARAUJO, C. F. M.; SEKI, L. M.; ZAHNER, V.; CARVALHO-ASSEF, A. P. D.; ASENSI, M. D. Update of the molecular epidemiology of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil: spread of clonal complex 11 (ST11, ST437 and ST340). **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 68, p. 312-316, 2013.

PÉREZ-PÉREZ, F. J.; HANSON, N. D. Detection of plasmid-mediated AmpC β -lactamase in genes clinical isolates by using multiplex PCR. **J. Clin. Microbiology**, v. 40, n. 6, 2002.

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.

PFEIFER, Y.; CULLIK, A.; WITTE, W. Resistance to cephalosporins and carbapenems in gram-negative bacterial pathogens. **Int. J. Med. Microbiol.**, v. 300, n. 6, p. 371-379, 2010.

PICÃO, P. C.; CARDOSO, J. P.; CAMPANA, E. H.; NICOLETTI, A. G.; PETROLINI, F. V., ASSIS, D. M.; JULIANO, L.; GALES, A. C. The route of antimicrobial resistance from the hospital effluent to the environment: focus on the occurrence of KPC-producing

Aeromonas spp. and *Enterobacteriaceae* in sewage. **Diag. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 76, n. 1, p. 80-85, 2013.

PINDI, P. K.; YADAV, P. R.; SHANKER, A. S. Identification of opportunistic pathogenic bacteria in drinking water samples of different rural health centers and their clinical impacts on humans. **Biomed. Res. Int.**, 2013.

POIREL, L.; BARBOSA-VASCONCELOS, A.; SIMÕES, R. R.; COSTA, P. M.; LIU, W.; NORDMANN, P. Environmental KPC-producing *Escherichia coli* isolates in Portugal. **Antimicrob. Agents. Chemother.**, v. 56, n. 3, p. 1662-1663, 2012.

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.

QUEENAN, A. M.; BUSH, K. Carbapenemases: the versatile β -lactamases. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 20, n. 3, p. 440-458, 2007.

RIBEIRO, V. B.; ZAVASCKI, A. P.; NODARI, C. S.; DANDRI, A. M.; SILVA, M. P.; CAMPOS, J. C.; SAMPAIO, J. L.; BARTH, A. L. Detection of *bla*_{KPC-2} in a carbapenem-resistant *Kluyvera georgiana*. **J. Antimicrob. Chemother.**, 2012.

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, 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.

ROBLEDO, I. E.; AQUINO, E. E.; SANTÉ, M. I.; SANTANA, J. L.; OTERO, D. M.; LEÓN, C. F.; VÁZQUEZ, G. J. Detection of KPC in *Acinetobacter* spp. in Puerto Rico. **Antimicrob. Agents. Chemother.**, v. 54, n. 3, p. 1354-1357, 2010.

SALLEM, R. B.; SLAMA, K. B.; ESTEPA, V.; CHEIKHNA, E. O.; MOHAMED, A. M.; CHAIRAT, S.; RUIZ-LARREA, F.; BOUDABOUS, A.; TORRES, C. Detection of CTX-M-15-producing *Escherichia coli* isolates of lineages ST410-A, ST617-A and ST354-D in faecal samples of hospitalized patients in a Mauritanian hospital. **J. Chemother.**, 2014.

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

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

SOUZA, S. M. L.; VASCONCELOS, E. C.; DZIEDZIC, M.; OLIVEIRA, C. M. R. Environmental risk assessment of antibiotics: an intensive care unit analysis. **Chemosp.**, v. 77, p. 962-967, 2009.

TAKAHASHI, J. P.; SHOENLEIN-CRUSIUS, I. H.; GRUPPI, V. T.; MOREIRA, C. G. Geofungos no córrego do sapateiro, parque municipal do Ibirapuera, São Paulo, Brasil. **Hoehnea**, v. 39, n. 2, p. 287-295, 2012.

TALUKDAR, P. K.; RAHMAN, M.; RAHMAN, M.; NABI, A.; ISLAM, Z.; HOQUE, M. M.; ENDTZ, H.; ISLAM, M. A. Antimicrobial resistance, virulence factors and genetic diversity of *Escherichia coli* isolates from household water supply in Dhaka, Bangladesh. **PLOS ONE**, v. 8, n. 4, 2013.

TISSERA, S.; LEE, S. M. Isolation of extended spectrum β -lactamase (ESBL) producing bacteria from urban surface water in Malaysia. **Malays J. Med. Sci.**, v. 20, n. 3, p. 14-22, 2013.

VAN BAMBEKE, F.; MICHOT, J. M.; VAN ELDERE, J.; TULKENS, P. M. Quinolones in 2005: an update. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 11, p. 256-80, 2005.

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. **Biochemist.**, v. 16, p. 9825-9835, 2008.

VILLEGAS, M. M.; KATTAN, J. N.; QUINTEROS, M. G.; CASELLAS, J. M. Prevalence of extended-spectrum β -lactamases in South America. **Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 14, n. 1, p. 154-158, 2008.

VON NUSSBAUM, F.; BRANDS, M.; HINZEN, B.; WEIGAND, S.; HABICH, D. Antibacterial natural products in medicinal chemistry – exodus or revival? **Angew. Chem. Int. Ed.**, v. 45, p. 5072-5129, 2006.

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.

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, n. 1, p. 124-133, 2008.

WOODFORD, N.; WAREHAM, D. W.; GUERRA, B.; TEALE, C. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* and non-*Enterobacteriaceae* from animals and the environment: an emerging public health risk of our own making? **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 69; p. 287-291, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Guidelines for drinking-water quality - 4rd ed, 2011.

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

ZAVASCKI, A. P.; MACHADO, A. B. M. P.; OLIVEIRA, K. R. P.; SUPERTI, S. V.; PILGER, D. A.; CANTARELLI, V. V.; PEREIRA, P. R.; LIEBERKMECHT, A. C.; BARTH, A. L. KPC-2-producing *Enterobacter cloacae* in two cities from Southern Brazil. **Int. J. Antimicrob. Agents.**, v. 34, p. 281-291, 2009.

ZHANG, X; LU, X; ZONG, Z. *Enterobacteriaceae* producing the KPC-2 carbapenemase from hospital sewage. **Diag. Microbiol. Inf. Dis.**, n. 73, p. 204-206, 2012.

ZHANG, X; ZHANG, T; FANG, H. H. P. Antibiotic resistance genes in water environment. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 82, p. 397-414, 2009.

ZHAO, J. Z.; CHEN, Z.; CHEN, S.; DENG, Y.; LIU, Y.; TIAN, W.; HUANG, X.; WU, C.; SUN, Y.; SUN, Y.; ZENG, Z.; LIU, J. H. Prevalence and disseminations of *oqxAB* in *Escherichia coli* isolates from animals, farmworkers, and the environment. **Antimicrob. Agents. Chemother.**, v. 54, n. 10, 2010.

ZURFLUH, K; HACHLER, H.; NUESCH-INDERBINEN, M.; STEPHAN, R. Characteristics of extended-spectrum β -Lactamase and carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* isolates from rivers and lakes in Switzerland. **Ap. Environ. Microbiology.**, v. 79, n. 9, p. 3021-3026, 2013.

ANEXOS

Anexo 1. Fenótipo de resistência de bactérias gram-negativas isoladas de amostras de água, realizado pelo método de Kirby-Bauer (Continua).

Isolados	Classes de Antimicrobianos (ponto de corte CLSI, 2013a)													
	B-lact. (14-17)	Cefal. III (23-25)	Cefal. III (20-22)	Cefal. III (18-20)	Cefal. IV (15-17)	Cefam. (15-17)	Aminog. (15-16)	Aminog. (13-14)	Fosfom. (13-15)	Sulfon. (13-16)	Fluorq. (16-20)	Carbap. (19-21)	Carbap. (20-22)	Tetrac. (14-19)
	AMC	CTX	CRO	CAZ	CPM	CFO	AMI	GEN	FOS	SUT	CIP	ETP	IMP	TIG
A1	0	20	20	28	28	0	24	22	22	0	30	24	26	12
A2	10	18	18	14	30	10	20	20	34	30	24	28	26	24
A3	22	32	34	30	32	24	22	12	36	0	08	36	30	22
A4	16	22	20	24	26	0	26	16	18	08	18	14	30	16
A5	18	32	30	30	30	26	22	20	36	0	0	32	30	22
A6	16	12	08	18	14	24	20	12	26	0	08	24	30	18
B1	24	32	30	24	32	24	20	18	24	20	22	26	26	20
B2	30	36	36	30	32	24	20	20	18	20	36	30	22	20
B3	12	28	26	26	32	0	26	28	0	22	40	14	20	20
B4	18	22	22	18	22	16	20	20	20	26	28	14	26	20
B5	08	30	30	26	30	0	20	20	18	26	32	08	0	20
B6	08	12	08	22	18	0	12	0	24	24	26	0	0	26
C1	0	24	22	24	34	0	30	24	0	18	32	08	18	18
C2	0	20	22	26	32	0	30	26	0	28	34	0	12	22
C3	0	30	30	26	34	0	20	20	28	26	32	30	24	24
C4	08	27	30	24	30	0	20	18	20	26	24	21	21	20
C5	08	26	30	19	30	18	20	20	14	0	20	29	24	20
C6	10	25	24	18	32	08	22	20	38	0	24	27	24	21
C7	22	30	30	24	30	28	18	18	30	0	28	30	24	21
C8	22	30	28	22	30	24	22	0	34	0	22	30	26	22
C9	18	14	14	0	20	32	18	18	44	24	22	24	26	24
C10	08	32	30	26	34	0	20	18	19	26	24	23	24	22

Sombreado indicando isolados resistentes ou intermediários.

Anexo 1. Fenótipo de resistência de bactérias gram-negativas isoladas de amostras de água, realizado pelo método de Kirby-Bauer.

Isolados	Classes de Antimicrobianos (ponto de corte CLSI, 2013a)													
	B-lact. (14-17)	Cefal. III (23-25)	Cefal. III (20-22)	Cefal. III (18-20)	Cefal. IV (15-17)	Cefam. (15-17)	Aminog. (15-16)	Aminog. (13-14)	Fosfom. (13-15)	Sulfon. (13-16)	Fluorq. (16-20)	Carbap. (19-21)	Carbap. (20-22)	Tetrac. (14-19)
	AMC	CTX	CRO	CAZ	CPM	CFO	AMI	GEN	FOS	SUT	CIP	ETP	IMP	TIG
D1	12	36	36	26	34	24	22	20	08	24	32	26	22	18
D2	0	21	22	24	26	0	24	20	26	0	36	18	24	12
D3	0	16	12	16	14	09	18	18	24	14	18	0	12	18
D4	0	22	22	26	30	0	24	22	16	0	36	08	22	12
D5	0	09	0	08	08	0	20	18	24	0	0	0	0	20
D6	0	0	0	0	0	0	18	0	30	0	08	0	12	12
D7	18	0	0	14	18	24	18	12	32	0	0	24	28	22
D8	18	30	28	24	30	26	18	0	30	0	26	30	28	22
D9	18	30	28	24	26	24	18	0	30	0	24	26	26	20
D10	14	08	08	14	14	22	20	12	28	0	0	24	26	22
D11	18	30	26	24	28	24	22	12	30	0	0	30	30	24
F1	0	24	20	28	30	0	24	24	30	0	34	12	24	12
F2	0	08	0	08	19	0	14	18	36	0	0	18	22	24
F3	09	14	12	12	24	08	14	18	32	0	0	24	21	22
G1	14	20	20	24	24	0	23	20	18	0	30	18	30	18
G2	14	27	24	24	24	0	20	18	34	0	0	26	24	18
G3	14	34	34	28	30	24	22	11	40	0	24	24	20	22
G4	08	28	24	24	28	0	20	18	24	24	28	30	24	20
G5	18	30	28	26	30	0	22	18	20	28	3	30	26	20
G6	0	0	0	0	12	08	18	18	0	30	26	26	24	26
H1	14	22	18	18	18	10	24	24	18	24	30	0	30	18
H2	0	18	16	24	20	0	14	18	18	0	30	0	18	22
H3	08	08	0	13	12	0	28	22	28	36	32	0	0	24
H4	12	22	20	12	24	24	24	20	24	20	23	19	30	18
H5	12	18	22	20	24	0	24	22	16	0	30	0	30	14
H6	0	12	11	0	18	0	18	18	24	24	24	08	18	18
H7	18	26	28	24	30	24	20	18	28	0	08	20	24	18
H8	15	24	24	22	26	20	22	18	24	24	0	20	28	18

Sombreado indicando isolados resistentes ou intermediários.