



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**

**Centro Biomédico**

**Faculdade de Ciências Médicas**

**Julianna Giordano Botelho Olivella**

**Caracterização de cepas de enterobactérias multirresistentes isoladas em amostras de fezes de pacientes atendidos no Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE)**

Rio de Janeiro

2018

Julianna Giordano Botelho Olivella

**Caracterização de cepas de enterobactérias multirresistentes isoladas em amostras de fezes de pacientes atendidos no Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE)**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Ribeiro Bello

Coorientador: Prof. Dr. José Augusto Adler Pereira

Rio de Janeiro

2018

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

O48 Olivella, Julianna Giordano Botelho.

Caracterização de cepas de enterobactérias multirresistentes isoladas em amostras de fezes de pacientes atendidos no Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE) / Julianna Giordano Botelho Olivella – 2018.  
110 f.

Orientador: Alexandre Ribeiro Bello.

Coorientador: José Augusto Adler Pereira.

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Ciências Médicas.

1. Enterobactérias - Teses. 2. Microbiota – Teses. 3. Infecções por Enterobacteriaceae. 4. Microbioma Gastrointestinal. I. Bello, Alexandre Ribeiro. II. Pereira, José Augusto Adler. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 576.851.49

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira  
CRB7/6382

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

---

Assinatura

---

Data

Julianna Giordano Botelho Olivella

**Caracterização de cepas de enterobactérias multirresistentes isoladas em amostras de fezes de pacientes atendidos no Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE)**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 10 de janeiro de 2018.

Orientador : Prof. Dr. Alexandre Ribeiro Bello

Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Coorientador: Prof. Dr. José Augusto Adler Pereira

Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Banca Examinadora:

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Cintia Silva dos Santos

Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Fátima Napoleão

Hospital Universitário Pedro Ernesto

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Renata Garcia Costa

Fundação Oswaldo Cruz

Rio de Janeiro

2018

## DEDICATÓRIA

Dedico minha formação em Mestre aos meus pais Mauro e Veronica, meus avôs paternos José (*in memorian*) e Alice e maternos Carlos (*in memorian*) e Jacyra, que sempre foram impulsionadores dos meus sonhos, abrigo necessário em todos os momentos e companheiros eternos em todos as situações.

## AGRADECIMENTOS

Agradecer primeiramente a toda fé que tenho em minhas forças espirituais, que não me deixaram desistir mesmo que o caminho fosse tortuoso. Que proveram a luz, me indicaram a direção a seguir, para que o melhor fosse feito para mim e minha família em todos os aspectos.

Aos meus pais Mauro e Veronica, por todo amor, cumplicidade, incentivo, horas de sono mal dormidas, viagens fantásticas, conversas sobre o futuro e principalmente por serem a base sólida para o meu crescimento e o porto seguro sempre quando precisei na volta para a casa.

Aos meus avós, tios e primos, em especial a tia Rosana, tio Ricardo, além das minhas primas (quase irmãs) Marina e Leticia, que são peças fundamentais no meu dia-a-dia, seja numa palavra, num abraço, uma risada ou em qualquer tipo de conforto.

Aos meus orientadores Alexandre Bello e José Augusto, por todas as horas em reuniões produtivas, por todo o conhecimento entregue a mim por vocês, meu muito obrigada sempre. Os ensinamentos levarei para a vida, junto com toda a força de vontade e fé que sempre me instruíram.

Aos meus melhores amigos Diego e Isadora, por serem exatamente o que são em todos os momentos. Sejam nos momentos de alegria e diversão ou em momentos tristes, vocês estão lá, mesmo que não fisicamente. O que eu sou hoje, a minha evolução mental e psicológica, como mulher, eu devo muito a vocês. Seja a amizade de 10 ou 20 anos, o que importa é que somos únicos e verdadeiros em cada pedaço de nós.

Aos meus grandes amigos: Bernardo, Gabriel, Ingrid, Lucas, Marcella, Natália e Thais, por todo o carinho e amor que transborda sempre a cada vez que nos reunimos. As risadas, os abraços e todo o resto me fazem seguir com um sorriso enorme e uma garantia de que sempre atraímos, quem realmente é parecido com a gente, então não teria como ser diferente. Obrigada por toda a energia incrível de sempre!

A minha 2008.1 de graduação da Universidade Gama Filho, ainda tão presente e pulsante em minha vida e memória. Obrigada por cada trabalho (sempre com muita discussão), cada grito, cada frase de incentivo como “Segurem a Julianna na trilha, ela não pode cair!” e logo em seguida “Ela caiu de novo!”. Obrigada pelas risadas de sempre, pelos conselhos, pelos problemas, pelas soluções e por serem vocês o grupo seletivo de biólogos que eu me espelho e me sinto parte integrante.

A minha segunda casa, o Departamento de Microbiologia, mais precisamente o laboratório 06, que me viu sorrir, chorar, dançar, me irritar, chorar e sorrir, na intensidade dos nossos sonhos compartilhados diariamente.

A minha família laboratorial: Barbara, Bruna, Paula (e Dudu), Professora Ana Guaraldi, Professora Cintia, Lais, Yuri e todos do laboratório 3. Muito obrigada por cada pedido atendido ou não, por todo abraço, por todos os bom dias, por todos os salvamentos, por todos os choros, por todas as risadas, simplesmente por tudo! Sem vocês eu não seria absolutamente nada em minha vida pós-graduada, e eu devo muito do meu crescimento a vocês!

As outras pessoas que eu possa ter me esquecido de citar, porém estão no meu coração, orações e pensamentos, um enorme muito obrigada!

E se tropeçar, do chão não vai passar, quem sete vezes cai, levanta oito. Quem julga saber e esquece de entender, coitado de quem se interessa pouco. E quando chorar, tristeza pra lavar, num ombro cai metade do sufoco. O novo virá pra re-harmonizar, a terra, a água e o fogo. E sem se queixar, as peças vão voltar pra mesma caixa no final do jogo. Pode esperar, o tempo nos dirá e nada como um dia após o outro.

*Tiago Iorc e Daniel Lopes*



## RESUMO

OLIVELLA, Julianna Giordano Botelho. **Caracterização de cepas de enterobactérias multirresistentes isoladas em amostras de fezes de pacientes atendidos no Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE)**. 2018. 110 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

A microbiota intestinal de seres vivos apresenta uma elevada concentração de microrganismos complexos e diversificados, além disso, é um reconhecido reservatório de espécies bacterianas envolvidas no estabelecimento de processos infecciosos em ambiente nosocomial e comunitário. As espécies da família *Enterobacteriaceae* são bastonetes Gram-negativos de importância clínica que estão distribuídas nesses ambientes, fazendo parte do trato intestinal de humanos e animais, sendo capazes de colonizar pele, trato urinário e respiratório. As amostras fecais analisadas foram oriundas de pacientes internados e de ambulatoriais atendidos em um Hospital Universitário, considerando diversas unidades hospitalares. A avaliação fenotípica da resistências a antimicrobianos compreendeu os quatro principais grupos de antimicrobianos: cefalosporinas, aminoglicosídeos, fluorquinolonas e carbapenênicos. As enterobactérias foram isoladas através de semadura em meios MacConkeys seletivos contendo 32µg/mL de cefalexina e 8µg/mL de gentamicina. Foram analisadas 82 cepas de 30 pacientes internados e 92 cepas de 35 amostras fecais de pacientes ambulatoriais, através de teste de susceptibilidade aos antimicrobianos. As espécies de maior prevalência foram *Escherichia coli* (32,93%), *Citrobacter freundii* (14,63%), *Enterobacter cloacae* (14,63%) e *Klebsiella pneumoniae* (13,41%) para os pacientes nosocomiais. Já em relação aos pacientes ambulatoriais os maiores percentuais foram para *Escherichia coli* (25,00%), *Citrobacter freundii* (18,48%) e *Enterobacter cloacae* (15,22%). A resistência aos grupos de antimicrobianos, dentre as cepas ambulatoriais obtivimos que 68,6% foram resistentes a cefalosporinas de primeira geração, 9,0% de segunda geração, 23,2% de terceira geração e 13,1% de quarta geração, 9,0% resistentes a aminoglicosídeos, 11,1% resistentes a quinolonas e 12,1% resistentes a carbapenênicos. Quanto às cepas provenientes da Enfermaria observamos 71,4% resistentes a cefalosporinas de primeira geração, 22,3% de segunda geração, 33,0% de terceira geração e 35,7% de quarta geração, 16,0% resistentes a aminoglicosídeos, 42,8% resistentes a quinolonas e 21,4% resistentes a carbapenênicos. As cepas consideradas multirresistentes foram aquelas que possuíam resistência a 3 ou mais grupos de antimicrobianos, correspondendo a 12 cepas ambulatoriais (13,04%) e 32 cepas de pacientes internados (39,02%). Considerando que a transferência de elementos genéticos de resistência a antimicrobianos está ocorrendo ininterruptamente no ambiente hospitalar e comunitário, os resultados reforçam que medidas de barreira à transmissão de microrganismos e o uso mais criterioso de antimicrobianos são necessários para o controle da disseminação de microrganismos albergando elementos de resistência.

Palavras-chave: Microbiota intestinal. Enterobacteriaceae. Multirresistência.

## ABSTRACT

OLIVELLA, Julianna Giordano Botelho. **Identification and Analysis of multidrug resistant *Enterobacteriaceae* isolated from fecal samples at an University Hospital, Rio de Janeiro, Brazil.** 2018. 110 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

The intestinal microbiota of living organisms has a high concentration of complex and diversified microorganisms. In addition, it is a recognized reservoir of bacterial species involved in the establishment of infectious processes in a nosocomial and community environment. The *Enterobacteriaceae* family includes several species of Gram-negative rods with clinical importance, also they are part of the intestinal tract of humans and animals, being able to colonize the skin, urinary tract and respiratory tract. Fecal samples were collected from out and hospitalized patients attended at a University Hospital, and for the phenotypic antibiotic resistance rating was included four main groups of antimicrobials: cephalosporins, aminoglycosides, fluorquinolones and carbapenems. The strains were isolated through selective MacConkey media containing 32µg/mL cephalixin and 8µg/mL gentamicin. A total of 82 strains of 30 inpatients and 92 strains of 35 outpatient's fecal samples were analyzed by antimicrobial susceptibility test. The most prevalent bacteria were *Escherichia coli* (32.93%), *Citrobacter freundii* (14.63%), *Enterobacter cloacae* (14.63%) and *Klebsiella pneumoniae* (13.41%) for nosocomial patients. Among the outpatients, the highest percentages were *Escherichia coli* (25.00%), *Citrobacter freundii* (18.48%) and *Enterobacter cloacae* (15.22%). In relation to the inpatient strains, 71.4% were resistant to first-generation cephalosporins, 22.3% of second-generation, 33.0% of third-generation, 35.7% of fourth-generation, 16.0% resistant to aminoglycosides, 42.8% resistant to fluoroquinolones and 21.4% resistant to carbapenems. Regarding resistance to antimicrobial groups of outpatient strains, 68.6% were resistant to first-generation cephalosporins, 9.0% of second-generation, 23.2% of third-generation, 13.1% of fourth-generation, 9.0% resistant to aminoglycosides, 11.1% resistant to fluoroquinolones and 12.1% resistant to carbapenems. The strains considered multidrug resistant were those that had resistance to 3 or more antimicrobial groups, corresponding to 32 inpatient strains (39.02%) and 12 outpatient strains (13.04%). Considering that the transfer of genetic elements of antimicrobial resistance is occurring uninterruptedly in the hospital and community environment, the results reinforce that measures of barrier to the transmission of microorganisms and the more judicious use of antimicrobials are necessary for the control of the dissemination of microorganisms housing elements of resistance.

Keywords: Gut Microbiota. *Enterobacteriaceae*. Multiresistance.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Disposição dos discos para teste de produção de ESBL, por difusão em agar.....	29
Figura 2 –	Discos conjugados com inibidores e potenciadores, e suas disposições teste de produção de carbapenemases.....	30
Gráfico 1 –	Divisão de pacientes por local proveniente de moradia, das amostras fecais processadas.....	34
Gráfico 2 –	Quantidade de pacientes por faixa etária encontrada.....	35
Gráfico 3 –	Porcentagens das espécies bacterianas encontradas no ambiente hospitalar.....	37
Gráfico 4 –	Porcentagens das espécies bacterianas encontradas no ambiente comunitário.....	37
Gráfico 5 –	Porcentagens das cepas multirresistentes encontradas a partir de suas origens.....	43
Gráfico 6 –	Porcentagens das cepas positivas e negativas para o teste fenotípico confirmatório para ESBL.....	44
Gráfico 7 –	Porcentagens das cepas e suas intensidades de aderência ao poliestireno.....	46

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Diluições do material fecal, incluindo os volumes da amostra, de solução salina 0.85% e o volume final da suspensão.....	26
Tabela 2 –	Agentes antimicrobianos e suas respectivas concentrações, utilizados no TSA do estudo.....	27
Tabela 3 –	Correlação de paciente pela idade e sua razão de solicitação de exame parasitológico.....	35
Tabela 4 –	Perfil de resistência nas cepas encontradas em pacientes da Enfermaria.....	38
Tabela 5 -	Perfil de resistência nas cepas encontradas em pacientes do Ambulatório..	41
Tabela 6 –	Resultado dos testes fenotípicos para presença de genes correlacionados a carbapenêmicos em cepas hospitalares.....	45
Tabela 7 –	Resultado dos testes fenotípicos para presença de genes correlacionados a carbapenêmicos em cepas comunitárias.....	45

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT	<i>Antibiotic Lock Therapy</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<i>Ae</i>	<i>Aeromonas spp.</i>
<i>Bce</i>	<i>Bacillus cereus</i>
BRA	Brasil
<i>Cf</i>   <i>C. freundii</i>	<i>Citrobacter freundii</i>
<i>Cdiv</i>   <i>C. diversus</i>	<i>Citrobacter diversus</i>
CLSI	Clinical & Laboratory Standards Institute
DNA	Ácido desoxirribonucleico
<i>Ea</i>   <i>E. aerogenes</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>
<i>Easb</i>   <i>E. asburiae</i>	<i>Enterobacter asburiae</i>
<i>Eco</i>   <i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Ecl</i>   <i>E. cloacae</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
<i>Edt</i>   <i>E. tarda</i>	<i>Edwardsiella tarda</i>
EMA	Enzimas Modificadoras de Aminoglicosídeos
ESBL	Betalactamase de Espectro Estendido
<i>Es</i>   <i>E. sakazakii</i>	<i>Enterobacter sakazakii</i>
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
GMBL	Grupo das Metalo Beta-Lactamases
HUPE/UERJ	Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro
IRAS	Infecções Relacionadas a Assistência a Saúde
<i>Ko</i>   <i>K. oxytoca</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>
<i>Koz</i>   <i>K. ozanaeae</i>	<i>Klebsiella ozanaeae</i>
<i>Kp</i>   <i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
MDR	Multidrug Resistance
MHA	Muller Hinton agar
<i>Mm</i>	<i>Morganella Morgannii</i>
<i>Pa</i>   <i>P. agglomerans</i>	<i>Pantoea agglomerans</i>

PMQR	Plasmideo mediador de resistência a Quinolona
<i>Ps</i>   <i>P. stuartii</i>	<i>Providencia stuartii</i>
<i>Pv</i>   <i>P. vulgaris</i>	<i>Proteus vulgaris</i>
<i>Sal</i>	<i>Salmonella spp.</i>
<i>Sa</i> / <i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Sr</i>   <i>S. rubidea</i>	<i>Serratia rubidea</i>
TSA	Teste de Susceptibilidade aos Antimicrobianos
TSB	Tryptone Soy Broth
USA	Estados Unidos da America
UTI	Unidade de Tratamento Intensivo
VM	Vermelho de Metila
VP	Vogel Proskauer
WHO	World Health Organization

## LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celcius
%	Porcentagem
±	Mais ou menos
>	Maior que
<	Menor que
h	Hora
mL	Mililitro
pH	Potencial Hidrogeniônico
g	Gramas
μL	Microlitro
μg	Micrograma
μg/mL	Micrograma por mililitro
NaCl	Cloreto de sódio
H <sub>2</sub> S	Ácido sulfídrico
Nm	Nanômetros
DO	Densidade Optica

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	15
1	<b>OBJETIVOS</b> .....	24
1.1	<b>Geral</b> .....	24
1.2	<b>Específicos</b> .....	24
2	<b>METODOLOGIA</b> .....	25
2.1	<b>Casuística</b> .....	25
2.2	<b>Triagem das amostras</b> .....	25
2.3	<b>Isolamento das cepas</b> .....	26
2.4	Determinação do perfil de susceptibilidade aos agentes antimicrobianos .....	27
2.4.1	<u>Difusão em ágar</u> .....	27
2.4.2	<u>Teste de aproximação de discos, por difusão em ágar</u> .....	28
2.4.3	<u>Teste de para a produção de carbapenemases segundo Nota Técnica 01/2013 (ANVISA)</u> .....	29
2.5	<b>Análise da formação de biofilme em superfície de poliestireno</b> .....	33
3	<b>RESULTADOS</b> .....	34
3.1	<b>Triagem das amostras</b> .....	34
3.2	<b>Identificação das cepas isoladas</b> .....	35
3.3	<b>Perfis de susceptibilidade aos agentes antimicrobianos das cepas</b> .....	38
3.4	<b>Produção de ESBL entre as cepas isoladas</b> .....	43
3.5	<b>Produção de carbapenemases entre as cepas isoladas</b> .....	44
3.6	<b>Presença de biofilme nas cepas de <i>Escherichia coli</i></b> .....	46
4	<b>DISCUSSÃO</b> .....	47
	<b>CONCLUSÃO</b> .....	55
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	56
	<b>APÊNDICE A</b> - Questionário para triagem de pacientes.....	67
	<b>APÊNDICE B</b> – Artigo publicado - Detecção de cepas bacterianas no ecossistema no entorno da Lagoa de Saquarema.....	68
	<b>APÊNDICE C</b> - Artigo submetido - Occurence of multidrug-resistant Enterobacteruaceae in a lagoon complex located at the metropolitan area of Rio de Janeiro, Brazil.....	74
	<b>APÊNDICE D</b> – Artigo submetido - Study of multidrug resistant Enterobacteria isolated from river Waters flowing to Guanabara Bay (Rio de Janeiro, Brazil) and from clinical samples of hospital origin.....	91



## INTRODUÇÃO

O trato intestinal de humanos e animais, apresenta uma elevada, complexa e diversificada concentração de microrganismos, em comparação a outros sistemas colonizados no organismo, albergando cerca de 70% da microbiota total residente. A microbiota intestinal humana compreende entre  $10^{13}$ - $10^{14}$  células bacterianas pertencentes a diversas espécies. (RAJILIC-STOJANOVIC et al., 2011; KENNEDY et al., 2014; BUELOW et al., 2017).

É de conhecimento que o trato intestinal pode tanto ser estéril até o nascimento quanto ocorrer colonização intestinal precocemente, através do contato de microrganismos da própria mãe ou advindos do meio externo (BRANDT et. al, 2012; MOLES et al., 2013).

A microbiota intestinal tem importante papel no organismo humano, atuando na defesa contra patógenos oportunistas, na proteção contra lesões de células epiteliais, na síntese de vitaminas e compostos bioativos, na manutenção do pH intestinal e estimulando a resposta imunológica. A diversidade da microbiota é influenciada pela nutrição e fisiologia do hospedeiro. Quando o hospedeiro é saudável, a microbiota compreende bactérias que estabelecem essencialmente relação comensal ou mutualista, enquanto que, em pacientes criticamente enfermos, a microbiota apresenta crescimento de microrganismos oportunistas, possivelmente multirresistentes que podem contribuir para infecções respiratórias e sanguíneas devastadoras (BARTOSCH et al., 2004; BÄCKHED et al., 2005; TIIHONEN; OUWEHAND; RAUTONEN, 2010; MATIJASIC et al., 2013; WEI et al., 2013; BUELOW et al., 2017).

As bactérias podem se adaptar de forma rápida a diversas mudanças, como recursos e flutuações ambientais, através da sua capacidade e rapidez de modificar sua fisiologia e metabolismo. O intestino de seres vivos é um importante reservatório de espécies bacterianas envolvidas ou não no estabelecimento de processos infecciosos em ambiente nosocomial e comunitário (DONSKEY, 2006; HARADA et al., 2011; LETOFEE, 2017).

A World Health Organization (WHO, 2014) descreveu que os antimicrobianos são um dos alicerces que nos permitem viver de forma saudável cada vez mais, se valendo da medicina moderna. Porém considera a sua resistência uma séria, iminente e devastadora ameaça à saúde pública global, com potencial para afetar qualquer região do mundo, independente de pessoa, idade ou país. Também acredita que caminhamos para uma era pós-antibiótica, onde infecções e lesões antigamente tratáveis de forma rápida, podem agora

matar, a não ser que a sociedade se esforce para prevenir infecções e mude a visão do uso, produção e prescrição dos antimicrobianos.

Os agentes antimicrobianos podem ser introduzidos no meio ambiente por diversas atividades humanas, como descarte direto de medicação inutilizada ou vencida, lançamento das fábricas farmacêuticas sem tratamento e uso de drogas no meio hospitalar e veterinário, além de contato de seres humanos com animais domésticos, por serem reservatórios de bactérias resistentes. Os antimicrobianos, em sua maioria, são pouco absorvidos ou metabolizados no organismo de seres vivos e por consequência, de 30 a 90% da dose administrada é excretada na urina e fezes depois de horas de seu uso, como composto original ou seus metabólicos, propagando a resistência a antimicrobianos (ASLANTAS, 2017; CHRISTOU, 2017; CRISTOVÃO, 2017).

A presença de microrganismos potencialmente patogênicos em fezes retrata a ineficácia de diferentes parâmetros na região como infraestrutura em saneamento, cultura social e boas práticas de higiene pessoal. Além disso, a microbiota intestinal é diretamente afetada com uso de antimicrobianos, eliminando bactérias susceptíveis e sendo reservatório de espécies resistentes. Quando as excretas são eliminadas no ambiente, os microrganismos resistentes servem como agente infectante ou colonizador de outros indivíduos. Essa colonização intestinal quando feita por membros da família Enterobacteriaceae, tem como maioria de espécies *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* e pode anteceder uma infecção (VIEIRA et al., 1999; BRANDT et al., 2012; LIN et al., 2012; SWIERCZEWSKI et al., 2013; BRANDER, 2017).

Cepas de *Escherichia coli* são usadas de forma frequente como bactérias indicadoras, principalmente em relação a resistência aos antimicrobianos e também sobre a diversidade genética da microbiota intestinal comensal, sendo nesse microambiente a espécie de maior prevalência (AHMED, 2017).

Os espécimes da família Enterobacteriaceae compreendem um grupo grande e heterogêneo de bastonetes Gram-negativos de importância clínica que estão amplamente distribuídos tanto no ambiente hospitalar como no comunitário extra-hospitalar. Esses membros da microbiota intestinal, podem colonizar a pele, trato urinário e respiratório e, sendo capazes de sobreviver em água e alimentos, podem estar associados a surtos infecciosos (SHARIR et al., 2001; CERQUETTI et al., 2009; MA et al., 2009; VASQUES et al., 2011).

As infecções associadas à assistência à saúde (IRAS) envolvendo bactérias Gram-negativas multirresistentes, têm aumentado significativamente ao longo do tempo. Este quadro quando acomete um paciente internado implica na possível falha de seu tratamento,

podendo levar a maior índice de mortalidade, quando não, compromete seu sistema imunológico e estado emocional, gera maior tempo de hospitalização e por consequência maior gasto para a unidade hospitalar. Isto representa um grave problema de Saúde Pública, acometendo hospitais do mundo todo atualmente (AL NAIEMI et al., 2006; PERRON; BELL; QUESSY, 2008; WENER et al., 2010, LAI et al., 2011; ABDALLAH et al., 2017).

A descontaminação seletiva do aparelho digestivo é um procedimento tradicional em pacientes hospitalizados na UTI até a sua completa estabilização, minimizando o risco de infecções possivelmente relacionadas a cepas nosocomiais. Essa técnica elimina tanto patógenos oportunistas quanto as bactérias comensais, possivelmente selecionando bactérias gerando grande preocupação. O controle das populações de patógenos resistentes a antimicrobianos em pacientes, reduz sua mortalidade e custos da internação na UTI (BUELOW et al., 2017).

Pacientes liberados do ambiente hospitalar são considerados possíveis reservatórios de patógenos resistentes, com grande potencial de disseminação. Por serem transportadores diretos, podem futuramente difundir esses microrganismos tanto para o ambiente comunitário extra-hospitalar como reintroduzir para o próprio ambiente nosocomial e podendo aumentar taxas de mortalidade. A atual implementação de “precauções de contato” para supostos pacientes transportadores deve ser feita o mais rápido possível (mas primeiras 48 horas), podendo prevenir a transmissão cruzada nos serviços de saúde e casos secundários, porém devem ser monitorados em relação a desempenho, custo e confiabilidade (PITOUT et al., 2004; ALIX et. al, 2017; BARRIOS, 2017; BRANDER, 2017; GALASSUS, 2017).

Os microrganismos são historicamente reconhecidos como agentes causadores de infecções e o homem vem buscando desde então, formas efetivas de tratamento para tais doenças. Desde o surgimento dos agentes antimicrobianos na década de 50, eles têm sido fundamentais para cuidados da saúde moderna. Seu uso seja para tratamento de infecções graves, bem-estar humano ou prevenção de doenças em seres vivos, auxiliou na seleção de microrganismos geneticamente resistentes, levando a necessidade de desenvolvimento de fármacos cada vez mais potentes para o combate a infecções, tanto no âmbito hospitalar, comunitário e veterinário. Com o crescimento constante da população, aumento de recursos financeiros e uso inadequado de antimicrobianos, estimulou a produção desenfreada de milhares de toneladas de medicamento e projeções de crescimento aumentadas a cada ano (TZOC, ARIAS, VALIENTE, 2004; MILANNAO et al., 2011; OBERLÉ et al., 2012; WINTER et al., 2013; CHRISTOU, 2017).

A resistência a antimicrobianos quando atinge a microbiota comensal do trato intestinal pode se tornar uma ameaça à saúde pública, por ser um ecossistema rico em microrganismos. Após a pressão seletiva no organismo de seres vivos, o microrganismo pode difundir a resistência para outros organismos, ou disseminar horizontalmente resistência gênica entre componentes comensais e oportunistas da microbiota intestinal, sendo uma fonte de infecções futuras. Medidas de controle prévio das infecções podem prevenir a dispersão, mas não agem de maneira eficaz em ambientes com alta pressão exercida pelo uso de antimicrobianos (PITOUT et al., 2004; GALDEANO et al., 2007; BUELOW, 2017).

A capacidade de adquirir, transferir e expressar resistência antimicrobiana entre espécies do gênero Enterobacteriaceae, podem representar uma séria ameaça à Saúde Pública, principalmente se forem relacionadas ao ambiente hospitalar. (STALDER; LONCARIC; WALZER, 2014; RAY, 2017).

As bactérias são capazes de dispor diferentes mecanismos para resistir a ação de agentes antimicrobianos, como a inativação por ação de enzimas de degradação ou modificação, alteração de sítios alvo, redução de permeabilidade de membrana e expulsão de compostos por mecanismo de bomba de efluxo. A participação de genes, associados à plasmídeos, transposons e integrons, contribui para o estabelecimento e disseminação de muitos destes mecanismos entre bactérias de origem hospitalar e comunitária, contribuindo para a patogenicidade destes microrganismos, como fatores de virulência e enzimas capazes de modificar e inativar drogas (BROWN, 2003; GASSAMA-SOW et al., 2010; DAVIS et al., 2011; GIEDRAITIENÈ et al., 2011; KOCZURA et al., 2012).

Esses genes que codificam a resistência a antimicrobiano podem estar agrupados numa mesma célula bacteriana colonizadora e resultarem na expressão de resistência múltipla a agentes antimicrobianos. Um grande complicador refere-se ao enorme potencial de aquisição e montagem de blocos de genes de resistência e transferência horizontal por elementos genéticos especializados, através dos quais as bactérias podem tornar-se resistentes a um ou a vários agentes antimicrobianos (LEAVITT et al, 2010; VAIDYA, 2011; KOCZURA et al., 2012).

De todos os mecanismos codificados por genes através dos quais as bactérias tornam-se resistentes aos antimicrobianos, um deles é a produção de compostos capazes de mudar sítios de ligação específicos de agentes antimicrobianos, impedindo a sua ligação em seus alvos dentro da célula bacteriana ou hidrolisando o antimicrobiano. Inúmeras enzimas já foram detectadas com esta função, como é o caso das beta-lactamases produzidas contra os

beta-lactâmicos, as enzimasificadoras de aminoglicosídeos (EMA) e os mecanismos plasmidiais de resistência a quinolonas (PMQR) (PATTERSON, 2005; ÖKTEM et al., 2008).

Enterobactérias expressando EMA, beta-lactamases e PMQR estão distribuídas no mundo todo, tanto no ambiente hospitalar, como no ambiente comunitário extra-hospitalar e veterinário (CERQUETTI et al., 2009, MA et al., 2009; ADLER, 2016).

Os beta-lactâmicos, os aminoglicosídeos e as fluorquinolonas representam três importantes grupos de agentes antimicrobianos utilizados tanto no ambiente hospitalar como no comunitário, sendo os beta-lactâmicos e as fluorquinolonas os mais importantes na terapia anti-infecciosa. Nos últimos anos, a frequência de microrganismos resistentes tem aumentado de forma considerável. Muitos antimicrobianos utilizados para o tratamento de infecções em humanos e animais podem não ser completamente metabolizados pelo organismo consumidor, sendo eventualmente liberados nas fezes, contribuindo para o aumento da contaminação do meio ambiente (MEIRELLES-PEREIRA et al., 2002; AJIBOYE et al., 2009; DIWAN et al., 2010; OBERLÉ et al., 2012; ANSSOUR et al., 2014)

Muitos microrganismos encontrados em amostras fecais produzem enzimas que hidrolisam penicilinas, cefalosporinas e monobactâmicos. As beta-lactamases mais frequentemente isoladas nesses tipos de material são as de amplo espectro (ESBL), AmpC e carbapenemases (VASQUES, 2011).

Os beta-lactâmicos atuam na parede celular bacteriana, inibindo a sua síntese ao se ligarem em proteínas fixadoras de penicilinas (PBPs). O principal mecanismo de resistência dos microrganismos aos beta-lactâmicos é a produção de beta-lactamases, enzimas que hidrolisam o anel beta-lactâmico promovendo a inativação irreversível destes antimicrobianos. (GUENTHER et al., 2011; NÜESCH-INDERBINEN et al., 2013)

As bactérias Gram-negativas estão envolvidas no desenvolvimento de resistência ao grupo dos beta-lactâmicos, que através de uma exposição eventual, pode selecionar aquelas cepas que sofreram mutações ou levar a superprodução de beta-lactamases, que hidrolisam cefalosporinas e monobactâmicos de amplo espectro. Isso pode ter favorecido a emergência de enterobactérias produtoras de ESBL, com predomínio das espécies *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*, que mesmo possivelmente inativadas por ácido clavulânico, ainda podem sobreviver 30 e 16 meses respectivamente, em substrato inanimado e seco. (PATERSON; BONOMO, 2005; HAWKEY et al., 2009; ANDRIATAHINA et al., 2010; GUET-REVILLET et al., 2012).

Diversos espécimes da família Enterobacteriaceae estão descritos como produtores de ESBL e, quando apresentam multirresistência, a mesma está associada a genes localizados

nos plasmídeos, favorecendo sua disseminação entre espécies diferentes (ANDRIATAHINA et al., 2010; BUSH e FISHER, 2011; ISENDAHL et al., 2012; ANSSOUR et al., 2014).

A colonização intestinal por patógenos produtores de ESBL, principalmente em pacientes internados, está associada tanto ao risco de desenvolvimento de infecções pessoais quanto cruzadas (especialmente relacionadas a unidades de cuidados de longo prazo). Por ser considerada fator crítico à Saúde Pública, ao gerar uma possível infecção, também influencia em opções de tratamento restritas, aumentando a permanência hospitalar e conseqüentemente, acarretando grandes gastos financeiros. Sendo necessário discutir a eficácia no controle da colonização para a possível redução de infecções por esse tipo de cepas resistentes (LEE et al., 2006; ANDRIATAHINA et al., 2010; BIRGAND et al., 2013; KO et al., 2013; NWOSU et al., 2014).

As primeiras ESBL descritas foram derivadas, a partir de mutações pontuais, em genes condificantes de duas clássicas famílias de betalactamases: TEM e SHV. Esses genes (blaTEM, blaSHV, blaCTX, blaKPC etc.), são encontrados principalmente em cepas de *Klebsiella pneumoniae*, disseminadas no ambiente hospitalar, enquanto os genes tipo CTX-M são encontrados em *Escherichia coli*. Os genes blaCTX-M, encontrados em grandes plasmídeos altamente transferíveis, tem se espalhado amplamente pelo mundo, alterando em altos níveis a situação epidemiológica (ANDRIATAHINA et al., 2010; LONCHEL et al., 2013, ANSSOUR et al., 2014).

A presença de gene blaAmpC, mediado por plasmídeos, é difundida pelo mundo graças a alta transferência desses genes para outras bactérias por conjugação, sendo ainda pouco comuns quando comparadas às ESBL. Por estarem associadas a outras beta-lactamases e genes de resistência no mesmo plasmídeo, tanto as ESBL quanto as AmpC beta-lactamases são associadas a surtos nosocomiais, gerando aumento da morbidade e mortalidade. Porém, alta expressão de Amp-C beta-lactamases dificulta diretamente a detecção fenotípica de ESBL em espécies da família Enterobacteriaceae, porque oculta a sinergia de cefalosporinas de 3ª geração e o ácido clavulânico (ANSSOUR et al. 2014; ASLANTAS, 2017; UZONOVIC, 2018).

As carbapenemases são beta-lactamases que, além de inativarem a ação de cefalosporinas de amplo espectro e cefamicinas, hidrolisam também carbapenêmicos como imipenem, ertapenem e meropenem. Esse grupo de antimicrobianos são considerados a escolha prioritária para o tratamento de infecções graves causadas por enterobactérias resistentes a beta-lactâmicos e fluorquinolonas, favorecendo a seleção de cepas resistentes. (ARNOLD et al., 2011; VASQUES et al., 2011).

A partir da última década, houve um aumento considerado nos relatos de espécies da família Enterobacteriaceae resistentes a carbapenêmicos, avaliados por técnicas tanto fenotípicas como moleculares, ocorrendo o ressurgimento do uso de Polimixina E (Colistina) como última via possível de tratamento, por suas propriedades nefrotóxicas serem pobremente entendidas. O desenvolvimento, no futuro, de uma alternativa para o uso de carbapenêmicos no combate a infecções, pode atenuar a pressão seletiva e gerar uma opção para os pacientes que por ventura não podem utilizá-lo (LEE et al., 2006; KIM et al., 2014; BARDET, 2017).

Infecções invasivas nosocomiais correlacionadas a enterobactérias resistentes a carbapenêmicos estão associadas com altas taxas de mortalidade (de 40 a 50%) entre pacientes por serem específicas, terem alto poder de disseminação e poucas opções de tratamento disponíveis. Porém, com pesquisa prévia de colonização dessas cepas, ocorre auxílio tanto na redução da incidência geral quanto na transmissão cruzada em hospitais de diversos países. Em *Klebsiella pneumoniae*, a resistência está associada à presença de plasmídeos, que podem albergar genes codificando tanto estas enzimas, como enzimas para outros beta-lactâmicos, além de enzimas que conferem resistência para fluorquinolonas e aminoglicosídeos. Inclui-se também diversos fatores de virulência bacteriana já descritos como adesinas, sorotipos capsulares, sistemas de eliminação de ferro, produção de biofilme e outros (BRATU et al., 2005; BOCANEGRA-IBARIAS, 2017; HANEMAAIJER, 2017).

Um dos genes responsáveis pela produção de carbapenemases em *Klebsiella pneumoniae* é o blaKPC, capaz de inativar, além dos carbapenêmicos, penicilinas, cefalosporinas e monobactâmicos. Esse gene, também presente em outros patógenos Gram-negativos, é carregado através de elementos genéticos móveis, os transposons, que facilitam ainda mais a disseminação de resistência tanto a carbapenêmicos quanto a outras beta-lactamases (CHMELNITSKY et al., 2009; GIANI et al., 2009; CUZON et al., 2010; DIENSTMANN et al., 2010; VASQUES et al., 2011).

Já os aminoglicosídeos são antimicrobianos formados por parte amino (ou hidroxila) e parte glicosídeo, sendo os mais utilizados: estreptomicina, gentamicina, tobramicina e amicacina e atuam na subunidade 30S do ribossomo bacteriano, inibindo a síntese proteica ou produzindo proteínas com defeito. São utilizados no tratamento de infecções urinárias, respiratórias, intra-abdominais e oculares, além de endocardites e outras. Tem grande atividade contra bacilos e cocos Gram-negativos aeróbios, como por exemplo a família Enterobacteriaceae, além de terem atividades contra bactérias Gram-positivas e micobactérias (MINGEOT-LECLERCQ et al., 1999; ANVISA 2007; RAMIREZ; TOMALSKY, 2010).

Os genes de resistência podem estar associados ao cromossoma, transposons ou plasmídeos, sendo o plasmídeo conjugativo o mais frequente atrelado, resultando com facilidade bactérias multirresistentes. Diversos mecanismos podem estar envolvidos como alteração na permeabilidade da membrana celular, mutações em genes ribossomais e produção de enzimas que alteram os sítios de ligação do ribossomo, sendo esse o mecanismo mais comum, gerando alto grau de resistência a este antimicrobiano e grande disseminação. A plazomicina é um aminoglicosídeo da próxima geração, atuando diretamente nas enzimas modificadoras de aminoglicosídeos, sendo utilizados normalmente em tratamento de infecções urinárias graves e pielonefrite aguda (MINGEOT-LECLERCQ et al., 1999; ANVISA 2007; RAMIREZ; TOMALSKY, 2010; LOPEZ-DIAZ, 2017).

Mais de 50 enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (EMA) já foram descritas na literatura, isoladas de diferentes espécies bacterianas, entre N-acetiltransferases, O-adeniltransferases e O-fosfotransferases. Quando conferem resistência a gentamicina, podemos correlacionar com todas as classes de EMA, sendo as subclasses de maior frequência as aac(2'-I), aac(3), aac(6'), ant(2'') e aph(3'). Já em relação a resistência de aminoglicosídeos, ciprofloxacina e norfloxacina, onde o espectro de acetilação é estendido, pode-se vincular a subclasse aac(6')-Ib-cr, mesmo compreendendo também os genes de fluorquinolonas (ANVISA 2007; SABTCHEVA et al, 2009; RAMIREZ; TOMALSKY, 2010; KIM et al, 2011).

As fluorquinolonas são antimicrobianos que bloqueiam a ação de DNA girase bacteriana, enzima importante para a replicação, regulação, transcrição e reparo da molécula de DNA bacteriano. Sua resistência bacteriana pode acontecer através da mutação de genes responsáveis pelas respectivas enzimas, DNA girase e topoisomerase tipo IV, da diminuição da permeabilidade ao medicamento pela membrana celular bacteriana, mecanismos de bomba de efluxo, proteção de alvo e modificação da droga, envolvendo vários genes de origem cromossomal (NORDMANN; POIREL, 2005; ANVISA, 2007; ANSSOUR et al. 2014).

Contudo, nos anos 90/00, foi descoberto um gene da família QNR (qnrA1) localizado em plasmídeos, que protegiam tanto a DNA girase quanto a Topoisomerase tipo IV. A partir deste momento, outros genes foram relatados associados a elementos transponíveis em materiais clínicos de humanos e animais, mediando resistência a fluorquinolonas. Os QNR são genes que se ligam as Topoisomerases, diminuindo sua afinidade para o DNA, tendo como novos variantes os A, B, S, C e D, além da quinolonas inativadoras de aminoglicosídeos aac(6')-ib-cr (citado anteriormente por ter espectro de acetilação expandido) e o gene qepA, determinante de efluxo de fluorquinolonas, sendo considerado um facilitador do transporte



desses genes. (CERQUETTI et al., 2009; MA et al., 2009; JEONG et al., 2011a; ANSSOUR et al. 2014).

O aumento considerável de bactérias multirresistentes é um grande problema de Saúde Pública mundial e seu controle depende tanto do uso correto e reduzido de antimicrobianos como na prevenção de transmissão cruzada de pacientes portadores para outras pessoas dentro e fora do ambiente hospitalar. Sendo as espécies da família Enterobacteriaceae provenientes de amostras fecais, normalmente obtidas por swab retal, as amostras clínicas mais relevantes para identificação de bactérias multirresistentes intestinais. (ALIX, 2017; BARDET, 2017).

O biofilme são comunidades bacterianas complexas sésseis aderentes a superfície de bactérias viáveis e mortas dentro de uma matriz extracelular protetora, composta de polissacarídeo, proteína e DNA extracelular (EPS), apresentando fenótipos diferentes de bactérias planctônicas, seja pela taxa de crescimento ou expressão gênica. É notório que biofilmes estão envolvidos em infecções no corpo humano, associados a redução da sensibilidade dos tratamentos antimicrobianos, podendo ser formado em superfícies bióticas e abióticas, como tecidos e mucosas de hospedeiros e em diversos instrumentos médicos. Sendo assim além da tolerância aos tratamentos antimicrobianos, o biofilme ajuda na capacidade de resistir as respostas imunes do hospedeiro e dificulta a morte de células inseridas, principalmente se estão em camadas profundas (DI LUCA, 2017; RAY, 2017).

Os microrganismos integrados ao biofilme são muito mais difíceis de se identificar em métodos tradicionais de diagnóstico quanto no crescimento planctônico, devido a habilidade das células de biofilme aderir ao substrato ou entre si através de EPS. Para tratamento de infecções relacionadas a biofilmes normalmente ou é necessário a remoção mecânica ou cirúrgica do material infectado ou uma aplicação de antibiotic lock therapy (ALT) em longo período no caso dos cateteres. Uma estratégia de controle do biofilme pode ser o uso de produtos químicos sem agentes antimicrobianos, afetando a formação e adesão destes por alteração em microambiente bacteriano. Porém ainda é necessário uma ampla exploração de diferentes crescimentos para revelar novos aspectos na biologia bacteriana (DI LUCA, 2017; LETOFEE, 2017; RAY, 2017).

A partir da metodologia aqui proposta será possível detectar a presença de marcadores de resistência específicos, que estão intimamente ligados à disseminação destes microrganismos, o que poderá servir como ferramenta auxiliar nas políticas de controle de infecções no ambiente hospitalar.

## 1 OBJETIVOS

### 1.1 Objetivo geral

Caracterizar fenotipicamente aspectos da virulência bacteriana relativos à resistência a antimicrobianos (betalactâmicos, aminoglicosídeos, quinolonas e carbapenêmicos) e capacidade de produção de biofilme em cepas de enterobactérias oriundas de amostras de fezes de pacientes internados e pacientes ambulatoriais atendidos no Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE-UERJ), considerando-se diferentes unidades hospitalares com diferentes níveis de pressão decorrentes do uso de agentes antimicrobianos, buscando relacionar as diferenças nos perfis identificados a possível presença de genes de resistência específicos.

### 1.2 Objetivos específicos

- a) Isolar cepas de enterobactérias a partir de amostras de fezes oriundas de pacientes internados em ambiente hospitalar bem como de pacientes ambulatoriais;
- b) Identificar as espécies de enterobactérias prevalentes nas amostras analisadas;
- c) Analisar as cepas através de teste de suscetibilidade aos antimicrobianos (TSA);
- d) Identificar as cepas multirresistentes (MDR) e sua variação conforme origem;
- e) Avaliar a presença de ESBL utilizando teste fenotípico confirmatório;
- f) Detectar a presença de genes de carbapenemases através do teste fenotípico correspondente;
- g) Observar a produção de biofilme e aderência em poliestireno das cepas de *Escherichia coli* resistentes.

## **2 METODOLOGIA**

### **2.1 Casuística**

Amostras fecais, com 0,5 a 1 grama, foram coletadas a partir de 65 pacientes com moradia na Região Metropolitana do Rio de Janeiro, todos atendidos no Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE/UERJ), um hospital terciário com cerca de 600 leitos, localizado no bairro de Vila Isabel, na cidade do Rio de Janeiro.

O conteúdo amostral foi obtido através de alíquotas provenientes do Setor de Parasitologia, do Laboratório de Análises Clínicas do HUPE, logo após processamento de rotina parasitológica e foram coletados entre abril e setembro de 2014, onde foram isoladas cepas de bactérias Gram-negativas dessas amostras.

O estudo teve seu parecer liberado pelo Comitê de Ética do Hospital Universitário Pedro Ernesto (CEP/HUPE), sendo provido do número CAAE 44685015.9.0000.5259/2015.

### **2.2 Triagem das amostras**

Essa triagem foi feita através da aplicação de um questionário (Apêndice), previamente elaborado conjuntamente pela autora e pelo Professor Dr. José Augusto Adler Pereira, e através de levantamento a partir do prontuário obtido, para categorização de acordo com a área de entrada no hospital de cada paciente. Todas as alíquotas foram obtidas a partir do material de pós processamento de exame parasitológico, conforme o fluxo de pacientes de cada dia, recebido pelo Laboratório de Parasitologia do HUPE/UERJ. Amostras com menos de 0,5 grama não foram incluídas no processamento deste projeto.

Sua delimitação dividiu o número total de pacientes em 2 categorias: (1) pacientes provenientes da enfermaria e (2) pacientes provenientes do ambulatório. Desse total, após análise, foram obtidas 30 amostras de pacientes internados em enfermaria e 35 pacientes ambulatoriais.

### 2.3 Isolamento das cepas

As alíquotas com cerca de 0,5 grama, após serem coletadas, foram processadas segundo Melo et al. (1993) com modificações. Foram feitas três diluições de cada amostra de material fecal, correspondente a 1:20, 1:1000, e 1:5000 (Tabela 1).

Tabela 1 - Diluições do material fecal para isolamento bacteriano, incluindo os volumes da amostra, de solução salina 0.85% e o volume final da suspensão

Diluição	Amostra	Solução Salina	Volume final
<b>1:20</b>	0,5 g	9,5 mL	0,0 mL
<b>1:1000</b>	0,5 g	499,5 mL	500,0 mL
<b>1:5000</b>	0,5 g	2499,5 mL	2500,0 mL

A primeira diluição, correspondente a 1:20, onde 9,5mL de solução salina a 0.85% foi adicionado 0,5 grama de cada amostra, homogeneizado e gerando um volume final de 10,0 mL. As outras suspensões corresponderam a 1:1000 e 1:5000, sendo as amostras sempre homogeneizadas antes de cada suspensão.

Um inóculo de 100µL das três diferentes diluições foi distribuído utilizando alça de drigalski em meio BBL MacConkey Agar (BD) contendo 8µg/mL de Gentamicina, quanto em meio MacConkey (BD) contendo 32µg/mL de Cefalexina. Além desses meios, as amostras diluídas foram inoculadas em meio Chromoagar seletivo para Carbapenêmicos (PLASTLABOR), que contém 1µg/ml de mistura seletiva para carbapenêmicos. As placas serão incubadas durante 24 horas em estufa a 35°C ± 2°C.

Após a obtenção de colônias puras através de sementeiras sucessivas, estas foram analisadas de maneira morfo-tintorial e identificadas através de testes bioquímicos, segundo Winn e col. (2006), sendo avaliadas aspectos como motilidade, produção de H<sub>2</sub>S e gás indol, fermentação e oxidação da glicose, fermentação da lactose, produção de uréia, utilização de citrato como única fonte de carbono, descaboxilação dos aminoácidos lisina e ornitina, dehidrolização do aminoácido arginina, prova do vermelho de metila (VM) e Voges Proskauer (VP). As cepas já identificadas foram estocadas em GC médium base, acrescido de 20% de glicerol, guardados a uma temperatura de -20°C para futuras análises.

## 2.4 Determinação do perfil de susceptibilidade a antimicrobianos

### 2.4.1 Difusão em ágar

O teste de susceptibilidade aos agentes antimicrobianos (TSA) foi realizado segundo normas do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2017). As cepas estocadas foram semeadas em Muller-Hinton ágar (MHA®, MERCK, USA) e incubadas por 18 horas a 37°C. Utilizando o crescimento bacteriano, foram preparadas suspensões em solução salina (NaCl 0.85%) com turvação de grau 0.5 na escala de Mc Farland, e essas soluções inoculadas através do uso de *swabs* em placas de MHA.

Sobre esta superfície foram depositados os discos contendo os agentes antimicrobianos (Cefar®, São Paulo, BRA) e suas devidas concentrações (Tabela 2), e as placas foram incubadas por 18 horas, em estufa a 35°C ± 2°C. Após crescimento, os halos de inibição foram avaliados segundo CLSI (2017). A exceção ocorre em relação ao antimicrobiano amoxicilina, pois o CLSI não determina o diâmetro das zonas de inibição em relação as enterobactérias para a determinação de resistência, sendo necessário o uso das normas segundo European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST, 2017). Cepas de *E. coli* ATCC 25922 foram utilizadas para o controle dos discos de agentes antimicrobianos, enquanto a *E. coli* ATCC 35218 foi empregada como controle para inibidor de beta-lactamases.

Já para a análise da multirresistência foi utilizado como parâmetro o estudo de Magiorakos e colaboradores (2012).

Tabela 2 - Agentes antimicrobianos e suas respectivas concentrações, utilizados no TSA

ATB	CNC	ATB	CNC	ATB	CNC	ATB	CNC	ATB	CNC
CFL	30µg	CAZ	30µg	AMP	10µg	NOR	10µg	SUT	25µg
CFZ	30µg	CPM	30µg	AMO	10µg	IMI	10µg	TET	30µg
CFO	30µg	GEN	10µg	PPT	100µg/10µg	ETP	10µg	FOS	200µg
CRX	30µg	AMI	30µg	AMC	20µg/10µg	MER	10µg	NIT	300µg
CTX	30µg	KAN	30µg	ASB	10µg/10µg	ATM	30µg		
CRO	30µg	TOB	10µg	CIP	5µg	CLO	30µg		

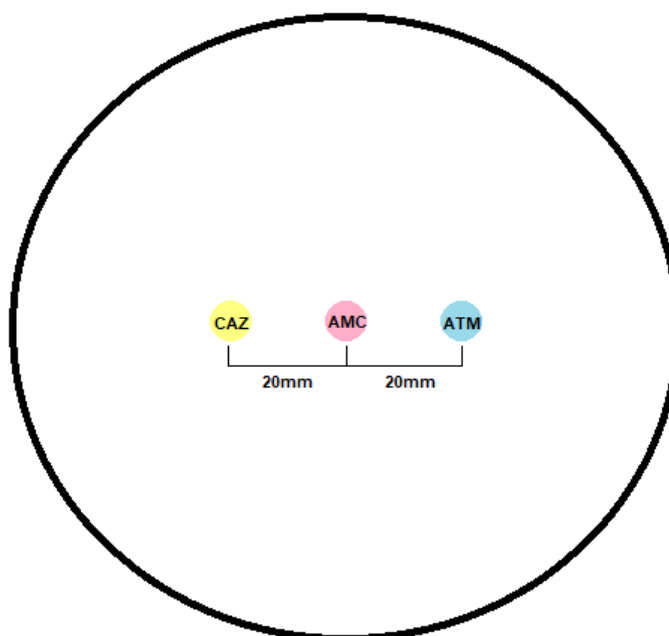
Legenda: ATB: antimicrobiano, CNC: concentração, CFL: Cefalotina, CFZ: Cefazolina, CFO: Cefoxitina, CRX: Cefuroxima, CTX: Cefotaxima, CRO: Ceftriaxona, CAZ: Ceftazidima, CPM: Cefepima, GEN: Gentamicina, AMI: Amicacina, KAN: Kanamicina, TOB: Tobramicina, AMP: Ampicilina, AMO: Amoxicilina, PPT: Piperaciclina com Tazobactam, AMC: Amoxicilina com Ácido Clavulânico, ASB: Ampicilina com Sulbactam, CIP: Ciprofloxacina, NOR: Norfloxacina, IMI: Imipenem, ETP: Ertapenem, MER: Meropenem, ATM: Aztreonam, CLO: Cloranfenicol, SUT: Cotrimoxazol, TET: Tetraciclina, FOS: Fosfomicina e NIT: Nitrofurantoína.

A partir da leitura dos halos possivelmente formados no TSA, as cepas que apresentaram perfil de resistência para beta-lactâmicos de terceira geração, foram submetidos ao teste de aproximação de discos por difusão em ágar para a indicação fenotípica da presença de ESBL, segundo CLSI (2017). As cepas que apresentaram perfil de resistência para os carbapenêmicos, foram submetidas ao teste para averiguar a presença fenotípica de genes correlacionados a carbapenemase, segundo a Norma Técnica (ANVISA, 2013).

#### 2.4.2 Teste de aproximação de discos, por difusão em ágar

A partir do crescimento obtido em ágar, foram preparadas suspensões salinas (NaCl 0.85%) com turvação correspondente ao grau 0.5 da escala de Mc Farland e realizados inóculos com auxílios de *swabs* nas placas de MHA. Nestas superfícies foram depositados, lado a lado com uma distância de 20mm entre cada disco a partir de seus centros, os discos contendo os seguintes antimicrobianos e suas concentrações: ceftazidima (CAZ–30µg), amoxicilina associada a ácido clavulânico (AMC–20µg/10µg) e aztreonam (ATM–30µg), nesta ordem. (Figura 1).

Figura 1 - Disposição dos discos para teste de produção de ESBL, por difusão em agar



Legenda: Antimicrobianos utilizados no teste - CAZ: ceftazidima (30µg), AMC: amoxicilina associada a ácido clavulânico (20µg/10µg) e ATM: aztreonam (30µg), nesta respectiva ordem.

Fonte: Adaptada de Anvisa, 2013.

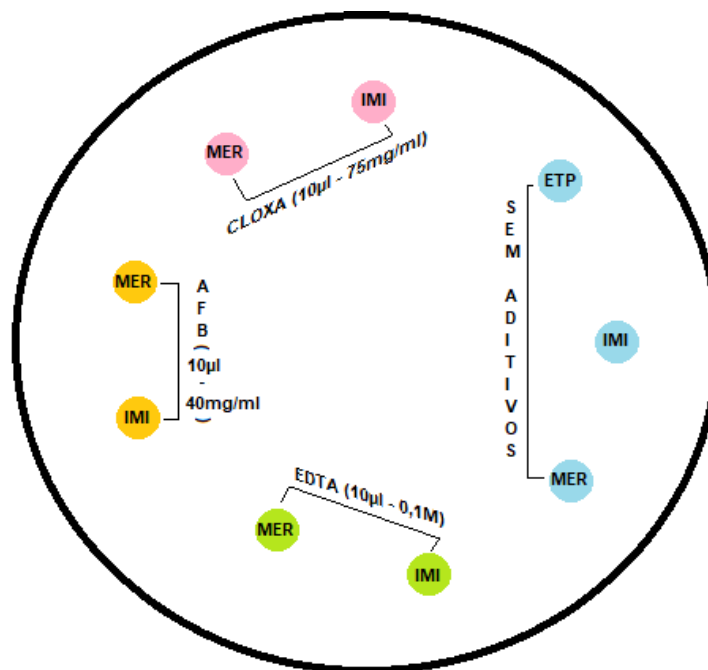
As placas foram incubadas por 18h, em estufa a  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  e a leitura do resultado foi feita a partir da observação da “ghost zone” (zona fantasma) observada nos espaços entre os discos. A cepa de *K. pneumoniae* ATCC 700603 será utilizada como controle para o teste.

#### 2.4.3 Teste de para a produção de carbapenemases segundo Nota Técnica 01/2013 (ANVISA)

Prioritariamente foi necessário adicionar soluções a discos de imipenem (IMI–10µg) e meropenem (MER–10µg). Para isso, 10µL das soluções de EDTA (0,1M), ácido fenilburônico (AFB–40mg/mL) e cloxacilina (CLOXA–75mg/mL), foram depositadas sobre dois antimicrobianos cada uma, onde tiveram que secar durante 20 minutos para que fossem utilizados nos testes. Além desses dois antimicrobianos, também foi utilizado discos de ertapenem (ETP–10µg), sendo o único dos três carbapenêmicos no teste que não necessita de ser conjugado.

A partir de crescimento das cepas em ágar, preparamos suspensões bacterianas em solução salina (NaCl 0,85%) com turvação correspondente ao grau 0,5 da escala de Mc Farland e estas foram inoculadas homogêneas em placa de MHA com uso de swab. Em seguida, todos os discos foram dispostos de acordo com a figura 2.

Figura 2 - Discos conjugados com inibidores e potenciadores, e suas disposições teste de produção de carbapenemases



Legenda: Antimicrobianos utilizados no teste – IMI: imipenem, ETP: ertapenem e MER: meropenem e substâncias conjugadas nos discos – EDTA: solução de EDTA, AFB: solução de ácido fenilburônio e CLOXA: solução de cloxacilina.

Fonte: Anvisa (2013) adaptada por Olivella (2017)

Foram incubados por 18 a 24 horas a  $36 \pm 1$  °C e interpretação do seu resultado deu-se através do uso da Nota Técnica e da divisão das cepas estudadas entre o grupo CESP (gêneros *Citrobacter spp.*, *Enterobacter spp.*, *Serratia sp.* e *Proteus spp.*) e o grupo não pertencente ao CESP.

Para o grupo CESP deve ser considerado apenas os resultados de IMI e MER. Se existir a diferença de diâmetro do halo maior que 5mm entre o diâmetro do halo de inibição de discos adicionados de EDTA e não adicionados, devem ser considerados potenciais produtores de metalo-betalactamase (IMP, VIM, NDM). Possuindo resistência intermediária



ou sendo resistentes para IMI e/ou MER e negativos para o teste, essas cepas podem ser produtoras de outras carbapenemases (KPC ou OXA-48) ou deficientes em porinas.

Para o grupo não-CESP se existir a diferença de diâmetro do halo maior que 5mm entre o diâmetro do halo de inibição de discos de IMI e MER adicionados de EDTA e não adicionados, devem ser considerados potenciais produtores de metalo-beta-lactamase (IMP, VIM, NDM). Já se existir a diferença de diâmetro do halo maior que 5mm apenas para AFB para qualquer carbapenêmico, deverão ser considerados produtores de KPC. Se essa mesma diferença for entre AFB e CLOXA para qualquer carbapenêmico, deverão ser considerados produtores de Amp<sup>C</sup> plasmidial e deficientes em porinas. E se isolados com diferença de diâmetro do halo menor que 5mm com AFB, EDTA e CLOXA, podem ser deficientes em porinas ou produtores de OXA-48.

## 2.5 Análise da formação de biofilme em superfície de poliestireno

A produção do biofilme foi analisada a partir do método segundo Merrit, Kadouri e O'Toole (2005). As cepas após crescimento em ágar, foram suspensas em 3ml de meio Tryptone Soy Broth (TSB) e deixadas overnight a 35°C ± 2°C. A partir do crescimento bacteriano obtido, foi depositada uma alíquota de 100µl em poços de uma placa de microtitulação de poliestireno de 96 poços e incubadas a 37°C por 24 horas.

Posteriormente, os poços foram lavados três vezes com 200µl de solução salina (NaCl 0,85%), corados com 100µl de cristal violeta 0,2% por 10 minutos e lavados duas vezes com água destilada em abundância, deixando a placa em temperatura ambiente para sua secagem completa.

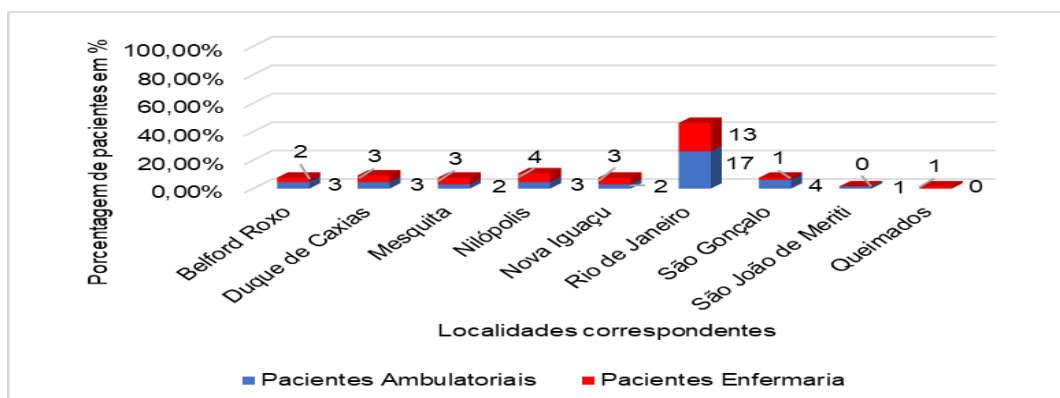
Depois de secos, adicionou-se aos poços 200µl de álcool a 95% para que pudesse ser feita a leitura através do uso de espectrofotômetro (570nm). Para o controle positivo do teste, foram utilizadas cepas controles ATCC *Staphylococcus epidermidis* 12228 e controle negativo TSB estéril. As amostras podem ser classificadas em quatro categorias com base na DO: não aderente = DO obtida menos que a DO do controle negativo (DO<sub>c</sub>); fracamente aderente = DO<sub>c</sub> < DO ≤ (2xDO<sub>c</sub>); moderadamente aderente = (2x) DO<sub>c</sub> < DO ≤ (4xDO<sub>c</sub>) e fortemente aderente = DO > (4xDO<sub>c</sub>).

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Triagem das amostras

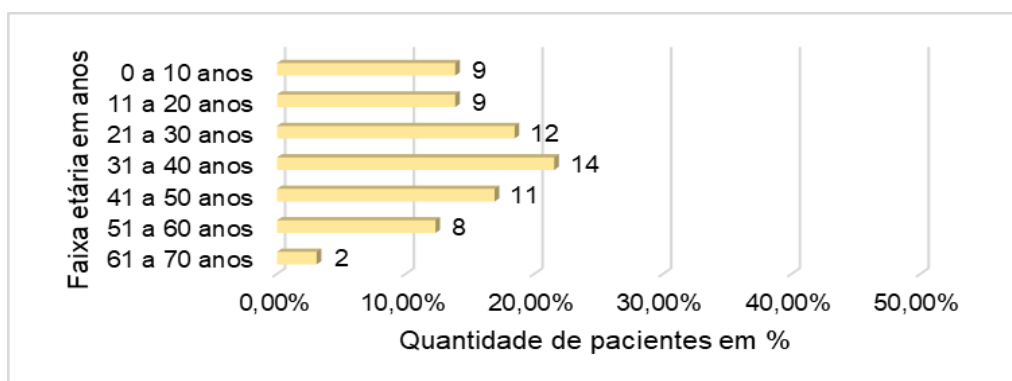
Dos 65 pacientes provedores das amostras fecais coletadas, a maioria tinha como moradia o município do Rio de Janeiro (46,15% n=30), seguidos de Nilópolis (10,77% n=7) e Duque de Caxias (9,24% n=6). Enquanto sua minoria, variou entre os municípios de São João de Meriti e Queimados, com somente um paciente cada (1,54% n=1). (Gráfico 1)

Gráfico 1 - Divisão de pacientes por local proveniente de moradia, das amostras fecais processadas



A sua maioria constitui-se de pacientes do sexo feminino (60% n=39), enquanto 40% (n=26) masculino. Com relação a idade, houve uma variação ampla de crianças, jovens, adultos e idosos, pelo fato do setor onde as amostras foram provenientes, compreender todas as áreas disponíveis do hospital. No âmbito nosocomial, a maior prevalência foi 50 anos (n=4), 27 anos (n=3), 16 anos (n=3) e 17 anos (n=2). Já quando correlacionado a parte comunitária, as idades de maior prevalência foram 8 anos (n=3), seguidos de 55, 52, 50, 35 e 34 anos, cada uma com dois pacientes cada (Gráfico 2).

Gráfico 2 - Quantidade de pacientes por faixa etária encontrada



Já em relação as queixas dos pacientes, 100% dos ambulatoriais tiveram, como solicitação para exame parasitológico, uma consulta de rotina. Enquanto, os pacientes internados compreenderam suas suspeitas em gastroenterite (23,33% n=7), dor abdominal aguda (23,33% n=7), risco cirúrgico (13,33% n=4), infecção urinária (13,33% n=4), amostras para banco de leite humano (10,00% n=3), feridas cutâneas (6,66% n=2) e hepatite, dor torácica aguda e pneumonia, todos com um paciente relacionado cada (3,33% n=1) (Tabela 1)

Tabela 3 - Correlação de paciente pela idade (anos) e sua razão de solicitação de exame parasitológico

Paciente	Idade	Razão da Solicitação	Paciente	Idade	Razão da solicitação
1	7	Consulta	40	40	Dor abdominal aguda
2	8	Consulta	41	55	Risco Cirúrgico
4	36	Consulta	42	39	Pneumonia
6	16	Gastroenterite	43	26	Gastroenterite
7	17	Risco Cirúrgico	44	27	Banco de Leite
8	18	Infecção Urinária	45	50	Dor abdominal aguda
9	38	Gastroenterite	46	30	Ferida cutânea
12	54	Risco Cirúrgico	47	27	Banco de Leite
13	16	Dor abdominal aguda	49	25	Gastroenterite
14	17	Hepatite	50	35	Ferida cutânea
15	20	Consulta	51	9	Consulta
16	10	Infecção Urinária	53	28	Consulta
17	28	Risco Cirúrgico	57	47	Infecção Urinária
18	52	Consulta	58	66	Consulta
19	16	Gastroenterite	59	52	Consulta
20	12	Consulta	61	50	Dor abdominal aguda
21	7	Dor abdominal aguda	62	38	Consulta
22	50	Consulta	63	27	Gastroenterite
23	60	Dor torácica aguda	65	50	Dor abdominal aguda
24	34	Consulta	66	41	Consulta
25	15	Consulta	67	32	Consulta

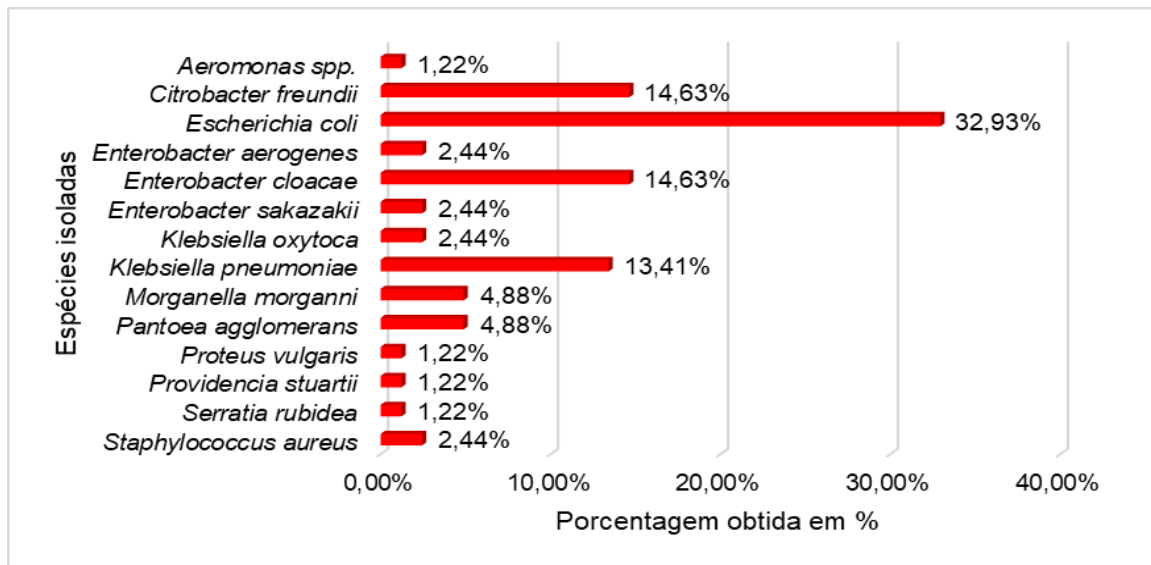
<b>26</b>	25	Consulta	<b>68</b>	59	Consulta
<b>27</b>	46	Gastroenterite	<b>69</b>	34	Consulta
<b>28</b>	50	Dor abdominal aguda	<b>70</b>	37	Consulta
<b>30</b>	15	Infecção urinária	<b>71</b>	44	Consulta
<b>31</b>	47	Consulta	<b>73</b>	10	Consulta
<b>32</b>	55	Consulta	<b>75</b>	68	Consulta
<b>33</b>	35	Consulta	<b>79</b>	29	Consulta
<b>34</b>	8	Consulta	<b>83</b>	35	Consulta
<b>35</b>	50	Consulta	<b>86</b>	33	Consulta
<b>36</b>	33	Banco de Leite	<b>87</b>	55	Consulta
<b>38</b>	24	Consulta	<b>89</b>	8	Consulta
<b>39</b>	30	Consulta			

Após o processamento das amostras fecais em meios de cultura contendo os antimicrobianos previamente descritos, foi possível observar que tanto as amostras provenientes da enfermagem quanto do ambulatório obtiveram êxito de crescimento bacteriano em sua maioria, sendo 80% (n=24) e (88,57% n=31) respectivamente.

### 3.2 Identificação das cepas selecionadas

A partir dos pacientes internados foram obtidas 82 cepas, das quais *Escherichia coli* (32,93% n=27), *Citrobacter freundii* (14,63% n=12), *Enterobacter cloacae* (14,63% n=12) e *Klebsiella pneumoniae* (13,41% n=11) tiveram a maior prevalência, enquanto *Aeromonas spp.*, *Proteus vulgaris*, *Providencia stuartii* e *Serratia rubidea* foram as de menor prevalência (1,22% n=1). Foi possível observar, mesmo em meio seletivo MacConkey para espécies gram negativas, o crescimento de duas cepas de *Staphylococcus aureus* (2,44% n=2).

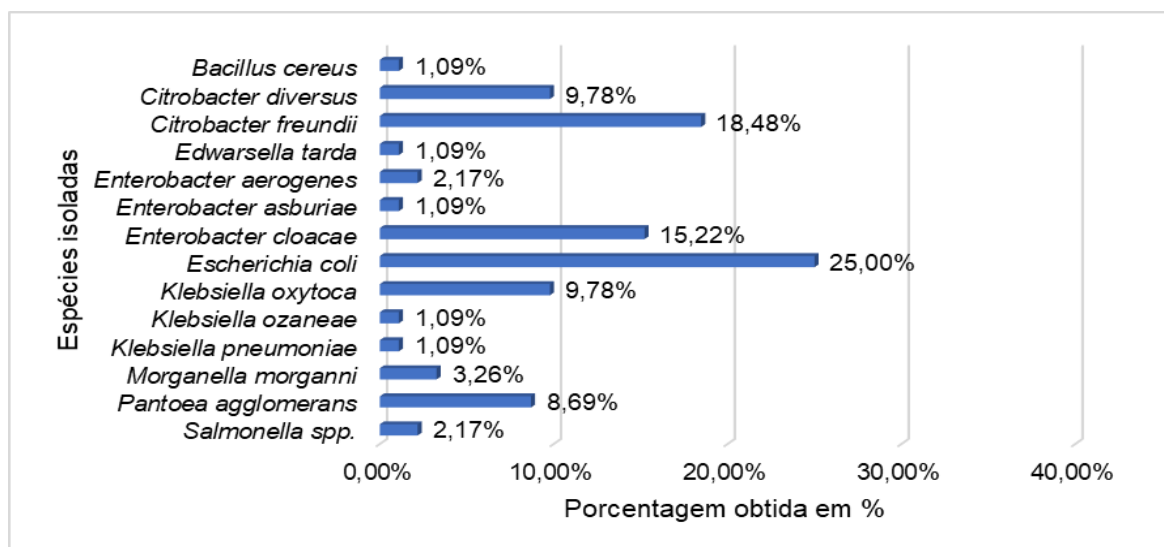
Gráfico 3 - Porcentagem das espécies bacterianas encontradas no ambiente hospitalar



Enquanto dos pacientes ambulatoriais foram isoladas 92 cepas, dentre as quais as que tiveram maior quantidade encontradas foram *Escherichia coli* (25,00% n=23), *Citrobacter freundii* (18,48% n=17) e *Enterobacter cloacae* (15,22% n=14). Já as encontradas em menor número foram *Enterobacter asburiae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Edwardsiella tarda* e *Klebsiella ozanae*, todas as espécies possuindo apenas uma cepa representante (1,09%).

Houve a ocorrência de uma cepa de *Bacillus cereus* (1,09%), mesmo quando utilizando meios seletivos MacConkey, fato repetidamente ocorrido independente da origem das amostras fecais.

Gráfico 4 - Porcentagem das espécies bacterianas encontradas no ambiente comunitário



### 3.3 Perfis de susceptibilidade aos agentes antimicrobianos das cepas

Após feito o TSA, obtivemos os seguintes resultados relacionados a resistência aos antimicrobianos em pacientes nosocomiais e comunitários. (Tabela 4 e Tabela 5, respectivamente).

Tabela 4 - Perfil de resistência nas cepas encontradas em pacientes da Enfermaria

Cepas	Perfil de resistência
7C1:20b1a ( <i>Mm1</i> )	CFL CFZ CRX CTX CRO CAZ CPM GEN AMI KAN AMP AMO AMC IMI FOS NIT
7C1:20b2b1 ( <i>Mm2</i> )	CFL CFZ CFO CTX CRO CAZ AMI KAN AMP AMO PPT AMC IMI FOS NIT
7C1:20b2b2 ( <i>Mm3</i> )	CFL CFZ CRX CTX CRO CAZ CPM GEN AMI KAN TOB AMP AMO PPT AMC ASB IMI MER FOS SUT NIT
7C1:20b2b4x ( <i>Cfl</i> )	CFL CRX CTX CAZ GEN AMI KAN TOB
7C1:20b2b4y ( <i>Eco1</i> )	CFL CFZ CAZ GEN KAN AMP AMO AMC ASB IMI FOS NIT
7C1:5000x1 ( <i>Kol</i> )	CFL CFZ CTX CAZ KAN AMP AMO AMC IMI FOS NIT
7C1:5000x2 ( <i>Cf2</i> )	CFL CFZ CFO CTX CAZ AMP AMO PPT ASB CIP NOR SUT TET
7C1:5000x3 ( <i>Mm4</i> )	CFL CFZ CRX CPM GEN AMI KAN TOB AMP AMO AMC IMI
8C1:20 ( <i>Eco2</i> )	CFL CFZ CRX CTX CAZ GEN AMI KAN TOB AMP AMO ASB CIP NOR FOS SUT TET
8G1:20a1 ( <i>Eco3</i> )	CFL CFZ CTX CRO CPM GEN AMI KAN TOB CIP SUT TET
8G1:20 c ( <i>Ae1</i> )	CFL CFZ CTX CRO CAZ GEN AMI KAN TOB AMP AMO PPT ASB CIP NOR SUT TET
8G1:20 d ( <i>Eco4</i> )	CFL CFZ CTX CRO CAZ CPM GEN KAN TOB AMP PPT CIP NOR ATM SUT TET NIT
8G1:1000a ( <i>Ko2</i> )	CFL CFZ CFO CRO CAZ GEN AMI KAN TOB AMP AMO AMC ASB CIP NOR CLO SUT TET
8G1:1000c ( <i>Sr1</i> )	CFL CFZ CTX CRO GEN KAN AMP AMO CIP NOR CLO FOS SUT TET
8G1:5000a ( <i>Eco5</i> )	CFL CAZ GEN KAN TOB AMP AMO PPT AMC ASB CIP NOR SUT TET
8G1:5000c ( <i>Eco6</i> )	CFL CFZ CFO CTX CRO CAZ GEN KAN AMP AMO PPT CIP NOR FOS SUT TET
12C1:20a ( <i>Eco7</i> )	CFL CFZ CFO CTX CRO CAZ GEN KAN TOB AMP AMO PPT AMC ASB CIP NOR ATM SUT TET NIT
12C1:20b1 ( <i>Eco8</i> )	CFL CFZ CFO CRX CTX CAZ CPM AMP AMO PPT AMC ASB CIP NOR ATM CLO SUT TET NIT
12C1:20b2ay ( <i>Ecl1</i> )	CFL CFZ CRX CTX CRO CAZ CPM GEN KAN TOB AMP AMO PPT AMC ASB CIP NOR IMI ATM FOS SUT TET NIT
12C1:20b3 ( <i>Eal</i> )	CFL CFZ CRX CTX CRO AMP AMO PPT AMC ASB IMI ETP MER SUT TET NIT
12C1:20b4 ( <i>Eco9</i> )	CFL CFZ CFO CRX CTX CRO CAZ CPM KAN AMP AMO PPT AMC ASB CIP NOR IMI MER ATM CLO SUT TET NIT
14C1:20 ( <i>Eco10</i> )	CFL CFZ CFO CRX CTX CRO CAZ CPM AMP AMO PPT AMC ASB IMI ETP MER FOS NIT
17C1:20a ( <i>Es1</i> )	CFL CFZ CFO CRX CTX CRO CAZ CPM KAN AMP AMO PPT AMC IMI ETP MER CLO TET
17C1:20b ( <i>Ps1</i> )	CFL CFZ CFO CRX CTX CRO CAZ CPM AMI TOB AMP AMO PPT AMC ASB CIP NOR ATM CLO SUT TET
17C1:1000b2x ( <i>Eco11</i> )	CFL CFZ CFO CRX CTX CRO CAZ CPM KAN TOB AMP AMO PPT AMC ASB CIP NOR IMI ETP MER ATM CLO SUT TET
17C1:1000c1 ( <i>Eco12</i> )	CFL CFZ CRX CTX CRO CAZ CPM AMP AMO PPT AMC CIP NOR IMI ETP ATM CLO SUT TET NIT

17C1:1000c2x ( <i>Kp1</i> )	CFZ CFO CTX CRO CAZ CPM KAN AMP AMO AMC ASB IMI NIT
17C1:5000c ( <i>Eco13</i> )	CFL CFZ CFO CRX CTX CRO CAZ CPM KAN AMP AMO PPT AMC ASB CIP NOR ATM CLO SUT TET
28C1:20a ( <i>Cf3</i> )	CFL CFZ CRX CTX CRO CPM GEN AMI KAN TOB AMP AMO ETP ATM FOS
28C1:20b ( <i>Cf4</i> )	CFL CFZ CFO CRX CTX CRO CAZ CPM KAN AMP AMO PPT AMC IMI ETP ATM SUT
30C1:20a ( <i>Pa1</i> )	CFL CFZ CFO CTX KAN AMP AMO AMC IMI ETP MER CLO NIT
30C1:20b ( <i>Eco14</i> )	CFL CFZ CRX CTX CRO CAZ CPM KAN AMP AMO PPT AMC ASB ETP ATM
30-K34y ( <i>Ecl2</i> )	CFZ CTX CPM KAN AMP AMO PPT IMI ETP MER NIT
36C1:20a1 ( <i>Pa2</i> )	CFL CFZ CFO KAN AMP AMO AMC ASB IMI
40C1:20 ( <i>Cf5</i> )	CFL CFZ CFO KAN AMP AMO PPT AMC IMI
40G1:20 ( <i>Eco15</i> )	CFL CFZ GEN AMI KAN AMP AMO
42C1:20b ( <i>Pa3</i> )	CFL CFZ CFO CRX CTX CRO CAZ CPM AMP AMO PPT AMC ASB CIP NOR IMI ETP MER ATM
42C1:1000a ( <i>Ecl3</i> )	CFL CFZ CFO CRX CTX CRO CAZ CPM KAN AMP AMO PPT AMC ASB CIP NOR IMI ETP MER ATM SUT TET
42G1:1000b ( <i>Ecl4</i> )	CFL CFZ CFO CRX CTX CRO CAZ CPM GEN KAN TOB AMP AMO PPT AMC CIP ATM SUT TET
43C1:20b ( <i>Kp2</i> )	CFL CFZ CRX CTX CRO CAZ CPM GEN AMI KAN TOB AMP AMO PPT AMC ASB CIP NOR IMI ATM SUT TET NIT
43C1:1000bx ( <i>Cf6</i> )	CFL CFZ CRX CTX CRO AMP AMO IMI
43C1:1000by ( <i>Kp3</i> )	CFL CFZ CRX CTX CRO CAZ CPM GEN KAN TOB AMP AMO PPT AMC ASB CIP NOR IMI MER ATM FOS SUT TET NIT
43C1:1000d ( <i>Sa1</i> )	CFL CFZ CRX CTX CRO CAZ CPM GEN KAN TOB AMP AMO PPT AMC ASB CIP NOR ATM SUT TET NIT
43C1:5000b ( <i>Ecl5</i> )	CFL CFZ CRX CTX CRO CAZ CPM GEN AMI KAN TOB AMP AMO PPT AMC ASB CIP NOR ATM SUT
43G1:20a ( <i>Sa2</i> )	KAN
43G1:20b ( <i>Eco16</i> )	-
43G1:1000 ( <i>Cf7</i> )	ATM
43-K48 ( <i>Kp4</i> )	CFL CFZ CFO CRX CTX CRO CAZ CPM AMI KAN TOB AMP AMO PPT AMC ASB CIP NOR IMI ETP MER ATM FOS SUT TET NIT
44C1:20 ( <i>Es2</i> )	CFL CFZ CFO KAN AMO AMC IMI
45-K54a ( <i>Ecl6</i> )	CFL CFZ CFO KAN AMP AMO AMC IMI
45-K54b ( <i>Cf8</i> )	CFL CFZ CRX KAN AMP AMO IMI TET NIT
46C1:20 ( <i>Pa4</i> )	CFL CFZ CFO AMO AMC IMI
46G1:20 ( <i>Eco17</i> )	KAN
47C1:20 ( <i>Cf9</i> )	CFL CFZ CFO AMP AMO AMC IMI
49C1:20ax ( <i>Cf10</i> )	CFL CFZ AMP AMO PPT AMC IMI
49C1:20ay ( <i>Cf11</i> )	CFL CFZ CFO CAZ GEN AMI KAN AMP AMO PPT AMC IMI
49C1:20b ( <i>Cf12</i> )	CFL CFZ CFO CRX CTX CRO CAZ CPM KAN AMP AMO AMC ASB IMI
49-K62 ( <i>Eco18</i> )	CFL GEN AMI KAN
57C1:20b ( <i>Kp5</i> )	CFL CFZ CFO CRX CTX CRO CAZ CPM AMP AMO PPT AMC ASB IMI ETP MER FOS NIT
57C1:1000 ( <i>Kp6</i> )	CFL CFZ CFO CRX CTX CRO CAZ CPM GEN KAN AMP AMO PPT AMC ASB CIP NOR IMI ETP MER ATM FOS NIT
57G1:20a.2 ( <i>Ecl7</i> )	CFL CFZ CFO CRX CTX CRO CAZ CPM GEN KAN TOB AMP AMO PPT AMC ASB CIP IMI ETP MER ATM CLO SUT TET NIT
57G1:20b ( <i>Kp7</i> )	CFL CFZ CFO CRX CTX CRO CAZ CPM KAN TOB AMP AMO PPT AMC ASB CIP NOR IMI ETP MER ATM CLO SUT TET
57-K82 ( <i>Kp8</i> )	CFL CFZ CFO CRX CTX CRO CAZ CPM GEN KAN TOB AMP AMO PPT AMC ASB CIP NOR IMI ETP MER ATM FOS SUT NIT
57-K84a (1000) ( <i>Ea2</i> )	CFL CFZ CFO CRX CTX CRO CAZ CPM KAN TOB AMP AMO PPT AMC ASB CIP NOR IMI ETP MER ATM FOS NIT
57-K84b (1000) ( <i>Kp9</i> )	CFL CFZ CFO CRX CTX CRO CAZ CPM KAN TOB AMP AMO PPT AMC ASB CIP NOR IMI ETP MER ATM NIT
61C1:20a ( <i>Ecl8</i> )	CFL CFZ CFO CTX CRO CPM AMP AMO AMC

61C1:20b ( <i>Ecl9</i> )	CFL CFZ CAZ KAN AMP AMC ATM NIT
61C1:5000x ( <i>Ecl10</i> )	CFL CFZ CFO GEN KAN TOB AMC IMI ATM NIT
61C1:5000y ( <i>Ecl11</i> )	CFL CFZ CFO CAZ PPT AMC IMI ETP ATM NIT
61G1:20x ( <i>Eco19</i> )	CFL TET NIT
61G1:20y ( <i>Pv1</i> )	IMI TET NIT
61G1:5000a ( <i>Eco20</i> )	CFZ IMI TET NIT
61G1:5000b ( <i>Ecl12</i> )	CFL CFZ CFO AMP AMO AMC IMI NIT
61-K91 ( <i>Kp10</i> )	CFL CFZ CFO CRX CTX CRO CAZ CPM KAN AMP AMO PPT AMC ASB CIP NOR IMI ETP MER ATM FOS SUT NIT
63G1:20a ( <i>Eco21</i> )	IMI
63G1:20 ( <i>Eco22</i> )	KAN IMI ETP MER ATM
63G1:5000 ( <i>Eco23</i> )	KAN TET
65C1:20ax ( <i>Kp11</i> )	CFL CFZ CFO AMP AMC IMI FOS NIT
65G1:20 ( <i>Eco24</i> )	CFL CFZ GEN AMI KAN AMP AMO AMC ASB TET NIT
65G1:1000a ( <i>Eco25</i> )	CFL KAN AMP AMO AMC ASB TET NIT
65G1:1000b ( <i>Eco26</i> )	CFL AMP AMO AMC ASB TET NIT
65G1:5000b ( <i>Eco27</i> )	CFL AMP AMO ASB TET NIT

Legenda 1 - As espécies foram *Mm* (*M. morgani*), *Cf* (*C. freundii*), *Eco* (*E.coli*), *Ko* (*K. oxytoca*), *Ae* (*Aeromonas spp.*), *Sr* (*S. rubidea*), *Ea* (*E. aerogenes*), *Es* (*E. sakazakii*), *Ps* (*P. stuartii*), *Kp* (*K. pneumoniae*), *Pa* (*P. agglomerans*), *Ecl* (*E. cloacae*), *Sa* (*S. aureus*) e *Pv* (*P. vulgaris*).

Legenda 2 - Os grupos de antimicrobianos estudados foram identificados pelas cores: amarelo = grupo das cefalosporinas de 3ª e 4ª geração, azul = grupo dos aminoglicosídeos, verde = grupo das quinolonas e vermelho = grupo dos carbapenêmicos. Os antimicrobianos utilizados foram CFL: Cefalotina, CFZ: Cefazolina, CFO: Cefoxitina, CRX: Cefuroxima, CTX: Cefotaxima, CRO: Ceftriaxona, CAZ: Ceftazidima, CPM: Cefepima, GEN: Gentamicina, AMI: Amicacina, KAN: Kanamicina, TOB: Tobramicina, AMP: Ampicilina, AMO: Amoxicilina, PPT: Piperaciclina com Tazobactam, AMC: Amoxicilina com Ácido Clavulânico, ASB: Ampicilina com Sulbactam, CIP: Ciprofloxacina, NOR: Norfloxacina, IMI: Imipenem, ETP: Ertapenem, MER: Meropenem, ATM: Aztreonam, CLO: Cloranfenicol, SUT: Cotrimoxazol, TET: Tetraciclina, FOS: Fosfomicina e NIT: Nitrofurantoína.



Tabela 5 - Perfil de resistência nas cepas encontradas em pacientes do Ambulatório

Cepas	Perfil de resistência
1C1:20a2a1 (Cf12)	CFL CFZ CFO CPM KAN AMP AMO PPT AMC IMI FOS SUT NIT
1C1:20a2b (Cf13)	CFL CFZ CFO CTX AMP AMO AMC IMI ETP FOS
1C1:20b1 (Ecl8)	CFL CFZ CFO CTX AMP AMO AMC ASB IMI
1C1:20b2 (Cf14)	CFL CFZ CFO CTX AMP AMO IMI
1C1:20b3 (Ecl9)	CFL CFZ CFO CTX GEN KAN AMP AMO AMC IMI SUT TET
1C1:20d (Cf15)	CFL CFZ CFO AMP AMO AMC IMI
1C1:20e (Cf16)	CFL CFZ CFO AMP AMO AMC CLO
2C1:20 (Ecl1)	CFL CFZ CFO CRX CRO CAZ GEN AMI KAN TOB AMP AMO PPT AMC IMI FOS TET
4C1:20a (Ecl2)	CFL CFZ CFO CTX CRO CAZ GEN AMI KAN AMP AMO AMC IMI NIT
4C1:20b (Ecl3)	CFL CFZ CFO CRX CTX CAZ GEN AMI KAN TOB AMP AMO PPT AMC ASB IMI CLO TET NIT
4C1:1000a (Cf1)	CFL CFZ CFO CRX CTX CRO CAZ CPM GEN AMI KAN TOB AMP AMO PPT AMC ASB CIP NOR ATM
4G1:20a2 (Eco1)	CFL CFZ CFO GEN TOB AMP AMO PPT AMC CIP NOR IMI MER
4G1:20b (Eco2)	CFL CFZ CAZ GEN AMI KAN TOB AMP AMO PPT AMC ASB CIP NOR IMI ATM SUT
15C1:20a (Eal1)	CFL CFZ CAZ KAN AMP AMO PPT AMC ASB IMI MER ATM CLO NIT
15G1:20a (Eco3)	CFL CFZ CAZ GEN KAN TOB AMP AMO IMI MER SUT TET NIT
15G1:20by (Eco4)	CFZ GEN TOB AMP AMO IMI ATM SUT TET
15G1:20c (Ko1)	CFL CFZ CRX CTX CAZ GEN KAN AMP AMO IMI MER ATM CLO SUT TET
18C1:20a1 (Cdiv1)	CFL CFZ CFO AMO IMI MER
18C1:20a3(1) (Mm1)	CFL CFZ CFO CRX CTX CAZ AMP AMO IMI ETP MER CLO NIT
18C1:20b (Mm2)	CFL CFZ CRX CTX AMP AMO IMI CLO NIT
18C1:20d1 (Ko2)	CFL CFZ CRX CTX CRO CAZ KAN AMP AMO PPT AMC ASB ATM
18C1:20d2 (Eco5)	CFL CFZ CRX CTX CRO CAZ AMP AMO AMC IMI MER ATM
18C1:20e (Ecl4)	CFL CFZ CFO CTX CRO CAZ CPM KAN AMP AMO AMC IMI ETP MER FOS
20C1:20a (Cf2)	CFL CFZ CFO CTX CRO CAZ KAN AMP AMO AMC IMI ATM CLO NIT
20C1:20b (Ecl5)	CFL CFZ CFO CRX CTX CRO CAZ CPM AMI KAN AMP AMO PPT AMC IMI ETP MER ATM NIT
20-K22a (Eco6)	CTX CAZ CPM AMP AMO PPT ASB
22C1:20a1a (Cdiv2)	CFL CFZ CFO CTX FOS
22C1:20b2 (Cdiv3)	CFL CFZ CFO AMP AMO IMI FOS
22C1:20c1 (Eco7)	CFL CFZ CFO CRX AMO IMI NIT
22C1:20c2 (Ecl6)	CFL CFZ CFO CTX AMO ASB IMI NIT
22C1:20c3 (Ea2)	CFL CFZ CFO CTX AMP AMO AMC IMI FOS NIT
22C1:1000a1a (Easb1)	CFL CFZ CFO CRX CTX CRO CAZ CPM GEN AMI KAN TOB AMP AMO PPT ASB CIP NOR IMI ATM FOS SUT
22C1:1000a1b (Eco8)	CFL CFZ CFO CRX CTX CRO CAZ CPM GEN KAN AMP AMO PPT CIP NOR IMI ETP MER ATM FOS SUT
22C1:1000b (Ecl7)	CFL CFZ CFO CRX CRO CAZ CPM KAN AMP AMO AMC IMI
22C1:5000a1 (Sal1)	CFL CFZ CFO CTX CPM KAN AMP AMO PPT CIP ETP
22C1:5000a2 (Sal2)	CFL CFZ CFO CTX CRO AMP AMO AMC
22C1:5000b (Cdiv4)	CFL CFZ CFO AMO
25-K28a (Eco9)	KAN IMI ETP
31C1:20a (Cdiv5)	CFL CFZ CFO CTX CRO CAZ CPM AMI AMP AMO AMC IMI FOS
31C1:20b (Pa1)	CFL CFZ CFO CRO KAN AMP AMO AMC IMI
32C1:20c (Cdiv6)	CFL CFZ CFO KAN AMP AMO AMC IMI FOS
32-K36 (Kp1)	KAN FOS
34C1:20a1by (Ko3)	CFL CFZ CTX CRO CAZ CPM GEN KAN AMP AMO ASB CIP NOR ATM TET NIT
34C1:20b1 (Cdiv7)	CFL CFZ CFO KAN IMI FOS
39C1:20ay (Cf3)	CFL CFZ CFO CRX CTX CPM KAN AMP AMO AMC ASB IMI SUT NIT

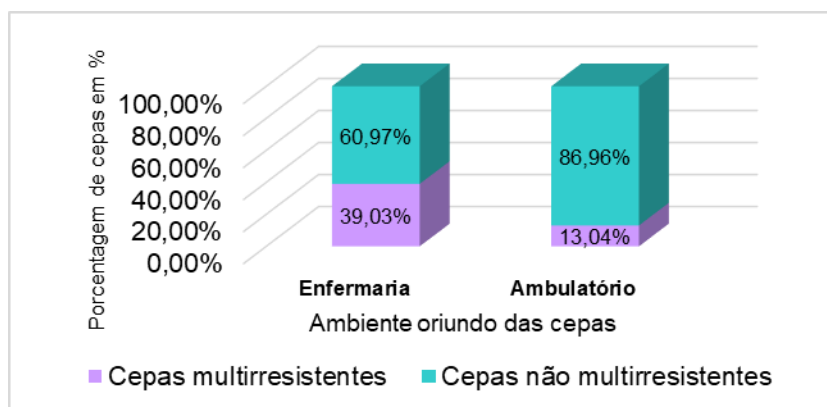
39C1:20b (Cf4)	CFZ CFO AMO PPT ASB IMI
39C1:20c (Cf5)	CFL CFZ CFO AMO AMC IMI
53C1:20a (Cdiv8)	CFL CFZ CFO CTX KAN AMO PPT AMC IMI
53C1:1000 (Ko4)	CFL CFZ CFO CTX CAZ KAN AMO PPT AMC ASB IMI MER ATM
53C1:5000 (Ko5)	CFL CFZ CRO CAZ AMO AMC ASB IMI
53-K77 (Cf6)	CFL CFZ CFO CRX CTX CRO CAZ CPM GEN AMI KAN TOB AMP AMO PPT AMC ASB CIP NOR IMI ATM CLO FOS SUT TET NIT
58C1:1000 (Cf17)	CFL CFZ CFO CPM AMP AMO PPT AMC IMI ETP MER
58-K87 (Koz1)	CFZ CAZ KAN AMO AMC ASB IMI CLO TET NIT
59C1:5000b (Cf7)	CFL CFZ CFO KAN AMO
62C1:20ax (Eco10)	CFL CTX CAZ KAN
62C1:20ay (Eco11)	CFZ CAZ KAN AMP AMO SUT TET
62C1:20b (Cf8)	CFL CFZ CFO KAN AMP AMO AMC IMI
62G1:20a (Ko6)	KAN AMP AMO SUT TET
62G1:1000 (Ko7)	CRX KAN
62G1:5000 (Ko8)	KAN
66C1:20a (Eco12)	CFL CFZ CTX AMP AMC ASB
66C1:1000a (Eco13)	KAN
66C1:1000b (Eco14)	CFL CFZ AMO AMC
66C1:5000a1 (Cf9)	CFL CFZ CFO KAN AMP AMO AMC IMI
66C1:5000a2 (Cf10)	CFL CFZ CFO AMP AMO AMC IMI
66G1:20b (Edt1)	CFL CFZ CFO GEN AMP AMO CLO SUT TET
66G1:1000 (Cf11)	CFL CFZ CFO GEN KAN AMP AMO ASB IMI CLO SUT TET
66G1:5000 (Pa2)	FOS
66-K98.2 (Ko9)	CFL CFZ CFO CRX CTX CRO CAZ CPM AMP AMO PPT AMC ASB IMI ETP MER ATM CLO FOS SUT TET NIT
68C1:20 <sup>a</sup> (Ecl10)	CFL CFZ CFO AMP AMO PPT AMC IMI
68C1:1000a (Pa6)	CFL CFZ CFO CRX AMO AMC IMI
70C1:20b (Pa3)	CFL CFZ CAZ AMP AMC ASB IMI TET
70C1:20c (Mm3)	CFL CFZ CRX CTX CAZ AMP AMO AMC ASB CIP IMI ATM FOS SUT TET
70G1:20 (Pa4)	FOS SUT TET
71C1:20a (Pa7)	CFL CFZ CFO AMP AMO PPT AMC IMI FOS
71C1:20b (Ecl11)	CFL CFZ CFO CAZ KAN AMO PPT AMC IMI FOS
71C1:20c (Ecl12)	CFL CFZ CFO CAZ AMP AMO PPT AMC IMI
71C1:1000 (Ecl13)	CFL CFZ CFO AMP AMO AMC IMI FOS NIT
71G1:20 (Eco22)	CFL GEN KAN AMP AMO SUT TET
73C1:20ay (Ecl14)	CFL CFZ CFO AMP AMO AMC ASB FOS NIT
73C1:20b (Eco23)	CFL CFZ CTX CRO CPM KAN AMP AMO ASB CIP NOR CLO SUT
73C1:20c (Pa8)	CFL CFZ CFO AMP AMO AMC IMI FOS NIT
75C1:20a (Eco15)	CFL CFZ CFO CRX CTX CRO CAZ CPM GEN KAN AMP AMO AMC ASB CIP NOR ATM SUT TET
75C1:1000 (Eco16)	CFL CFZ CRX CTX CRO CAZ CPM GEN KAN TOB AMP AMO PPT AMC ASB CIP NOR ATM SUT TET
83G1:20 (Eco17)	CFZ CTX CRO CAZ CPM GEN KAN AMP AMO AMC ASB SUT TET
83G1:1000 (Eco18)	CFL CFZ GEN KAN AMP AMO AMC ASB SUT TET
86C1:20a (Cdiv9)	CFL CFZ CFO CAZ CPM AMC ATM NIT
86C1:20b2 (Bce1)	CFL CFZ CFO CRX CTX CRO CAZ CPM KAN AMP AMO AMC ASB ATM SUT NIT
87C1:20a (Eco19)	CFL CFZ AMC
87C1:20d (Pa5)	CFL CFZ CFO CRX CTX CRO CAZ CPM GEN KAN AMP AMO AMC FOS NIT
89K121(5000) (Eco20)	SUT
89K122(5000) (Eco21)	CFZ CTX KAN SUT

Legenda 1: As espécies foram Cf (*C. freundii*), Ecl (*E. cloacae*), Eco (*E.coli*), Ea (*E. aerogenes*), Ko (*K.oxytoca*), Cdiv (*C. diversus*), Mm (*M. morgani*), Easb (*E. asburiae*), Sal (*Salmonella spp.*), Pa (*P. agglomerans*), Kp (*K. pneumoniae*), Koz (*K. ozaneae*), Edt (*E. tarda*) e Bce (*B. cereus*).

Legenda 2: Os grupos de antimicrobianos estudados foram identificados pelas cores: amarelo = grupo das cefalosporinas de 3ª e 4ª geração, azul = grupo dos aminoglicosídeos, verde = grupo das quinolonas e vermelho = grupo dos carbapenêmicos. Os antimicrobianos utilizados foram CFL: Cefalotina, CFZ: Cefazolina, CFO: Cefoxitina, CRX: Cefuroxima, CTX: Cefotaxima, CRO: Ceftriaxona, CAZ: Ceftazidima, CPM: Cefepima, GEN: Gentamicina, AMI: Amicacina, KAN: Kanamicina, TOB: Tobramicina, AMP: Ampicilina, AMO: Amoxicilina, PPT: Piperaciclina com Tazobactam, AMC: Amoxicilina com Ácido Clavulânico, ASB: Ampicilina com Sulbactam, CIP: Ciprofloxacina, NOR: Norfloxacina, IMI: Imipenem, ETP: Ertapenem, MER: Meropenem, ATM: Aztreonam, CLO: Cloranfenicol, SUT: Cotrimoxazol, TET: Tetraciclina, FOS: Fosfomicina e NIT: Nitrofurantoína.

A multirresistência dessas amostras foi definida segundo Magiorakos e colaboradores (2012) para cepas da família *Enterobacteriaceae*, ser resistente a 3 ou mais grupos de antimicrobianos analisados. A partir do total cepas, obtivemos 32 cepas multirresistentes hospitalares (39,02%) com maioria das espécies encontradas as *Escherichia coli* (25,00% n=8), *Klebsiella pneumoniae* (25,00% n=8) e *Enterobacter cloacae* (18,75% n=6). Já nas 12 cepas multirresistentes comunitárias (13,04%), a sua maioria de espécies foram *Escherichia coli* (50,00% n=6), *Citrobacter freundii* (16,66% n=2) e *Klebsiella oxytoca* (16,22% n=2). Somente nas amostras de enfermaria foi encontrada uma cepa de *Aeromonas spp.* multirresistente (3,12%) (Gráfico 5).

Gráfico 5 - Porcentagem das cepas multirresistentes encontradas a partir de suas origens

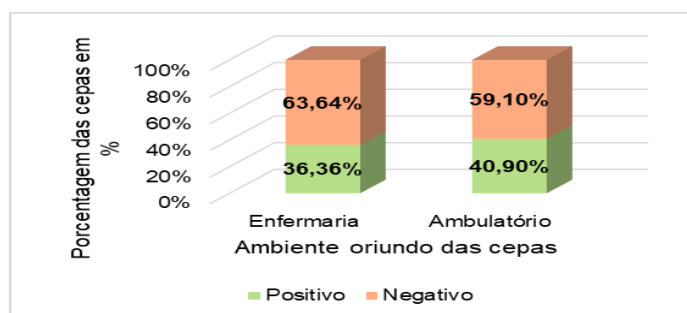


### 3.4 Produção de ESBL entre as cepas isoladas

Após avaliação do perfil de resistência, foram encontradas 55 cepas (33 hospitalares e 22 comunitárias) com resistência suspeita para a presença de genes de ESBL. Com a execução de seu teste fenotípico confirmatório, foi observado que 36,36% (n=12) das cepas

provenientes da enfermaria foram positivas enquanto 40,90% (n=9) das cepas ambulatoriais também possuíam esse mesmo aspecto. (Gráfico 6).

Gráfico 6 - Porcentagem das cepas positivas e negativas para o teste fenotípico confirmatório para ESBL



### 3.5 Produção de carbapenemases entre as cepas isoladas

Já em relação as cepas resistentes aos 3 carbapenêmicos avaliados, 37 cepas, sendo 23 de enfermaria e 14 de ambulatório, foram feitos testes fenotípicos para a possível presença de genes correspondentes a esse grupo de antimicrobianos.

Nas cepas hospitalares, houve a maior número de resultado positivo para a possibilidade do gene blaKPC (69,56% n=16), seguidos pelo gene blaOXA-48(47,82% n=11), gene blaAMP-C (47,82% n=11) e a menor encontrada em relação ao genes do grupo das metalo beta-lactamases (GMBL) (13,04% n=3). Já nas cepas comunitárias, o maior número do resultado positivo para essa possibilidade deu-se ao gene blaOXA-48 (71,43% n=10) e do gene blaKPC (28,57% n=4), enquanto os genes blaAMP-C e genes do GMBL só foram encontrados em uma cepa (7,14%).

Somente uma cepa (2,70%) de *Klebsiella oxytoca* proveniente do ambiente comunitário teve a presença fenotípica de todos os genes compreendidos no teste, enquanto 18,92% (n=7) possuiu 3 genes, 21,62% (n=8) obteve 2 genes, 40,54% (n=15) obteve somente 1 gene e 16,22 (n=6) não possuiu gene em seus resultados (Tabela 6 e Tabela 7).

Tabela 6 – Resultado dos testes fenotípicos para presença de genes correlacionados a carbapenêmicos em cepas hospitalares

Cepa	GMBL	blaKPC	blaAMP-C	blaOXA-48
12C1:20b2ay ( <i>Ecl1</i> )	-	-	+	+
12C1:20b3 ( <i>Ea1</i> )	-	+	+	+
12C1:20b4 ( <i>Eco9</i> )	-	-	-	+
14C1:20 ( <i>Eco10</i> )	-	-	-	+
17C1:20a ( <i>Es1</i> )	-	+	-	+
17C1:1000b2x ( <i>Eco11</i> )	-	-	-	-
28C1:20a ( <i>Cf3</i> )	+	+	+	-
30-K34y ( <i>Ecl2</i> )	-	-	-	-
30C1:20a ( <i>Pa1</i> )	-	+	+	-
42C1:20b ( <i>Pa3</i> )	-	+	-	-
42C1:1000a ( <i>Ecl3</i> )	-	+	+	+
43C1:20b ( <i>Kp2</i> )	-	-	-	-
43C1:1000by ( <i>Kp3</i> )	-	+	-	+
43-K48 ( <i>Kp4</i> )	+	+	+	-
57C1:20b ( <i>Kp5</i> )	-	-	+	+
57C1:1000 ( <i>Kp6</i> )	-	+	-	-
57G1:20a.2 ( <i>Ecl7</i> )	-	+	+	+
57G1:20b ( <i>Kp7</i> )	-	+	+	-
57-K82 ( <i>Kp8</i> )	-	+	-	-
57-K84a (1000) ( <i>Ea2</i> )	+	+	+	-
57-K84b (1000) ( <i>Kp9</i> )	-	+	+	+
61-K91 ( <i>Kp10</i> )	-	+	-	-
63G1:20b ( <i>Eco22</i> )	-	+	-	-

Legenda: *Ecl*: *E. cloacea*; *Ea*: *E. aerogenes*; *Eco*: *E. coli*; *Es*: *E. sakazakii*; *Cf*: *C. freundii*; *Pa*: *P. agglomerans*; *Kp*: *K. pneumoniae*.

Tabela 7 – Resultado dos testes fenotípicos para presença de genes correlacionados a carbapenêmicos em cepas comunitárias

Cepa	GMBL	blaKPC	blaAMP-C	blaOXA-48
4G1:20a2 ( <i>Eco1</i> )	-	-	-	+
4G1:20b ( <i>Eco2</i> )	-	-	-	+
15C1:20a ( <i>Ea1</i> )	-	-	-	-
15G1:20a ( <i>Eco3</i> )	-	-	-	-
15G1:20c ( <i>Ko1</i> )	+	+	+	+
18C1:20a1 ( <i>Cdiv1</i> )	-	-	-	+
18C1:20d2 ( <i>Eco5</i> )	-	-	-	+
18C1:20e ( <i>Ecl4</i> )	-	+	-	+
20C1:20b ( <i>Ecl5</i> )	-	+	-	+
22C1:20a1a ( <i>Cdiv2</i> )	-	-	-	+
22C1:1000a1b ( <i>Eco8</i> )	-	-	-	+
53-K77 ( <i>Cf6</i> )	-	-	-	+
58C1:1000 ( <i>Cf17</i> )	-	+	-	+
66-K98.2 ( <i>Ko9</i> )	-	-	-	-

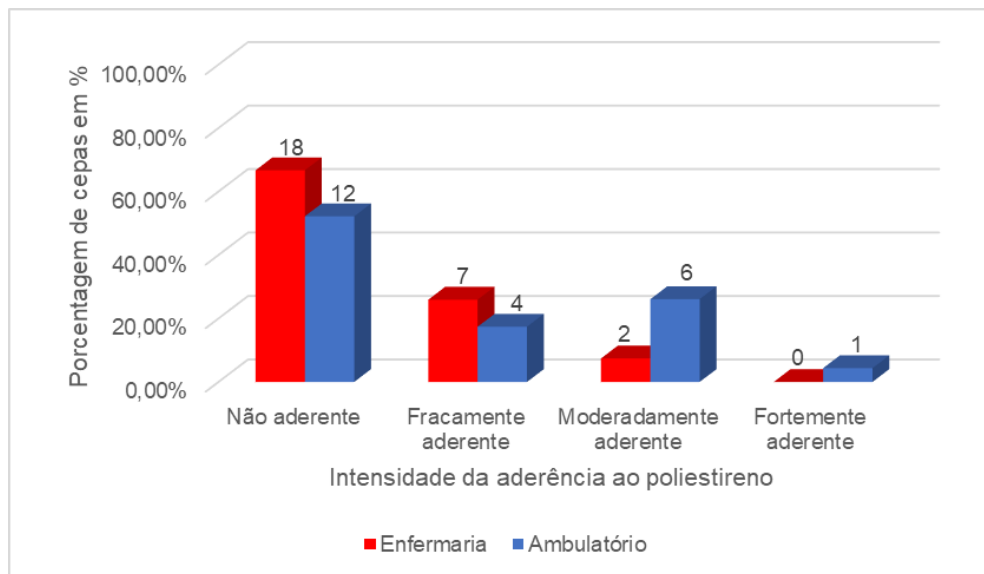
Legenda: *Eco*: *E. coli*; *Ea*: *E. aerogenes*; *Ko*: *K. oxytoca*; *C.div*: *C. diversus*; *Cf*: *C. freundii*.

### 3.6 Presença de biofilme nas cepas de *Escherichia coli*

Devido a sua maior prevalência em ambos os ambientes avaliados e sua grande complexidade junto a contaminações e infecções, foram avaliados os 50 espécimes de *Escherichia coli* quanto a sua intensidade de aderência ao poliestireno.

Das 27 cepas provenientes do ambiente nosocomial, 18 foram não aderentes (66,68%), 7 foram fracamente aderentes (25,92%), 2 foram moderadamente aderentes (7,40%) e nenhuma foi fortemente aderente. Enquanto nas 23 cepas oriundas do ambiente comunitário, 12 foram não aderentes (52,18%), 4 foram fracamente aderentes (17,39%), 6 foram moderadamente aderentes (26,09%) e uma foi fortemente aderente (4,34%).

Gráfico 7 - Porcentagem das cepas e suas intensidades de aderência ao poliestireno



## 4 DISCUSSÃO

Mesmo considerando participação em grande parte da microbiota intestinal, a família *Enterobacteriaceae* ainda assim não pode ser considerada a mais abundante de todas. Quando Tamura (2017) avaliou amostras fecais, observou-se a maior presença das famílias *Lachnospiraceae* e *Ruminococcaceae*, sendo as Enterobactérias somente a nona em ordem decrescente de prevalência. Porém Buzon-Duran, Capita e Alonso-Calleja (2017) encontraram grande quantidade de enterobactérias em frango, sendo possível assim correlacionar a presença dessas espécies possivelmente resistentes nas amostras fecais, graças ao consumo desse tipo de alimento não higienizado e possivelmente mau cozido.

Já num estudo brasileiro de cepas hospitalares de diversos estados, foram encontradas 4000 cepas da família *Enterobacteriaceae* resistente a carbapenêmicos provenientes de circulação sanguínea, trato respiratório, líquido cefalorraquidiano e outras infecções (MARTINS, 2017). Mesmo que nosso estudo tenha outro tipo diferente de fonte, ainda possuem similaridades, seja da resistência a carbapenêmicos (60,92% das cepas totais em nosso estudo) e também na presença de espécies identificadas (*Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Escherichia coli*, *Citrobacter spp.*, *Morganella morgannii*, *Providencia spp.* e *Proteus spp.*). Foram encontrados, respectivamente, 15,85%, 2,44%, 32,93%, 14,63%, 4,88%, 1,22% e 1,22% oriundas das cepas hospitalares. Enquanto das cepas comunitárias foram 11,96%, 18,48%, 25,00%, 28,26% e 3,26% nas porcentagens de espécies ou gêneros, excluindo *Providencia spp.* e *Proteus spp.*, implicando diretamente na possibilidade de não haver espécies específicas com pressões seletivas diferentes, ampliando ainda mais o espectro de difusão de possíveis resistências.

Já El-Badawy e colaboradores (2017) encontrou no Egito, 114 cepas de *Klebsiella pneumoniae* em 84 casos compreendendo pacientes tanto do sexo feminino quanto do masculino, que deram entrada em um hospital, com idades variando de 2 meses até 85 anos. Assim confirma nossos resultados, onde avaliamos 65 pacientes, que sua maioria era do sexo feminino, com uma grande amplitude de idade (7 até 65 anos) e possuíam 12 cepas de *K. pneumoniae* identificadas, sendo 11 hospitalares e 1 ambulatorial.

Um estudo francês com amostras de urina a partir de pacientes com infecções urinárias isolou com mais frequência cepas de *Enterobacteriaceae* como *E. coli*, *Klebsiella spp.* e *Proteus spp.*, e também isolou cepas Gram-positivas como *Staphylococcus spp.* (CHERVET et.

al, 2017) assim como outro autor (Park et. al, 2017,) que em pacientes coreanos internados na UTI, isolou essas espécies incluindo também as Gram-positivas. Nosso estudo confirma a presença de todas as espécies, até *Staphylococcus*, sendo uma afirmação clara de que há comunicação da microbiota intestinal com outras, provenientes de outros sistemas, por exemplo o urinário e o respiratório, sendo possível até mesmo a transmissão de resistência.

Depois do processamento das amostras fecais, observamos a presença de crescimento em meio de cultura seletivos em mais de 80% delas, independentemente de sua origem hospitalar ou comunitária, corroborando com Mulki (2017) que também encontrou resultado positivo em swabs retais de pacientes, sendo eles colonizados ou não.

Em nosso estudo encontramos cepas de *Enterobacter cloacae*, terceira na ordem das espécies de maior frequência, resistentes a cefalosporinas (100% em pelo menos 4 deste grupo independente de sua origem), ampicilina (83,33% hospitalares e 71,43% ambulatoriais), amoxicilina (75% hospitalares e 100% ambulatoriais), corroborando com o estudo de Wisplinghoff (2004) e de Coutinho (2014), que encontrou resistência ao cloranfenicol relacionada a essa espécie, onde em nosso estudo foram obtidas em 2 cepas, relacionadas a uma possível baixa frequência.

Dentre as cepas encontradas, na maioria de nosso estudo, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter cloacae*, apresentaram diversas resistências a antimicrobianos, como por exemplo as cefalosporinas de 3ª e 4ª gerações. Dentre os ambientes analisados, podemos avaliar pelo menos a resistência a um e até quatro antimicrobianos em 51,85% de *E. coli*, 90,90% de *K. pneumoniae* e 75,00% de *E. cloacae* em ambiente hospitalar. Porém quando relacionadas ao ambiente comunitário, foram analisadas essas resistências somente em 56,52% de *E. coli* e 78,57% de *E. cloacae* e nenhuma resistência em uma cepa obtida de *K. pneumoniae*. De acordo com Van Hoek (2015), a resistência bacteriana a essas cefalosporinas entre essas espécies, está associada diretamente a contaminação fecal, validando nosso estudo mesmo com uma ligeira diferença.

Em nossos estudos encontramos espécimes de *E.coli* resistente a pelo menos um aminoglicosídeos proposto na metodologia, sendo 18 cepas provenientes do ambiente hospitalar e 10 do ambiente comunitário. Corrobora com o estudo de Lopez-Diaz (2017) que encontrou essa mesma espécie em amostras urinárias de um hospital espanhol, com mesmo tipo de resistência pelo menos na metade de suas amostras. Nosso estudo indicou a resistência fenotípica a tobramicina em 22,22% das cepas nosocomiais e 21,74% nas cepas comunitárias, resistência a gentamicina em 37,03% das cepas nosocomiais e 39,13% nas cepas comunitárias



e resistência a todos os antimicrobianos testados em 7,41% das cepas nosocomiais e 4,35% nas cepas comunitárias, confirmando semelhanças com o estudo relatado anteriormente.

Já em comparação a um estudo de amostras fecais provenientes de latrinas da África do Sul (BEUKES, 2017) podemos conflitar e confirmar diversos aspectos sobre as *E coli* obtidas em nosso estudo. O autor encontra uma cepa 100% susceptível a todos os antimicrobianos, o que não podemos relacionar com nosso estudo, pois nenhuma obteve esse perfil. Porém podemos corroborar com diversas resistências obtidas nesse estudo africano, relacionando a resistência a tobramicina e gentamicina (aminoglicosídeos importantes na medicina), amoxicilina com ácido clavulânico (o seu uso é frequente em tratamento de infecções respiratórias e urinárias), ciprofloxacina e norfloxacina (quinolonas não tão utilizadas no tratamento de infecções), corroborando com nossos estudos que encontraram resistência a esse antimicrobianos em 22,00% (n=11), 38,00% (n=19), 44,00% (n=22), 34,00% (n=17) e 32,00% (n=16) das *E coli* totais obtidas, respectivamente. Porém conflita totalmente em relação aos carbapenêmicos, pois o autor achou uma quantidade ínfima, já enquanto nosso estudo encontrou 30,00% (n=15) de cepas resistentes pelo menos a um carbapenêmicos proposto.

Das 50 cepas de *Escherichia coli* obtidas em nosso estudo, 64,00% (n=32) foram resistentes a ampicilina, 46,00% (n=23) resistentes a contrimoxazol e 52,00% (n=26) resistentes a tetraciclina, corroborando com um estudo de amostras fecais de surtos diarreicos e infecções entéricas na África subsaariana, que também obteve grande frequência desse tipo de resistência (BRANDER, 2017). As espécies foram consideradas enteropatogênicas pelo autor, podendo ser correlacionadas com cepas obtidas em nosso estudo, sendo ainda mais complexo pela prevalência de outros tipos de resistência como ciprofloxacina (34% n=17) e ceftriaxona (30% n=15). Logo é de suma importância a investigação prioritária de pacientes possivelmente colonizados por microrganismos multirresistentes mesmo sem infecções aparentes, para que, no futuro, não se realizem e que se transmitam para outros pacientes ou para a comunidade.

Em nosso estudo encontramos perfis de resistência bem definidos de 11 cepas de *K. pneumoniae* hospitalares e 1 cepa comunitária. A proveniente do ambulatório teve mínima resistência enquanto as resistências nas cepas hospitalares foi de 100% para amoxicilina com ácido clavulânico, 81,81% (n=9) para ciprofloxacina, 81,81% para norfloxacina, 81,81% para aztreonam, 45,45% (n=5) para gentamicina, 18,18% (n=2) para amicacina, 72,72% (n=8) para fosfomicina, 100% para imipenem e 72,72% para meropenem, corroborando com o estudo

com cepas isoladas de amostras fecais e swabs retais de Muggeo e colaboradores (2017) que também encontrou essas resistências para esse mesmo tipo de espécie.

Apresentou-se uma pequena discrepância na relação com as resistências de imipenem e fosfomicina, porque enquanto o estudo de Demir et al. (2017) encontrou 17 cepas com resistência ao imipenem, o presente estudo isolou 46 cepas provenientes da enfermaria e 44 cepas ambulatoriais com resistência, compreendendo tanto as espécies que o autor cita quanto outras da família *Enterobacteriaceae*. Esse aspecto pode ter ocorrido pelas diferentes maneiras de obtenção das amostras para cultura bacteriana, pois enquanto o estudo do autor foi feito através de amostras de sangue, fluidos corpóreos estéreis, tecido mole e aspirações traqueais, o estudo atual foi feito a partir de diluições de amostras fecais, sendo possível a maior quantidade de cepas resistentes a antimicrobianos.

O estudo de Buelow e colaboradores (2017) nos Países Baixos, avaliou a microbiota de indivíduos saudáveis e pacientes internados na UTI com tratamento de antimicrobianos, possuindo perfis completamente distintos, confirmando o descrito na literatura de que o uso desses medicamentos altera drasticamente a microbiota intestinal. Esse estudo encontrou cepas de *E. coli* susceptíveis a cefalosporinas e aminoglicosídeos, em ambos os tipos de amostragem, o que conflita diretamente com o nosso estudo, pois mesmo em fontes distintas, encontramos em cepas hospitalares dessa espécie 40,74% (n=11) resistentes a pelo menos dois antimicrobianos do grupo dos aminoglicosídeos e em cepas comunitárias 43,48% (n=10) com essa resistência. E em relação as cefalosporinas, encontramos resistência em pelo menos dois antimicrobianos do grupo das cefalosporinas em 44,44% (n=12) e 34,78% (n= 8) nas cepas de *E. coli* hospitalares e comunitárias, respectivamente.

As fluoroquinolonas são um grupo de agentes antimicrobianos muito utilizadas principalmente pelo seu amplo espectro de atividade e em nosso estudo, foi identificada a resistência a este grupo em 40,24% das cepas hospitalares e 13,04% em cepas ambulatoriais. Um estudo em amostras fecais de crianças africanas isolando cepas de *Enterobacteriaceae*, corroborou com nosso estudo pois 61,35% delas foram positivas para a resistência fenotípica as fluoroquinolonas, sendo elas compreendidas entre *E. coli*, *Klebsiella spp.*, *Klebsiella pneumoniae* e *Klebsiella oxytoca*. (MOUMOUNI et al., 2017).

Já Park e colaboradores (2017), encontrou espécies similares com as de nosso estudo, sendo 23,2% resistentes a fluoroquinolonas, em amostras urinárias provenientes de pacientes internados em UTI. O elevado resultado obtido no ambiente hospitalar pode ser relacionado possivelmente ao uso frequente no tratamento de infecções (RODRIGUEZ-MOSAZ et al., 2015).

A multirresistência em relação ao total das cepas encontradas, observamos uma incidência de 25,29% (n=44), sendo a maioria de *Escherichia coli* (31,82% n=14). Correlaciona com o estudo de Brander (2017) que encontrou 60,6% de cepas multirresistentes em amostras provenientes de crianças com infecções entéricas. Também foram identificadas correlações de multirresistência e contaminação ambiental: ausência de saneamento aumenta 76% da probabilidade de encontrar essas cepas, a higiene das mãos aumenta 50% essa propensão e a quantidade aumentada de pessoas em um cômodo aumenta 10% a mais para cada pessoa, podendo diretamente relacionar a multirresistência das cepas de nosso estudo com a possível ausência de aspectos em relação aos pacientes tanto hospitalares como comunitários.

A resistência das espécies da família *Enterobacteriaceae* a diversos grupos de antimicrobianos é amplamente visto na literatura. Abdallah et al. (2017) descreve que encontrou em maioria das cepas ESBL positivas, a resistência para quinolonas e aminoglicosídeos, corroborando com nossos estudos que encontraram também esse tipo de resistências em amostras positivas fenotipicamente, sendo maioria nas cepas de enfermaria. Já em relação a resistência a nitrofurantoína, ele só encontra um espécime, contradizendo nossos estudos que encontraram 30,92% de cepas que correlacionam esses dois aspectos.

Foram encontradas em nossos estudos uma quantidade considerável de cepas de *Escherichia coli* e *Enterobacter cloacae* que produzem ESBL, que contesta estudos como de Brander (2017) que encontrou essa mesma produção em baixa prevalência por *Escherichia coli* enteropatogênicas no Quênia (3,6%) e Demir et al. (2017), na Turquia, que achou com maior prevalência as *E.coli* e de *K. Pneumoniae*, mesmo que ainda incluindo nos estudos haviam outras espécies de *Enterobacteriaceae* como *Enterobacter cloacae* e *Klebsiella oxytoca*, que em nossos estudos obteve esse resultado em maior quantidade em sua correlação.

Também foi confirmada essa produção num estudo mexicano, onde a maior prevalência das espécies obtidas foram *Escherichia coli* (a maior), *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter cloacae* (BARRIOS, 2017) além de outras espécies bacterianas clínicas, sendo exatamente a mesma condição de parâmetros obtidos em nosso estudo. Fato que também identificadas enterobactérias produtoras de ESBL em alimentos crus para animais domésticos em um estudo holandês (BAEDE, 2017), podendo demonstrar que esses animais também são possíveis transmissores de genes de resistência ao contato de suas excretas. Isso mostra quão necessário é a vigilância e controle dessas espécies produtoras de ESBL para que, a longo prazo, ocorra diminuição de disseminação.

Já analisando nossas espécies produtoras de ESBL separadas por suas origens, hospitalares ou comunitárias, podemos ver pouca diferença, pois a maioria proveniente da enfermaria foram *Escherichia coli* (n=4), *Klebsiella pneumoniae* (n=3) e *Enterobacter cloacae* (n=2) enquanto a maioria do ambulatório foram *Escherichia coli* (n=5) e *Enterobacter cloacae* (n=2). O que confirma um possível perfil de resistência relacionado ao nosocômio, independente da sua procedência. Correlaciona diretamente com estudos europeus tanto a partir de espécies clínicas oriundas de amostras de urina, feridas e outros receptáculos (GALASSUS, 2017), que encontraram como resultado das *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBL as espécies *Escherichia coli* (36,4%), *Klebsiella pneumoniae* (34,1%) e *Enterobacter cloacae* (18,2%) quanto em pacientes hospitalares e ambulatoriais de um hospital, onde foi detectada a produção de ESBL e Amp-C beta-lactamase respectivamente, em 13,8% e 6,4% das amostras (UZUNOVIC, 2018).

Nossos estudos demonstraram a presença de Amp-C com os outros genes de resistência alvo, confirmando esse fato com o estudo de Gahout-sait et al. (2015), que encontrou esse tipo em conjunto a quinolonas e outros genes de beta-lactamase.

Também se torna relevante pelo fato de um estudo onde pacientes colonizados ou não, em unidade de tratamento intensivo (UTI), isolou cepas de *E coli* e do gênero *Klebsiella* produtoras de ESBL (MULKI, 2017), confirmando nossos resultados. De fato, nem sempre a infecção severa é a única importância em relação as resistências aos antimicrobianos, sendo necessária observação desde o rastreio, a colonização e o contato desses pacientes.

Quando observamos a presença da produção das carbapenemases nas cepas do nosso estudo é possível identificar que as principais espécies escolhidas a partir de perfis de resistência compatíveis foram *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* e *Escherichia coli* no caso das hospitalares e *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter diversus* e *Enterobacter cloacae* no caso das comunitárias. O resultado de seus fenótipos foi positivo para o gene blaOXA-48 em 22 cepas, blaAmp-C em 12 cepas, blaKPC em 20 cepas e blaNDM em 4 cepas. Corroboramos com um estudo que encontrou em 12 espécies clínicas também produtora, a partir de teste fenotípicos, tendo como sua maioria cepas de *Escherichia coli* produzindo blaOXA-48 e do gênero *Klebsiella* produzindo blaOXA-48 (Galassus, 2017), tanto quanto o estudo de Hanemaaijer (2017) que encontrou espécies do gênero *Enterobacteriaceae* produtoras de carbanemases (sem produção de ESBL) em pacientes previamente hospitalizados na Europa e Ásia, dando a atual magnitude da difusão desse tipo de resistência em todo o mundo devido ao uso para tratamento de infecções graves

causadas por ESBL, sendo *Klebsiella pneumoniae* a espécie do estudo com mais genes encontrados (blaOXA-48 e blaKPC).

Das 12 cepas produtoras de enzimas do tipo Amp-C em nosso estudo, sua metade foi procedente de amostras hospitalares provenientes do grupo CESP (50% n=6). Seu resultado pode ser falso-positivo pelo fato dessas bactérias serem produtoras constitutivas de beta-lactamases cromossômicas, aumentando a produção de resistência as enzimas do tipo Amp-C, e sua difícil interpretação. (ANVISA, 2007; HIRSCH, TAM, 2010).

Em relação a produção de biofilme, o resultado obtido sugere certas concordâncias com o estudo de Bocanegra-Ibarias (2017) que encontrou maioria das cepas de *Enterobacteriaceae* não aderentes ao poliestireno em amostras providas de um hospital (81,8%), porém discorda em relação ao índice de fortemente aderentes (16,7). Nosso estudo além de não encontrar nenhuma proveniente do ambiente nosocomial, ainda encontramos uma com essa característica no ambiente comunitário, gerando a preocupação da disseminação de genes de resistência construindo perfis de resistência possivelmente hospitalares, em cepas que não são diretamente ligadas a hospitais. E a autora ainda correlaciona a resistência aos carbapenêmicos com isolados tanto forte quanto fracamente aderentes, o que se confirma em nossos estudos porque a resistência encontrada nas cepas de *Escherichia coli* não foram diretamente ligadas a aderência ao poliestireno.

O resultado obtido para formação de biofilme em nosso estudo também pode ser corroborado tanto com o estudo de Schiebel e colaboradores (2017) que encontrou em isolados de *E. coli* esses tipos de aderência, porém não confirma no aspecto dos “não aderentes” como maioria encontrada em nosso estudo, sendo 66,68% em cepas hospitalares e 52,18% em cepas comunitárias, sendo possível afirmar que a formação de biofilme não é somente a exclusividade de cepas com perfis de resistência hospitalar, sendo possível até no meio ambiente. Já essa pouca aderência é confirmada num estudo iraniano de amostras fecais de pacientes hospitalizados e não hospitalizados, que encontrou a capacidade das cepas das *E. coli* produzirem biofilme, mesmo que fracamente (HASHEMIZADEH et al., 2017).

Já em relação aos artigos publicados pela autora de nosso estudo como co-autoria (NOGUEIRA et al., 2015) e submetidos até a presente data como co-autora (GONÇALVES et al., 2017 e NOGUEIRA et al., 2017), mesmo esses artigos serem em relação a amostras provenientes de corpos d’água, podemos interpretar que a presença tanto de espécies semelhantes as encontradas no meio hospitalar e comunitário, como também seus perfis de resistência. Essa realidade pode ser também analisada como a difusão de resistências, seja por despejo de indústrias ou de esgoto sem tratamento prévio em águas, podendo gerar alta

pressão seletiva e assim cada vez mais difundir genes de resistência em cepas até mesmo não patogênicas, podendo vir a ser fonte de infecções futuras.

## CONCLUSÃO

A partir da metodologia e objetivos propostos, foi possível a identificar a presença de cepas Gram-negativas pertencentes a família *Enterobacteriaceae*, com a maioria das cepas da espécie *Escherichia coli*, um indicador fecal muito importante e descrito na literatura científica. Diversas cepas possuíam perfil de resistência hospitalar tanto aquelas cepas provenientes de pacientes internados quanto de pacientes ambulatoriais, mesmo que em menor quantidade como já era o esperado.

A caracterização fenotípica da resistência a antimicrobianos indicou a presença de genes relacionados a resistência aos quatro principais grupos de antimicrobianos utilizados no tratamento de infecções por enterobactérias (betalactâmicos, aminoglicosídeos, quinolonas e carbapenêmicos).

Embora não tenha sido possível a detecção dos genes relacionados a resistência através de ensaios moleculares. A caracterização fenotípica é passo essencial para criação de estratégias para controle de infecções, revelando patógenos como potenciais fontes de genes relacionados a mecanismos de virulência, como aqueles previamente associados à resistência e multirresistência a antimicrobianos e produção de biofilme.

Ensaio moleculares não foram realizados devido a crise financeira da própria instituição, onde a dificuldade de obtenção de materiais e tempo hábil impediu o trabalho de seguir aos resultados genômicos.

Considerando que a transferência de elementos genéticos de resistência a antimicrobianos está ocorrendo ininterruptamente no ambiente hospitalar e comunitário, os resultados reforçam que medidas de barreira à transmissão de microrganismos e o uso mais criterioso de antimicrobianos são necessários para o controle da disseminação de microrganismos albergando elementos de resistência.

Uma ferramenta efetiva de triagem *a priori* dos patógenos multirresistentes transformou-se em prioridade para adaptar tratamentos, isolar pacientes infectados e possíveis transportadores, impedindo a transferência de resistência entre patógenos comensais e infecciosos.

## REFERÊNCIAS

- ABDALLAH, H. M.; AL NAIEMI, N.; REULAND, E. A.; WINTERMANS, B. B.; KOEK, A.; ABDELWAHAB, A. M.; SAMY, A.; ABDELSALAM, K.W.; VANDENBROUCKE-GRAULS, C.M.J.E. Fecal carriage of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase- and carbapenemase producing Enterobacteriaceae in Egyptian patients with community-onset gastrointestinal complaints: a hospital -based cross-sectional study. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, n. 6, v. 62, p2-7, 2017.
- ADLER, A.; KHABRA, E.; PAIKIN, S.; CARMELI, Y. Dissemination of the blaKPC gene by clonal spread and horizontal gene transfer: comparative study of incidence and molecular mechanisms. **J Antimicrob Chemother**, v 71, p2143–2146, 2016.
- AGÊNCIA Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Nota Técnica nº 01/2013. Disponível em: < [http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/ea4d4c004f4ec3b98925d9d785749fd/Microsoft+Word+--+NOTA+T%C3%89CNICA+ENTEROBACTERIAS+17+04+2013\(1\).pdf?MOD=AJPERES](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/ea4d4c004f4ec3b98925d9d785749fd/Microsoft+Word+--+NOTA+T%C3%89CNICA+ENTEROBACTERIAS+17+04+2013(1).pdf?MOD=AJPERES)>. Acesso em: julho de 2016.
- AGÊNCIA Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Disponível em: < [http://www.anvisa.gov.br/servicosade/controle/rede\\_rm/cursos/rm\\_controle/opas\\_web/modulo3/mecanismos.html](http://www.anvisa.gov.br/servicosade/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo3/mecanismos.html)>. Acesso em: novembro de 2017.
- AHMED, S.; OLSEN J. E.; HERRERO-FRESNO, A. The genetic diversity of commensal *Escherichia coli* strains isolated from non-antimicrobial treated pigs varies according to age group. **PLoS ONE**, n. 12, v. 5, p1-18, 2017.
- AJIBOYE, R. M.; SOLBERG, O. D.; LEE, B. M.; RAPHAEL, E.; DEBROY, C.; RILEY, L.W. Global Spread of Mobile Antimicrobial Drug Resistance Determinants in Human and Animal *Escherichia coli* and *Salmonella* Strains Causing Community-Acquired Infections. **Clinical Infection Diseases**, v 49, p365-371, 2009.
- ALIX, G. D.G.; CIZEAU, F.; AGATHINE, A.; DOMRANE, C.; DUCCELLIER, D.; FIIHMAN, V.; DECOUSSER, J-W. The contribution and limits of clinical specimens for the screening of intestinal multidrug-resistant bacteria in view of laboratory automation. **Journal of Hospital Infection**. DOI em: <<http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.jhin.2017.06.001>>, 2017.
- AL NAIEMI, N.; HEDDEMA, E. R.; BART, A.; JONGE, E.; VANDENBROUCKE-GRAULS, C. M.; SAVELKOUL, P. H. M.; DUIM, B. Emergence of multidrug-resistant Gram-negative bacteria during selective decontamination of the digestive tract on an intensive care unit. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 58, p 853-856, 2006.
- ANDRIATAHINA, T.; RANDRIANIRINA, F.; HARINIANA, E. R.; TALARMIN, A.; RAOBIJAONA, H.; BUISSON, Y.; RICHARD, V. High prevalence of fecal carriage of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in a pediatric unit in Madagascar. **BMC Infectious Diseases**, n. 10, v. 204, p1-8, 2010.



ANSSOUR, L.; MESSAI, Y.; DERKAOUI, M.; ALOUACHE, S.; ESTEPA, V.; SOMALO, S.; TORRES, C.; BAKOUR, R. ESBL, plasmidic AmpC, and associated quinolone resistance determinants in coliforms isolated from hospital effluent: first report of qnrB2, qnrB9, qnrB19, and blaCMY-4 in Algeria. **Journal of Chemotherapy**, n. 2, v. 26, p74-79,2014.

ARNOLD, R. S.; THOM, K. A.; SHARMA, S.; PHILLIPS, M.; JOHNSON, J. K.; MORGAN, D. J. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC)-Producing Bacteria. **South Med J**, n. 104, v. 1. p40–45, 2011.

ASLANTAS, O.; YILZMAN, E. S. Prevalence and molecular characterization of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) and plasmidic AmpC  $\beta$ -lactamase (pAmpC) producing *Escherichia coli* in dogs. **The Journal of Veterinary Medical Science**, n. 79, v. 6, p1024-1030, 2017.

BÄCKHED, F.; LEY, R. E.; SONNENBURG, J. L.; PETERSON, D. A.; GORDON, J. I. Host-Bacterial Mutualism in the Human Intestine. **SCIENCE**, v 307, p1915-1920, 2005.

BAEDE, V. O.; BROENS, E. M.; SPANINKS, M. P.; TIMMERMAN, A. J.; GRAVELAND, H.; WAGENAAR, J. A.; DUIM, B.; HORDIJK, J. Raw pet food as a risk factor for shedding of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in household cats. **PLoS ONE**, n. 12, v. 11, p1-11, 2017

BARDET, L.; LE PAGE, S.; LEANGAPICHART, T.; ROLAIN, J-M. LBJMR medium: a new polyvalent culture medium for isolating and selecting vancomycin and colistin-resistant bacteria. **BMC Microbiology**, n. 17, v. 220, p1-10, 2017.

BARRIOS, H.; GARZA-RAMOS, U.; MEJIA-MIRANDA, I.; REYNA-FLORES, F.; SÁNCHEZ-PÉREZ, A.; MOSQUEDA-GARCÍA, D.; SILVA-SANCHEZ, J. ESBL-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: The most prevalent clinical isolates obtained between 2005 and 2012 in Mexico. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v.10, p243–246, 2017.

BARTOSCH, S.; FITE, A.; MACFARLANE, G. T.; MCMURDO, M. E. T. Characterization of Bacterial Communities in Feces from Healthy Elderly Volunteers and Hospitalized Elderly Patients by Using Real-Time PCR and Effects of Antibiotic Treatment on the Fecal Microbiota. **Applied and Environmental Microbiology**, n. 6, v. 70, p3575–3581, 2004.

BEUKES, L. S.; L.B. KING, T. L. B.; SCHMIDT, S. Assessment of pit latrines in a peri-urban community in KwaZulu-Natal (South Africa) as a source of antibiotic resistant *E. coli* strains. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**. DOI em: <<http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.ijheh.2017.08.002>>.

BIRGAND, G.. ARMAND-LEFEVRE, L.; LOLOM, I.; RUPPE, E.; ANTOINE, A.; LUCET, J-C. Duration of colonization by extended-spectrum b-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* after hospital discharge. **American Journal of Infection Control**, v. 41, p443-447, 2013.

BOCANEGRA-IBARIAS, P.; GARZA-GONZAÁLEZ, E.; MORFÕÂN-OTERO, R.; BARRIOS, H.; VILLARREAL-TREVIÑO, L.; RODRÕÂGUEZ-NORIEGA, E.; GARZA-

RAMOS, U.; PETERSEN-MORFIN, S.; SILVA-SANCHEZ, J. Molecular and microbiological report of a hospital outbreak of NDM-1-carrying *Enterobacteriaceae* in Mexico. **PLoS ONE**, n. 12, v. 6, p1-14, 2017.

BRANDER, R. L.; WALSON, J. L.; JOHN-STEWART, G. C.; NAULIKHA, J. M.; NDONYE, J.; KIPKEMOI, N.; RWIG, D.; SINGA, B. O.; PAVLINA, P. B. Correlates of multi-drug non-susceptibility in enteric bacteria isolated from Kenyan children with acute diarrhea **PLoS Negl Trop Dis**, n. 11, v. 10, p1-18, 2017.

BRANDT, K.; TADDEI, C. R.; TAKAGI, E. H.; OLIVEIRA, F. F.; DUARTE, R. T. D.; IRINO, I.; MARTINEZ, M. B.; CARNEIRO-SAMPAIO, M. Establishment of the bacterial fecal community during the first month of life in Brazilian newborns. **CLINICS**, n. 67, v. 2, p113-123, 2012.

BRATU S.; LANDMAN, D.; HAAG, R.; RECCO, R.; ERAMO, A.; ALAM, M.; QUALE, J. Rapid Spread of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* in New York City: A New Threat to Our Antibiotic Armamentarium. **Arch Intern Med**, n. 165, p1430-1435, 2005. Disponível em: <http://www.archinternmed.com>

BROWN, K. D.; KULIS, J.; THOMSON, B.; CHAPMAN, T. H.; MAWHINNEY, D. B. Occurrence of antibiotics in hospital, residential and dairy effluent, municipal wastewater and 68 the Rio Grande in New Mexico. **Science of the Total Environment**, Albuquerque: v. 366, p. 772- 783, nov. 2006.

BUELOW, E.; BELLO GONZÁLEZ, T. D. J.; FUENTES, S.; PITERS, W. A. A. S.; LAHTI, L.; BAYJANOV, J. R. ELINE A. M. MAJOUR, E. A. M.; BRAAT, J. C.; VAN MOURIK, M. S. M.; OOSTDIJK, E. A. N.; WILLEMS, R. J. L.; BONTEN, M. J. M.; VAN PASSEL, M W. J.; SMIDT, H.; VAN SCHAİK, W. V. Comparative gut microbiota and resistome profiling of intensive care patients receiving selective digestive tract decontamination and healthy subjects. **Microbiome**, n. 5, v. 88, p1-10, 2017.

BUZON-DURAN, L.; CAPITA, R.; ALONSO-CALLEJA, C. Microbial loads and antibiotic resistance patterns of *Staphylococcus aureus* in different types of raw poultry-based meat preparations. **Poultry Science**, v. 96, p4046–4052, 2017.

BUSH, K.; FISHER, J. F. Epidemiological Expansion, Structural Studies, and Clinical Challenges of New  $\beta$ -Lactamases from Gram-Negative Bacteria. **Annual Reviews Microbiol.**, v. 65, p455-478, 2011.

CERQUETTI, M.; GARCÍA-FERNÁNDEZ, A.; GIUFRE, M. FORTINI, D.; ACCOGLI, M.; GRAZIANI, C.; LUZZI, I.; CAPRIOLI, A.; CARATTOLI, A. First Report of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Determinant qnrS1 in an *Escherichia coli* Strain of Animal Origin in Italy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 7, n. 53, p3112–3114, 2009.

CHERVET, D.; LORTHOLARY, O.; ZAHAR, J.-R.; DUFOUGERAY, A.; PILMIS, B.; PARTOUCHEHA, H. Antimicrobial resistance in community-acquired urinary tract infections in Paris in 2015. **Med Mal Infect**. DOI em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.medmal.2017.09.013>>, 2017.

CHMELNITSKY, I.; HERMESH, O.; NAVON-VENEZIA, S.; STRAHILEVITZ, J.; CARMELI, Y. Detection of aac(6')-Ib-cr in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates from Tel Aviv, Israel. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, n. 64, p718-722, 2009.

CHRISTOU, A.; AGÜERA, A.; BAYONA, J. M.; CYTRY, E.; FOTOPOULOS, V.; LAMBROPOULOU, D.; MANAIA, C. M.; MICHAEL, C.; REVITT, M.; SCHRÖDER, P.; FATTA-KASSINOS, D. The potential implications of reclaimed wastewater reuse for irrigation on the agricultural environment: The knowns and unknowns of the fate of antibiotics and antibiotic resistant bacteria and resistance genes - A review. **Water Research**, v. 123, p 448-467, 2017.

CLSI- Clinical Laboratories Standards Institute. Performance Standards for antimicrobial disk susceptibility tests. **Approved Standard CLSI Document M2**. Wayne, PA, EUA: Clinical Laboratories Standards Institute, 2017.

COUTINHO, F. H.; SILVEIRA, C. B.; PINTO, L. H.; SALLOTO, G. R. B.; CARDOSO, A. M.; MARTINS, O. B.; VIEIRA, R. P.; CLEMENTINO, M. M. Antibiotic resistance is widespread in urban aquatic environments of Rio de Janeiro, Brazil. **Microbiology of Aquatic Systems**, Rio de Janeiro: v. 68, p. 441-452, 2014

CRISTOVÃO, F.; ALONSO, C. A.; IGREJAS, G.; SOUSA, M.; SILVA, V.; PEREIRA, J. E.; LOZANO, C.; CORTÉS-CORTÉS, G.; TORRES, C.; POETA, P. Clonal diversity of extended-spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* isolates in fecal samples of wild animals. **FEMS Microbiology Letters**, v. 364, p1-6, 2017.

CUZON, G.; NAAS, T.; TRUONG, H.; VILLEGAS, M.; WISELL, K. T.; CARMELI, Y.; GALES, A. C.; NAVON-VENEZIA, S.; QUINN, J. P.; NORDMANN, P. Worldwide Diversity of *Klebsiella pneumoniae* That Produces  $\beta$ -Lactamase blaKPC-2 Gene1. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 9, p1349-1356, 2010.

DAVIS, M. A.; BESSER, T. E.; ORFE, L. H.; BAKER, K. N. K.; LANIER, A. S.; BROCHAT, S. L. Genotypic-Phenotypic Discrepancies between Antibiotic Resistance Characteristics of *Escherichia coli* Isolates from Calves in Management Settings with High and Low Antibiotic Use. **Appl Environ Microbiol**, n. 77, v. 10, p3293-3299, 2011.

DEMIR, T.; BUYUKGUCLUC, T. Fosfomicin: In vitro efficacy against multidrug-resistant isolates beyond urinary isolates. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, n. 8, p164-168, 2017.

DI LUCA, M.; NAVARI, E.; ESIN, S.; MENICHINI, M.; BARNINI, S.; TRAMPUZ, A.; CASANI, A.; BATONI, G. Detection of Biofilms in Biopsies from Chronic Rhinosinusitis Patients: In Vitro Biofilm Forming Ability and Antimicrobial Susceptibility Testing in Biofilm Mode of Growth of Isolated Bacteria. **Adv Exp Med Biol**. DOI em: <[http://dx.doi.org/10.1007/5584\\_2017\\_34](http://dx.doi.org/10.1007/5584_2017_34)>, 2017.

DIENTSMAN, R.; PICOLI, S. U.; MEYER, G.; SCHENKEL, T.; STEYER, J. Avaliação fenotípica da enzima *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) em Enterobacteriaceae de ambiente hospitalar. **J Bras Patol Med Lab**, n. 46, v. 1, p23-27, 2010.

DIWAN, V.; TAMHANKAR, A. J.; KHANDAL, R. K.; SEN, S.; AGGARWAL, M.; MAROHI, Y.; IYER, R. V.; SUNDBLAD-TONDESKI, K.; STÅLSBY-LUNDBORG, C.

Antibiotics and antibiotic-resistant bacteria in waters associated with a hospital in Ujjain, India. **BMC Public Health**, v.10, n.414, 2010.

DONSKEY, C. J. Antibiotic Regimens and Intestinal Colonization with Antibiotic-Resistant Gram-Negative Bacilli. **Clinical Infectious Diseases**, n. 43, pS62–S69, 2006.

EL-BADAWY, M. F.; TAWAKOL, W.M.; EL-FAR, S. W.; MAGHRABI, I. A.; AL-GHAMDI, S. A.; MANSY, M. S.; ASHOUR, M. S.; SHOHAYEB, M. M. Molecular Identification of Aminoglycoside-Modifying Enzymes and Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Genes among *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates Recovered from Egyptian Patients. **Hindawi International Journal of Microbiology**, v. 2017, p1-12, 2017.

EUCAST – European Committee on Antimicrobial Susceptibility Tests. Clinical Breakpoints 2018. Acesso em: <[http://www.eucast.org/clinical\\_breakpoints/](http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/)>. Acessado em: janeiro, 2018.

GALASSUS, A. G.; CIZEAU, F.; AGATHINE, A.; DOMRANE, C.; DUCCELLIER, D.; FIIHMAN, V.; DECOUSSER, J-W. Contribution and limits of clinical specimens for the screening of intestinal multi-drug-resistant bacteria in view of laboratory automation. *Journal of Hospital Infection*, v.97, p59-63, 2017.

GALDEANO, M.; LEBLANC, A. M.; VINDEROLA, G.; BONET, M. E. B.; PERDIGÓN, G. Proposed Model: Mechanisms of Immunomodulation Induced by Probiotic Bacteria. **Clinical and Vaccine Immunology**, n. 5, v. 14, p485-494, 2007.

GASSAMA-SOW, A.; DIALLO, M. H.; WANE, A. A.; SECK, A.; SAMB-BA, B.; SOW, P. S. AI'DARA-KANE, A. Genetic Determinants of Antibiotic Resistance in Diarrheagenic *Klebsiella pneumoniae* Subspecies *ozaenae*: An Emerging Enteropathogen in Senegal. **Clinical Infectious Diseases**, n. 50, p453–455, 2010.

GIANI, T.; PECILE, P.; BORGIANNI, L. NICOLETTI, P.; TONELLI, F.; BARTOLONI, A.; ROSSOLINI, G. M. Emergence in Italy of *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 258 Producing KPC-3 Carbapenemase. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 11, p. 3793–3794, 2009.

GIEDRAITIENĖ, A.; VITKAUSKIENĖ, A.; NAGINIENĖ, R.; PAVILONIS, A. Antibiotic Resistance Mechanisms of Clinically Important Bacteria. **Medicina (Kaunas)**, n.47, v.3, p137-146, 2011.

GUENTHER, S.; EWERS, C.; WIELER, L.H. Extended-spectrum beta-lactamases producing *E.coli* in wildlife, yet another form of environmental pollution? **Frontiers in Microbiology – Antimicrobials, Resistance and Chemotherapy**, v. 2, p1-13, 2011.

GUET-REVILLET, H.; LE MONNIER, A.; BRETON, N.; DESCAMPS, P.; LECUYER, H.; ALAABOUCHE, I.; BUREAU, C.; NASSIF, X.; ZAHAR, J-R. Environmental contamination with extended-spectrum b-lactamases: Is there any difference between *Escherichia coli* and *Klebsiella spp*? **American Journal of Infection Control**, v. 40, p845-848, 2012.

HANEMAAIJER, N. M.; NIJHUIS, R. H. T.; SLOTBOOM, B. J.; MASCINI, E. M.; VAN ZWET, A.A. New screening method to detect carriage of carbapenemase-producing

Enterobacteriaceae in patients within 24 hours. **Journal of Hospital Infection**, v.87, p47-49, 2014.

HARADA, K.; MORIMOTO, E.; KATAOKA, Y.; TAKAHASHI, T. Clonal spread of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* isolates among pups in two kennels. **Acta Veterinaria Scandinavica**, n. 53, p11-17, fevereiro, 2011.

HASHEMIZADEH, Z.; KALANTAR-NEYESTANAKI, D.; MANSOURI, S. Association between virulence profile, biofilm formation and phylogenetic groups of *Escherichia coli* causing urinary tract infection and the commensal gut microbiota: A comparative analysis. **Microbial Pathogenesis**, v. 110, p540-545, 2017.

HAWKEY, P. M.; JONES, A. M. The changing epidemiology of resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, n. 64, Suppl 1, pI3-I10, 2009.

HIRISH, E. B.; TAM, V. H.; Detection and treatment options for klebsiella pneumoniae carbapenemases (KPCs): an emerging cause of multidrug-resistant infection. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Huston: p. 1119- 1125. 2010.

ISENDAHL, J.; TURLEJ-ROGACKA, A.; MANJUBA, C.; RODRIGUES, A.; GISKE, C. G.; NAUCLÉR, P. Fecal Carriage of ESBL-Producing *E. coli* and *K. pneumoniae* in Children in Guinea-Bissau: A Hospital Based Cross-Sectional Study. **PLoS ONE**, n. 7, v. 12, p1-8, 2012.

JEONG, H. S.; BAE, I. K.; SHIN, J. H.; JUNG, H. J.; KIM, S. H.; LEE, J. Y.; OH, S. H.; KIM, H. R.; CHANG, C. L.; KHO, W-G.; LEE, J. N. Prevalence of Plasmid-mediated Quinolone Resistance and Its Association with Extended-spectrum Beta-lactamase and AmpC Beta-lactamase in Enterobacteriaceae. **Korean J Lab Med**, n. 31, p257-264, 2011.

KADO, C. I.; LIU, S. T. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. **J Bacteriol**, v. 3, n.145, p1365- 1373, 1981.

KENNEDY, N. A.; WALKER, A. W.; BERRY, S. H.; DUNCAN, S. H.; FARQUARSON, F. M.; LOUIS, P.; THOMSON, J. M.; SATSANGI, J.; FLINT, H. J.; PARKHILL, J.; LEES, C. W.; HOLD, G. L. The Impact of Different DNA Extraction Kits and Laboratories upon the Assessment of Human Gut Microbiota Composition by 16S rRNA Gene Sequencing. **PLoS ONE**, n. 9, v. 2, p1-9, 2014.

KIM, Y. T.; JANG, J. H.; KIM, H. C.; KIM, H.; LEE, K. R.; PARK, K. S.; LEE, H. J.; KIM, Y. J. Identification of strain harboring both *aac(6')-Ib* and *aac(6')-Ib-cr* variant simultaneously in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. **BMB Reports**, Seoul: p. 262 – 267, jan. 2011.

KIM, J.; LEE, J. Y.; KIM, S. I.; SONG, W.; KIM, J.; JUNG, S.; YU, J. K.; PARK, K. G.; PARK, Y. Rates of Fecal Transmission of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing and Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Among Patients in Intensive Care Units in Korea. **Ann Lab Med**, n. 34, p20-25, 2014.

KO, Y. J.; MOON, H. -W.; M. HUR, M.; PARK, C.-M; CHO, S. E.; YUN, Y.-M. Fecal carriage of extended-spectrum b-lactamase-producing Enterobacteriaceae in Korean community and hospital settings. **Infection**, v. 41, p9-13, 2013.

KOCZURA, R.; MOKRACKA, J.; JABLONSKA, L.; GOZDECKA, E.; KUBEK, M.; KAZNOWSKI, A. Antimicrobial resistance of integron-harboring *Escherichia coli* isolates from clinical samples, wastewater treatment plant and river water. **Science of the Total Environment**, n. 414, p680–685, 2012.

LAI, C. C.; WANG, C. Y.; CHU, C. C.; TAN, C. K.; LU, C. L.; LEE, Y. C.; HUANG, Y. T.; LEE, P. I.; HSUEH, P. R. Correlation between antibiotic consumption and resistance of Gram-negative bacteria causing healthcare-associated infections at a university hospital in Taiwan from 2000 to 2009. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.66, p1374–1382, 2011.

LEAVITT, A.; CARMELI, Y.; CHMELNITSKY, I.; GOREN, M. G.; OFEK, I.; NAVON- VENEZIA, S. Molecular Epidemiology, Sequence Types, and Plasmid Analyses of KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae* Strains in Israel. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 7, p3002-3006, 2010.

LEE, C-H.; SU, L-H.; TANG, Y-F.; LIU, J-W. Treatment of ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* bacteraemia with carbapenems or flomoxef: a retrospective study and laboratory analysis of the isolates. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.58, p1074-1077, 2006.

LÉTOFFÉ, S.; CHALABAEV, S.; DUGAY, HJ.; STRESSMANN, F.; AUDRAIN, B.; PORTAIS, J-C.; LETISSE, F.; GHIGO, J-M. Biofilm microenvironment induces a widespread adaptive amino-acid fermentation pathway conferring strong fitness advantage in *Escherichia coli*. **PLoS Genet**, v. 13, n.5, 2017.

LIN, Y-T.; SIU, L. K.; LIN, J-C.; CHEN, T-L.; TSENG, C-P.; YEH, K-M.; CHANG, F-Y.; FUNG, C-P. Seroepidemiology of *Klebsiella pneumoniae* colonizing the intestinal tract of healthy Chinese and overseas chinese adults in Asian countries. **BMC Microbiology**, v. 12, n. 13, p1-7, 2012.

LONCHEL, C. M.; MELIN, P.; GANGOUÉ-PIÉBOJI, J.; ASSOUMOU, M. C. O.; BOREUX, R.; DE MOL, P. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae in Cameroonian hospitals. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, n. 32, p79–87, 2013.

LÓPEZ-DIAZ, M. D. C.; CULEBRAS, E.; RODRÍGUEZ-AVIAL, I.; RIOS, E.; VIÑUELA-PRIETO, J. M.; PICAZO, J. J. RODRÍGUEZ-AVIAL, C. Plazomicin Activity against 346 Extended-Spectrum-  $\beta$ -Lactamase/AmpCProducing *Escherichia coli* Urinary Isolates in Relation to Aminoglycoside-Modifying Enzymes. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 61, 2017.

MA, L.; LIN, C.; CHEN, J.; FUNG, C.; CHANG, F.; LAI, Y.; LIN, J.; SIU, L. K. Widespread Dissemination of Aminoglycoside Resistance Genes *armA* and *rmtB* in *Klebsiella pneumoniae* Isolates in Taiwan Producing CTX-M-Type Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 1, n. 53, p104-111, 2009.

MAGIORAKOS, A. P.; SRINIVASAN, A.; CAREY, R. B.; CARMELI, Y.; FALAGAS, M. E.; GISKE, G. C.; HARBARTH, S.; HINDLER, J. F.; KAHLMETER, G.; OLSSON-LILJEQUIST, B.; PATERSON, D. L.; RICE, L. B.; STELLING, J.; STRUELENS, M. J.; VATOPOULOS, A.; WEBER, J. T.; MONNET, D. L. Multidrug-resistant, extensively drug-

resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance **Clin. Microb. Infect.**, v. 18, p268–281, 2012.

MARTINS, A. F.; BAIL, L.; ITO, C. A. S.; NOGUEIRA, K. S.; DALMOLIN, T. V.; MARTINS, A. S.; ROCHA, J. L. L.; SERIO, A. W.; TUON, F. F. Antimicrobial activity of plazomicin against *Enterobacteriaceae* producing carbapenemases from 50 Brazilian medical centers. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. DOI em: <<https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2017.11.004>>, 2017.

MATIJASIC, B. B.; OBERMAJER, T.; LIPOGLAVSEK, L.; GRABNAR, I.; AVGUSTIN, G.; ROGELJ, I. Association of dietary type with fecal microbiota in vegetarians and omnivores in Slovenia. **Eur J Nutr**, p1-14, 2013.

MELO, S. A. C.; CASTRO, E. A. R.; PEREIRA, J. A. A.; SUASSUNA, I. Use of a selective médium with potassium tellurite to follow intestinal colonization of hospitalized patients by drug-resistant *Enterobacteriaceae*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, n. 1, v. 8, p135-140, 1993.

MEIRELLES-PEREIRA, F. de; PEREIRA, A. M. S.; SILVA, M. C. G.; GONÇALVES, V. D.; BRUM, P. R.; CASTRO, E. A. R.; PEREIRA, J. A. A. Ecological aspects of the antimicrobial resistance in bactérias of importance to human infections. **Brazilian Journal of Microbiology**, Rio de janeiro: v.33, p. 287-293, sep. 2002.

MERRIT, J. H.; KADOURI, D. E.; O'TOOLE, G. A. Growing and Analyzing Static Biofilms **Curr Protoc Microbiol**. DOI em: <<https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc01b01s00>>, 2005

MINGEOT-LECLERCQ, M-P.; GLUPCZYNSKI, Y.; TULKENS, P. M. Aminoglycosides: Activity and Resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, n. 4, p727–737, abril, 1999.

MOLES, L.; GÓMEZ, M.; HEILIG, H.; BUSTOS, G.; FUENTES, S.; DE VOS, W.; FERNÁNDEZ, L.; RODRÍGUEZ, J. M.; JIMÉNEZ, E. Bacterial Diversity in Meconium of Preterm Neonates and Evolution of Their Fecal Microbiota during the First Month of Life. **PLoS ONE**, n. 8, v. 6, p1-13, 2013.

MOUMOUNI, A.; DIAGBOUGA, S.; NADEMBÈGA, C.; DABIRÉ, A. M.; SALAH, F.; OBIRI-YEBOAH, D.; SOUBÉIGA, S. T.; OUATTARA, A. K.; ZOHONCONI, T.; DJIGMA, F.; LANGENDORF, C.; JACQUES SIMPORÉ, J. Quinolone Resistance (qnr) genes in Fecal Carriage of Extended Spectrum beta-Lactamases producing *Enterobacteria* isolated from Children in Niger. **Current Research in Microbiology and Biotechnology**, v.5, n.1, p953-957, 2017.

MULKI, S. S.; RAMAMURTHY, K.; BHAT, S. Fecal Carriage of Extended-spectrum Beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Intensive Care Unit Patients. **Indian J Crit Care Med.**, v. 21, n.8, p525-527, 2017.

MUGGEO, A.; GUILLARD, T.; KLEIN, F.; REFFUVEILLE, F.; CAROLINE FRANCOIS, C.; BABOSAN, A.; BAJOLET, O.; BERTRAND, X.; DE CHAMPS, C. Spread of *Klebsiella pneumoniae* ST395 non-susceptible to carbapenems and resistant to fluoroquinolones in North-Eastern France. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**. DOI em: <<https://doi.org/10.1016/j.jgar.2017.10.023>>, 2017.

NOGUEIRA, B. A.; OLIVELLA, J. G. B.; GIL, A. C.; MEIRELLES-PEREIRA, F.; GONÇALVES, V. D.; ANDRADE, A. F. B.; BELLO, A. R.; PEREIRA, J. A. A. Detecção de cepas bacterianas no ecossistema aquático no entorno da Lagoa de Saquarema – Rio de Janeiro. *Rev. Ciênc. Méd. Biol.*, Salvador, v. 14, n. 2, p. 147-152, 2015.

NORDMANN, P.; POIREL, L. Emergence of plasmid-mediated resistance to quinolones in Enterobacteriaceae. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. London: v. 56, n. 3, p. 463-469, jul. 2005

NÜESCH-INDERBINEN, M. T.; ABGOTTSPON, H.; ZURFLUH, K.; NÜESCH, H. J.; STEPHAN, R.; HÄCHLER, H. Cross-Sectional Study on Fecal Carriage Of Enterobacteriaceae with Resistance to Extended-Spectrum Cephalosporins in Primary Care Patients. *Microbial Drug Resistance*, n. 5, v. 19, p362-369, 2013.

NWOSU, I. L.; AMADI, E. S.; NWANYANWU, C.E.; CHIKWENDU, C. I.; MADU, C. L. The prevalence of extended spectrum beta-lactamases (ESBLs) among *Escherichia coli* and *Klebsiella* species urinary isolates from Abia state university teaching hospital (ABSUTH) Aba, Abia State Nigeria. *International Journal of Microbiology and Mycology*, v. 2, n.3, p20-28, 2014.

OBERLÉ, K.; CAPDEVILLE, M.; BERTHE, T.; BUDZINSKI, H.; PETIT, F. Evidence for a Complex Relationship between Antibiotics and Antibiotic-Resistant *Escherichia Coli*: From Medical Center Patients to a Receiving Environment. *Environ. Sci. Technol.*, n. 46, p1859–1868, 2012.

ÖKTEM, I. M. A.; GÜLAY, Z.; MERAL, B.; DENIZ, G. Project Study Group. qnrA Prevalence in extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-positive enterobacteriaceae isolates from Turkey. *Jpn J Infect Disease*, n. 61, p13-17, 2008.

PARK, J. J.; SEO, Y. B.; LEE, J. Antimicrobial Susceptibilities of *Enterobacteriaceae* in Community-Acquired Urinary Tract Infections during a 5-year Period: A Single Hospital Study in Korea. *Infect Chemother*, v.49, n. 3, p184-193, 2017.

PATERSON, D. L.; BONOMO, R. A. Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases: a Clinical Update. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 18, n. 4, p657–686, 2005.

PERRON, G. G; BELL, G; QUESSY, S. Parallel evolution of multidrug-resistance in *Salmonella enterica* isolated from swine. *FEMS Microbiology Letter*, v. 281, p 17-22, 2008.

PITOUT, J. D. D.; HOSSAIN, A.; HANSON, N. D. Phenotypic and molecular detection of CTX-M beta-lactamases produced by *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. *Journal of Clinical Microbiology*, Alberta: v. 42, n. 12, p. 5715-5721, dec. 2004.

RAJILIC-STOKANOVIC, M.; BIAGI, E.; HEILIG, H. G. H. J.; KAJANDER, K.; KEKKONEN, R. A.; TIMS, S.; DE VOS, W. M. Global and Deep Molecular Analysis of Microbiota Signatures in Fecal Samples From Patients With Irritable Bowel Syndrome. *GASTROENTEROLOGY*, n. 141, p1792–1801, 2011.

RAMIREZ, M. S.; TOLMASKY, M. E. Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resistance Updates*, v. 13, p151-171, 2010.



RAY, C.; SHENOY, A. T.; ORIHUELA, C. J.; GONZALEZ- JUARBE, N. Killing of *Serratia marcescens* biofilms with chloramphenicol. **Ann Clin Microbiol Antimicrob**, v. 16, n. 19, 2017.

RODRIGUEZ-MOZAZ, S.; CHAMORRO, S.; MARTI, E.; HUERTA, B.; GROS, M.; SANCHEZ-MELSIÓ, A.; BORREGO, C. M.; BARCELÓ, D.; BALCÁZAR, J. L. Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in hospital and urban wastewater and their impact in the receiving river. **Science Direct**, Girona: v. 69, p. 234-242, nov. 2015.

SABTCHEVA, S. High prevalence of the *aac(6')-Ib-cr* gene and its dissemination among *Enterobacteriaceae* isolates by CTX-M-15 plasmids in Bulgaria. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Bulgaria: v. 53, n. 1, p. 335-336, jan. 2009.

SCHIEBEL, J.; BOHM, A.; NITSCHKE, J.; BURDUKIEWICZ, M.; WEINREICH, J.; ALI, A.; ROGGENBUCK, D. RODIGER, S.; SCHIERACK, P. Genotypic 1 and phenotypic characteristics in association with biofilm formation in 2 different pathotypes of human clinical *Escherichia coli* isolates. **Appl. Environ. Microbiol.** DOI em: <10.1128/AEM.01660-17>, 2017.

SHARIR, R.; TEITLER, N.; LAVI, I.; RAZ, R. High-level handwashing compliance in a community teaching hospital: a challenge that can be met! **J Hospl Infect**, n. 49, p55-58, 2001.

STALDER, G. L.; LONCARIC, I.; WALZER, C. Diversity of enterobacteria including  $\beta$ -lactamase producing isolates associated with the Spanish slug (*Arion vulgaris*). **Science of the Total Environment**, n. 479–480, p11–16, 2014.

SWIERCZEWSKI, B. E.; ODUNDO, E. A.; KOECH, M. C.; NDONYE, J. N.; KIRERA, R. K.; ODHIAMBO, C. P.; CHERUIYOT, E. K; WU, M. T.; LEE, J. E.; ZHANG, C.; OAKS, E. V. Surveillance for enteric pathogens in a case-control study of acute diarrhea in Western Kenya. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, n. 107, p83–90, 2013.

TAMURA, M.; HOSHI, C.; KOBORI, M.; TAKAHASHI, S.; TOMITA, J.; NISHIMURA, M. NISHIHARA, J. Quercetin metabolism by fecal microbiota from healthy elderly human subjects. **PLoS ONE**, v.12, n.11, 2017.

TIIHONEN, K. T.; OUWEHAND, A. C.; RAUTONEN, N. Effect of overweight on gastrointestinal microbiology and immunology: correlation with blood biomarkers. **British Journal of Nutrition**, n. 103, p1070–1078, 2010.

TZOC, E. ARIAS, M. L. VALIENTE, C. Efecto de las aguas residuales hospitalares sobre los patrones de resistencia a antibióticos de *Escherichia coli* y *Aeromonas sp.* **Revista Biomédica, Tres Rios**: v. 15, n. 3, p. 165-172, 2004.

UZUNOVIĆ, S.; IBRAHIMAGIĆ, A.; BEDENIĆ, B. Antibiotic resistance in *Enterobacter cloacae* strains with derepressed/partially derepressed/inducible AmpC and extended-spectrum beta-lactamases in Zenica-Doboj Canton, Bosnia and Herzegovina. **Med Glas (Zenica)** , v.15, n.1, 2018.

VAIDYA, V. K. Horizontal transfer of antimicrobial resistance by extended spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae. **Journal of laboratory Physicians**, n. 3, p37-42, 2011.

VAN HOEK, A. H. A. M.; SCHOOLS, L.; VAN SANTEN, M. G.; FLORIJN, A.; GREEFF, S. C.; VAN DUIJKEREN, E. Molecular characteristics of Extended-Spectrum cephalosporin-resistant Enterobacteriaceae from humans in the community. *Plosone*, Bilthoven: p. 1- 12, jun. 2015b

VASQUES, M. R. G.; BELLO, A. R.; LAMAS, C. C.; CORREA, J.; PEREIRA, J. A. A.  $\beta$ -lactamase producing enterobacteria isolated from surveillance swabs of patients in a Cardiac Intensive Care Unit in Rio de Janeiro, Brazil. **Braz J Infect Dis**, n. 15, v. 1, p28-33, 2011.

VIEIRA, L. A.; CASTRO, E. A. R.; DUARTE, J. L. B.; PINHEIRO, S. R.; SUASSUNA, I.; PEREIRA, J. A. A. Newborn intestinal colonization by multidrug resistant enterobacteria in a neonatal unit. **Jornal de Pediatria**, n. 2, v. 75, 1999

WINTER, J. S.; SANTOS, R. P.; AZAMBUJA, A. Z.; CECHINEL, A. B.; GOLDANI, L. Z. Microbiologic isolates and risk factors associated with antimicrobial resistance in patients admitted to the intensive care unit in a tertiary care hospital. **American Journal of Infection Control**, n. 41, p846-848, 2013.

WENER, K. M.; SCHECHNER, V.; GOLD, H. S.; WRIGHT, S. B.; CARMELI, Y. Treatment with Fluoroquinolones or with  $\beta$ -Lactam- $\beta$ -Lactamase Inhibitor Combinations Is a Risk Factor for Isolation of Extended-Spectrum- $\beta$  Lactamase-Producing *Klebsiella* Species in Hospitalized Patients. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, n. 54, v. 5, p2010–2016, 2010.

WEI, X.; YAN, X.; ZOU, D.; YANG, Z.; WANG, X.; LIU, W.; WANG, S.; LI, X.; HAN, J.; HUANG, L.; YUAN, J. Abnormal fecal microbiota community and functions in patients with hepatitis B liver cirrhosis as revealed by a metagenomic approach. **BMC Gastroenterology**, n.13, v. 175, p1-8, 2013.

WORLD Health Organization. Disponível em: <  
<http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/amr-report/en/>>. Acesso em: novembro, 2017.

WISPLINGHOFF, H.; BISCHOFF, T.; TALLENT, S. M.; SEIFERT, H.; WENZEL, R. P.; EDMOND, M. B. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: Analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. **Oxford Journals**, Richmond: v. 39, p. 309-317, aug. 2004.

WINN, W.; ALLEN, S. JANDA, W.; KONEMAN, E.; GARY, P. SCRECKENBERG, P.; WOODS, G. **Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology**. Philadelphia, New York: Lippincott Williams & Wilkins, 2006.

**APÊNDICE A – Questionário para triagem de pacientes**

**Questionário:**

Nome: \_\_\_\_\_

Sexo: ( ) F ( ) M Matrícula: \_\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Clinica: ( ) Ambulatório ( ) Enfermaria Qual? \_\_\_\_\_

Data da coleta das fezes: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Data de internação: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Tempo de internação: \_\_\_\_\_

Causa de internação \_\_\_\_\_

Antibióticos (nos últimos 6 meses)?

( ) Uso, qual? Quando? Por quanto tempo? \_\_\_\_\_

( ) Não uso ( ) Não informado

Internação nos últimos 6 meses? Onde? Quando? Por quanto tempo? Houve infecção?

Coleta de material? Resistência? \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Observações:

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

APÊNDICE B – Artigo publicado – Detecção de cepas bacterianas no ecossistema no entorno da Lagoa de Saquarema

ARTIGO ORIGINAL

ISSN 1677-5080

© 2015 Revista de Ciências Médicas e Biológicas

*Detection of bacterial samples on the aquatic ecosystems adjacent to Saquarema Lagoon – Rio de Janeiro*

Detecção de cepas bacterianas no ecossistema aquático no entorno da Lagoa de Saquarema – Rio de Janeiro

Barbara Araujo Nogueira<sup>1</sup>, Juliana Giordano Botelho Oliveira<sup>2</sup>, Adriana Costa Gil<sup>3</sup>, Frederico Metreilles-Pereira<sup>4</sup>, Verônica Dias Gonçalves<sup>5</sup>, Arnaldo Feltosa Braga de Andrade<sup>6</sup>, Alexandre Ribeiro Bello<sup>7</sup>, José Augusto Adler Pereira<sup>8</sup>

<sup>1,2</sup>Bacharel em Ciências Biológicas pela Universidade Gama Filho. Mestranda pelo Programa de Pós Graduação em Ciências Médicas da FCM/UERJ; <sup>3</sup>Acadêmica de Enfermagem pela Universidade do Estado do Rio de Janeiro; <sup>4</sup>Doutor pelo Programa de Pós Graduação em Ecologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro.FPGZ/UFRJ; <sup>5</sup>Doutora em Microbiologia pela Universidade do Estado do Rio de Janeiro. UERJ; <sup>6</sup>Doutor em Ciências (microbiologia) pela Universidade Federal do Rio de Janeiro. UFRJ. Pós-doutor em Imunologia pela Tufts University, Boston, Professor associado e procleritara da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. UERJ; <sup>7</sup>Doutor em Ciências Biológicas (Biotécia) pela Universidade Federal do Rio de Janeiro. UFRJ, Professor Associado da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. UERJ. <sup>8</sup>Doutor em Ciências (Microbiologia) pela Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil (2090). Professor Associado da Universidade do estado do Rio de Janeiro

**Abstract**

**Introduction:** Saquarema Lagoon (RJ) has a high ecological and economic value owing to its multiple uses. The population's constant growth increases the amount of sewage containing bacteria and antimicrobial drugs that are discharged to the environment. **Objectives:** to detect Gram negative bacilli able to colonize or infect humans and animals and determine their antimicrobial resistance profiles. **Methodology:** samples were collected in the city centre in April 2010 and at Jacaré (Lagoon's east preserved site) in February 2011. The total and thermo tolerant coliforms were determined and the isolation of samples was made using agar media containing 32 µg/ml of cephalotin. All samples were tested for antimicrobial susceptibility (AST) and on 16 samples, plasmid DNA was extracted. **Results:** different Gram negative bacteria were detected, such as: *Enterobacter* spp, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*. The coliform results showed that the water quality is proper for human recreation. AST results demonstrated the existence of bacteria resistant to antimicrobial drugs frequently used in the community. It was possible to detect high molecular weight plasmids and nine samples (56,25%) showed at least one plasmid DNA electrophoretic band. **Conclusions:** there were not detected resistant samples to antimicrobial drugs normally used in hospital settings, which may possibly refute the idea of a contamination by nosocomial and/or veterinary sewage discharge.

**Keywords:** Gram negative bacilli, Enterobacteriaceae, Multidrug-resistance, Aquatic environment, Plasmid DNA.

**Resumo**

**Introdução:** a Lagoa de Saquarema (RJ) tem elevado significado econômico e ecológico devido aos seus múltiplos usos. O crescimento demográfico favorece o lançamento de efluentes contendo microrganismos e antimicrobianos, capazes de contaminar esse ambiente. **Objetivos:** procurar-se detectar a presença de bacilos Gram-negativos com potenciais de colonização/infecção humana e animal e analisar sua resistência a antimicrobianos. **Metodologia:** as coletas foram realizadas em Abril de 2010, no centro da cidade e, em Fevereiro de 2011, em Jacaré, parte mais preservada da Lagoa. Foram realizadas testes de colimetria para detecção de coliformos. Para o isolamento das cepas, empregaram-se meios de cultura sem antimicrobianos e contendo 32 µg/ml de cefalotina. As cepas foram submetidas a testes de susceptibilidade a antimicrobianos (TSA) e em 16 cepas foram realizadas a extrações de DNA plasmidial. **Resultados:** foram identificadas diferentes espécies de bacilos Gram-negativos, em especial *Enterobacter* spp, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*. Os níveis de coliformos indicam que a qualidade da água na Lagoa é satisfatória para recreação. Os resultados demonstraram a existência de bactérias resistentes a antimicrobianos de uso frequente no ambiente comunitário. Foi detectada a presença de plasmídeos de alto peso molecular e nove cepas (56,25%) apresentaram pelo menos uma banda de DNA plasmidial. **Conclusões:** não foram detectadas cepas resistentes a antimicrobianos utilizados no meio hospitalar, podendo indicar ausência de contaminação por egoto de origem nosocomial e/ou veterinária.

**Palavras-chave:** Bacilos Gram-negativos, Enterobacteriaceae, Multiresistência, Ecossistema aquático, DNA – plasmídeo.

Correspondente/Corresponding: \*Verônica Dias Gonçalves, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Faculdade de Ciências Médicas, DMBF/FCM/UERJ, Av. Professor Manoel de Abreu, 664/3ª andar, CEP: 20550-170, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. E-mail: kdias@bol.com.br. Telefones: +55 (21) 2668-8280. Fax: +55 (21) 2668-8276.

**INTRODUCTION**

The demographical growth and industry settlement around coastal lagoons increased the discharge of organic and chemical effluents in these lagoons with the outcome

being a modification and degradation of the autochthon microflora. This increase of discharged effluents can also increase the number of Gram-negative bacilli existent in the aquatic environment which eventually will cause eutrophication (IBEKWE; MURINDA; GRAVES, 2011; BAYRAM et al., 2012; DERRIEN et al., 2012).

The discharge of waste containing antimicrobial drugs may generate a selective pressure favoring the growth of an antimicrobial resistant population (GONÇALVES et al., 2014). According to Harnisz (2012) the antimicrobial resistance has become in the last two decades, a fast growing and out of control issue around the world. The acquired resistance to antimicrobial drugs on naturally resistant strains has begun from natural selection and exposure to some antimicrobial drugs. Naturally occurring events, such as, mutations, gene transfer and genetic recombination can also contribute to the acquisition of antimicrobial resistant traits (KORZENIEWSKA; HARNISZ, 2013; ZHANG et al., 2012a; ZHANG et al., 2012b).

The main resistance mechanisms found in Gram negative bacilli include: modifying the antimicrobials target sites; production of inactivation enzymes, such as, Beta-lactams and aminoglycosides modifying enzymes; efflux pumps and modification of external membrane proteins associated to the antimicrobial permeability. Bacilli Gram negative can become resistant to several antimicrobial classes which may enable them to spread and colonize different hosts and environments in an easier manner (GIEDRAITIENE, 2011).

Studies by Gonçalves et al. (2014), it was possible to detect the presence of coliforms presenting antimicrobial resistance markers in water samples of Guanabara Bay, may be related to species from the hospital sewage.

The aquatic ecosystem of Saquarema may, in previous years, have untreated sewage discharges, currently there is a construction project taking place so that the sewage can be treated before discharging them into the ecosystem. The water in those ecosystems are used to supply the population commercialization uses, recreation, fishing and seafood aquaculture.

In the present study, the aim was to identify bacterial samples in water samples, collected at different sites around the Saquarema lagoon, to perceive a possible ecological degradation by the presence of multidrug resistant bacteria and thermo tolerant coliforms due to sewage discharge containing antimicrobial residues.

#### METODOLOGIA

**Study area** – Samples were collected in April 2010 and in February 2011 at different sites around Saquarema lagoon (State of Rio de Janeiro, Brazil). In April 2010 the samples were collected from three sites: close to Saquarema city centre; at the Barra Franca waterway (connects the lagoon to the sea) and in front of the fishermen reside. In February the samples were collected at three sites (Jacaré I, II and III) on the Jacaré Borough.

**Colimetric tests** – Serial dilutions were used according to Standard... (2014), in order to determine the presence of total and thermo tolerant coliforms. Positive tubes, showing turbidity and gas production, were streaked onto Methylene Blue Agar (EMB) agar plates to isolate *Escherichia coli*. The growth on the different broths (Lactose, Brilliant Green and EC) was interpreted using the McGrady table.

**Isolation and identification of the strains** – For each water samples from each site, it was inoculated two bottles of 100ml Brain Heart Infusion (BHI) Broth with double concentration. In only one bottle it was added 32 mg/ml of Cephalotin. The agar media Cystine Lactose Electrolyte Deficient – CLED was used, with and without antimicrobial drugs, to select the samples to be used for the study and the identification was performed according to Murray et al. (2007) where it was evaluated: motility, production of  $H_2S$  and indole, fermentation of glucose and lactose, urea production, use citrate as a carbon source, lysine and ornithine decarboxylation, arginine dehydrolysis, red methyl and voges-proskauer tests.

**Antimicrobial Susceptibility Testing** – The resistance profiles of the different strains was carried out through agar diffusion method, according to Clinical Laboratories Standards Institute – CLSI (PERFORMANCE..., 2012). It is important to emphasize that, although belonging to the same antibiotic class, they are from different generations once that the first and second generation of antimicrobials has been widely used both in community and hospital environment and can be found in large-scale on the environment. *Escherichia coli* sample ATCC 25922 was used as control. The following antimicrobial agents were used with their respective potencies: Cephalothin (CPH – 30µg), Cephazolin (CFZ – 30µg), Cefoxitin (FOX – 30µg), Cefuroxime (CRX – 30µg), Cefotaxime (CTX – 30µg), Ceftriaxone (CRO – 30µg), Cefazidime (CAZ – 30µg), Cefepime (CFM – 30µg), Gentamicin (GEN – 10µg), Amikacin (AK – 30µg), Kanamycin (KAN – 30µg), Tobramycin (TOB – 10µg), Ampicillin (AMP – 10µg), Piperacillin/Tazobactam (PPT – 100µg/10 µg), Amoxicillin/clavulanic acid (AMC – 20µg/10µg), Ampicillin/Sulbactam (ASB – 10µg/10µg), Ciprofloxacin (CIP – 5µg), Norfloxacin (NOR – 10µg), Imipenem (IPM – 10µg), Ertapenem (ETP – 10µg), Aztreonam (ATM – 30µg), Chloramphenicol (CHL – 30µg), Tetracycline (TCY – 30µg), and Cotrimoxazole (SUT – 25µg).

The samples resistant to 3<sup>rd</sup> generation cephalosporins in AST were submitted to confirmatory tests of extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) production by the double-disc synergy test and the approximation test, according to CLSI (2014). *Klebsiella pneumoniae* strain ATCC 700603 was used as control.

**Plasmid DNA extraction** – Sixteen samples (1, 3, 1CFL2, 4.12, 4.13, 4.15, 4.16, 4.20, 4.39, 4CFL1, 4CFL2, 4CFL8, 5.2, 5CFL2, 5CFL3, 5CFL5, 6CFL3) showed resistance to three or more antimicrobial drugs and were

Detection of bacterial samples on the aquatic ecosystem adjacent to Saguarema lagoon – Rio de Janeiro

submitted to DNA extraction and 0.8% agarose gel electrophoresis for plasmid detection, according to Gonçalves et al. (2013). We used plasmid DNA of *E. coli* R861 sample as molecular weight markers and *E. coli* K12 R23 as negative control for the presence of plasmid DNA. The gels were dyed in an ethidium bromide solution (0.5 mg/mL), analyzed in ultraviolet transilluminator and photographed by a Kodak EDAS 120 system.

#### RESULTS

**Colimetric tests** – The MPN obtained in this study were considered unacceptable according to resolution CONAMA 274/00 (BRASIL, CONAMA, 2000) except samples from collection site II. The thermo tolerant coliforms results showed good water quality and according to the later resolution the water was satisfactory (Table 1).

**Isolation of strains** – On the six collection sites around Saguarema lagoon there were isolated 121 samples belonging to 13 different species, such as: *Enterobacter agglomerans* (23/121), *Pseudomonas aeruginosa* (19/121), *Enterobacter cloacae* (17/121), *Klebsiella pneumoniae* (16/121), *Klebsiella pneumoniae subspecies oasense* (12/121), *Citrobacter* spp. (7/121), *Enterobacter aerogenes* (7/121), *Enterobacter sakazakii* (7/121), *Citro-*

*bacter freundii* (4/121), *Escherichia coli* (5/121), *Serratia liquefaciens* (2/121) and *Serratia marcescens* (2/121).

**Antimicrobial Susceptibility Testing** – From the 121 samples tested, 41 (33, 9%) samples were resistant to three or more classes of antimicrobials, these classes, determined according to Magiorakos et al. (2012). The main classes that showed resistance were the 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> generation of cephalosporins and penicillins, especially AMP (34 strains). Six samples were resistant to 3<sup>rd</sup> generation cephalosporins and 25 samples were resistant to CFZ. Seventeen samples showed resistance to AMI, 14 samples were resistant to GEN and 22 were TCY resistant (table 2).

**Plasmid DNA extraction** – From the 16 samples submitted to plasmid DNA extraction, 9 (56,25%) had consistent with plasmid DNA. Two samples (4.16 and 4.20) show a molecular weight of 147 kb while seven samples (4.16, 4.19, 4.20, 4CFL1, 5.2, 5CFL2 and 5CFL5) had molecular weight between 147 kb and 69 kb. Three samples (4.15, 4.16 and 4CFL2) had molecular weight below 69 kb. It is noteworthy the strain 4.16 showed three different size amplicons and strain 4.20 showed two different size amplicons.

Table 1 – MPN index 100 mL in water samples collected at sites around Saguarema lagoon

Parameters	Collection points					
	Itaúna	City Centre	Fishermen residence	Jacaré I	Jacaré II	Jacaré III
Total Coliforms	900	11	≥ 1.600	1.600	900	≥ 1.600
Thermo tolerant Coliforms	240	< 2	>240x100	< 2	< 2	< 2

Table 2 – Antimicrobial resistance profile of the different samples isolated from the water samples collected at the Saguarema lagoon ecosystem.

Strains	Species	Resistance profile	Confirmatory test to ESBL
1.3	<i>E. sakazakii</i>	CFZ/CPH/CRX/AMP/AK	NT
1CFL2	<i>E. sakazakii</i>	CFZ/CPH/AMP/TCY	NT
2.10	<i>E. agglomerans</i>	CFZ/CPH/AMP/AK	NT
2.11	<i>K. oasense</i>	CFZ/CPH/AMP/TCY	NT
3CFL4	<i>P. aeruginosa</i>	CFZ/CFL/CRX/AMP/CHL	NT
4.2	<i>E. agglomerans</i>	CFZ/CPH/AMP/TCY	NT
4.5	<i>E. coli</i>	CFZ/CPH/AMP/TCY/CHL/GEN	NT
4.12	<i>K. pneumoniae</i>	CPH/CRQ/AE/GEN/KAN	(-)
4.13	<i>E. agglomerans</i>	CPH/CRQ/AE/GEN/KAN	(-)
4.14	<i>P. aeruginosa</i>	CFZ/CPH/CRX/AMP/TCY/KAN	NT
4.15	<i>C. freundii</i>	CPH/TCY/CHL	NT
4.16	<i>C. freundii</i>	CFZ/CPH/AMP/TCY	NT
4.17	<i>E. agglomerans</i>	CRX/AMP/TCY/CHL/AE/KAN	NT
4.19	<i>K. pneumoniae</i>	AMP/TCY/CHL	NT
4.20	<i>K. pneumoniae</i>	AMP/TCY/CHL/AE	NT
4.21	<i>E. aerogenes</i>	TCY/CHL/AK	NT
4.22	<i>K. pneumoniae</i>	CRX/AMP/TCY/CHL	NT
4.27	<i>K. pneumoniae</i>	CFZ/CPH/CRX/AMP/AK	NT
4.33	<i>E. agglomerans</i>	CFZ/CPH/AMP/AK	NT
4.39	<i>E. agglomerans</i>	CFZ/CPH/AMP/TCY/GEN	NT

Barbara Araújo Nogueira et al.

Strains	Species	Resistance profile	Confirmatory test to ESBL
4CFL1	<i>P. aeruginosa</i>	CFZ/CPH/CRX/AMP/TCY/KAN	NT
4CFL2	<i>E. cloacae</i>	CRX/TCY/KAN	NT
4CFL5	<i>C. freundii</i>	CFZ/CPH/CRX/AMP/TCY	NT
4CFL8	<i>P. aeruginosa</i>	CFZ/CPH/CRX/CRD/AMP	(-)
4CFL9	<i>P. aeruginosa</i>	CFZ/CPH/AMP/CHL	NT
5.2	<i>E. agglomerans</i>	CRX/CRD/AMP/AK	(-)
5.7	<i>K. ozaenae</i>	CRX/AMP/GEN	NT
5.10	<i>E. agglomerans</i>	TCY/KAN/CIP	NT
5.13	<i>P. aeruginosa</i>	CPH/CRX/AMP/TCY/GEN/AK	NT
5.15	<i>K. pneumoniae</i>	AMP/TCY/GEN	NT
5CFL1	<i>E. agglomerans</i>	CPH/CRX/AMP/GEN	NT
5CFL2	<i>E. aerogenes</i>	CRX/CRD/GEN/AK/CIP	(-)
5CFL3	<i>E. agglomerans</i>	CPH/CRX/AMP/GEN/AK/KAN	NT
5CFL4	<i>P. aeruginosa</i>	CPH/CRX/AMP/GEN/AK	NT
5CFL7	<i>P. aeruginosa</i>	CPH/CRX/CRD/AMP/GEN/CIP	(-)
6.2	<i>P. aeruginosa</i>	CFZ/CPH/AMP/CHL	NT
6.4	<i>E. agglomerans</i>	CFZ/CPH/AMP/TCY	NT
6.5	<i>E. agglomerans</i>	CFZ/CPH/AMP/KAN	NT
6CFL1	<i>C. freundii</i>	CFZ/TCY/GEN	NT
6CFL2	<i>P. aeruginosa</i>	CFZ/CPH/CRX/AMP/TCY/GEN	NT
6CFL3	<i>P. aeruginosa</i>	CFZ/CPH/CRX/AMP/CHL/GEN	NT

CFZ – Cephalosporins; CPH – Cephalosporins; CRX – Cefuroxime; AMP – Ampicillin; AK – Amikacin; TCY – Tetracycline; CHL – Chloramphenicol; GEN – gentamicin; KAN – Kanamycin; CRD – Ceftiozone; CIP – Ciprofloxacin; NT – not tested.

#### DISCUSSION

The increase in population around the Saguarema Lagoon leads to the discharge of untreated sewage causing the phenomenon of eutrophication in this lagoon. The water quality assessed in this study showed satisfactory results according to resolution CONAMA 274/00 (BRASIL, CONAMA, 2000). The study by Kolawole et al. (2011) suggests that thermo tolerant coliform levels can appear to be low in coastal lagoons due to the constant renewal of water, normally through a channel. These findings confirm the results of the present study, since in Saguarema lagoon this renewal is enabled by the Barra Franca channel.

Ash et al. (2002) studied the water from some rivers in United States of America finding mainly four bacterial genus, namely: *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* and *Serratia*. These findings corroborate with the results in the present study, although, the present study found that 23% of the isolated belonged to *Klebsiella* spp. while in the Ash et al. (2002) study this genus was the least found. Brandt et al. (2012) described the genus, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Enterobacter* e *Citrobacter* to be the most common found in coastal lagoons, which confirms the results of the present study. It was also found in the present study that 15% of the isolates were nonfermenters substantiating the results from Meirelles-Pereira et al. (2002).

According to Korzeniewska, Korzeniewska e Hornuz (2013), the high number of resistant microorganisms found in the wastewater may be associated with the presence of antibiotics in the environment. Resistance to antibiotics commonly used to treat humans was 44.1% by *Enterobacteriaceae* samples found in the environment. Maglócz et al. (2012) assert that the strains may be

considered multidrug-resistant once showing resistance to three or more antimicrobial groups, excluding the intrinsic resistances. Many authors state that the presence of antibiotics in an environment is the main force for the selection and spread of resistance. However, there is little evidence to confirm that antibiotics change and promote the selection of resistance in these environments (NOVO et al., 2013). The present study showed that besides resistant to different classes of antimicrobials the samples isolated did not show any resistance profile consistent to the ones found in nosocomial settings.

This study focussed on Gram negative bacilli, with some antimicrobial resistance, which may be found both in the community and in the hospital. Donsley (2006) found nosocomial Gram-negative bacilli resistant to cephalosporin, ciprofloxacin and aminoglycosides, which corroborates the results of the present study. Furthermore, according to the same author, Gram negative bacilli when resistant to different antimicrobial classes may enhance dissemination and colonization of pathogenic bacteria. Ribeiro et al. (2001) detected high numbers of *Enterobacteriaceae*, isolated from coastal sewage, that were resistant to ampicillin due to the widespread use of this antimicrobial drug in the community. In the present study, 82% (34/41) of all isolated strains were resistant to ampicillin.

In the present study there was no samples showing ESBL production on confirmation tests although, according to Vasques et al. (2011), *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* spp. e *Serratia marcescens* are the most frequent reservoirs for ESBL enzymes.

Martinez e Baquero (2002) affirm that antimicrobial resistance in microorganisms is a genetic phenomenon

related to the existence of genes encoding different biochemical mechanisms that prevent the action of drugs. According to Donkley (2006), among Gram-negative bacilli, the production of ESBLs is the most common resistance mechanism, and involves the participation of plasmids transferred to other microorganisms. It was possible to detect plasmids weighing from under 63kb to 147kb in strains showing resistance to different antimicrobial classes. Mayer (1988) showed that plasmids can be transferred between different bacterial genus and the most common transfers occur between Enterobacteriaceae and other Gram-negative bacilli. Carattoli (2009) demonstrated that resistance genes transfers are mostly associated with plasmid activity.

The dissemination of bacteria through aquatic ecosystems can lead to Human and Animal infections which can have a difficult treatment if these bacteria carry antimicrobial resistance genes in their plasmids. The free transit of bacteria between different ecosystems has occurred for many decades and it may have been aggravated by the lack of sanitation policies and poor soil management. Oliveira, França, e Pinto (2009) studied the water and sand on beaches in different areas of Sao Paulo State, Brazil, and isolated numerous multidrug-resistant samples in both water and sand in all areas. According to the authors all these areas have wastewater management and sewage treatment programmes, although, on holiday season these measurements do not suffice to maintain a good water quality in some areas. The existence of multidrug resistant bacteria in recreational aquatic environments represents an important public health concern because the continuous exposure of Humans and Animal to these bacteria may put them in a constant risk of colonization and infection.

The establishment of a sewage treatment programme can determine the preservation of Saquarema Lagoon, although we can notice many illegal activities that can compromise this preservation prospect. Our findings (useful towards environmental preservation) can be used as a comparative framework for periodic evaluations by colimetric tests and also as a trigger for further research of multidrug-resistant strains in a continuous environmental control program.

#### CONCLUSION

The presence of thermo tolerant coliforms above the legal values in the water of the Saquarema lagoon, may suggest the lack of commitment from the federal and state governments in regards to the public sewage and water treatments. The bacterial species isolated from the six collection sites are normally found in aquatic environments, and there was no bacteria found with an industrial or hospital source. This fact discards the possibility of hospitals and industries to have been the source of this bacterial presence. The dissemination of bacteria holding antimicrobial resistance genes in high weight plasmids may suggest that transference of those genes

can occur between bacterial species living in an aquatic ecosystem which may lead to human infection with a complex treatment. Saquarema Lagoon is in a preservation condition and it shows signs of good water quality, although, the constant presence of bacteria encoding antimicrobial resistance genes in different sites of the lagoon may imply that, there are a natural resistance of the bacteria. A constant microbiological surveillance, including the assessment of resistance profiles, in ponds as Saquarema Lagoon, should allow detect the occurrence (or not) of progression in degradation process by population increasing and by the illegal discharge of sewage.

#### ACKNOWLEDGEMENTS AND FINANCIAL SUPPORT

This research was supported by grants from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), CAPES/FAPERJ PAPP Program for Frederico Meirelles-Pereira; Proc.: E-26/102.567/2010.

#### REFERENCES

- ASH, R. J.; MAUCK, B.; MORGAN, M. Antibiotic resistance of Gram-negative bacteria in rivers, United States. *Emerg. Infect. Dis.*, Kansas, v. 8, n. 7, p. 713-716, July, 2002.
- BHRAM, A.; et al. Influences of urban wastewater on the stream water quality: a case study from Gaziantep Province, Turkey. *Environ. Monit. Assess.*, Gaziantep, v. 185, n. 2, p. 1285-1300, Apr. 2012.
- BRANDT, K. et al. Establishment of the bacterial fecal coliforms during the first month of life in Brazilian newborns. *Clin. sci.*, São Paulo, v. 67, n. 2, p. 113-123, Feb. 2012.
- BRASIL. Corama. Resolução nº 274 from november 29, 2000., Brasília, DF: Conselho Nacional de Meio Ambiente, 29 nov. 2000. Available in: <<http://www.mma.gov.br/port/corama/>>. Access in: 07 Feb. 2015.
- CARATTOLI, A. Resistance Plasmid Families in Enterobacteriaceae. *Antimicrob. agents chemother.*, Roma, v. 53, n. 6, p. 2227-2238, June, 2009.
- PERFORMANCE Standards for antimicrobial disk susceptibility testing: twenty-second informational supplement. Estados Unidos: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012.
- DERRIEN, M. et al. Origin of fecal contamination in waters from contrasted areas: *Staphylococcus* as Microbial Source Tracking markers. *Water res.*, Rennes, v. 46, n. 13, p. 4009-4016, Sept. 2012.
- DONKLEY, C. J. Antibiotic Resinase and Intestinal Colonization with Antibiotic-Resistant Gram-Negative Bacilli. *Clin. Infect. Dis.*, Ohio, v. 43, Supl 2, p. 62-68, Feb. 2006.
- GEDRATIENE, A. et al. Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria. *Medicina. Kaunas*, v. 47, n. 3, p. 137-146. 2011.
- GONÇALVES, V. D. et al. Evaluation of different protocols for Detection of enterobacterial plasmids Coding for antimicrobial resistance. *Revista Sociedade Brasileira de Microbiologia*, v. 8, n. 94, p. 9-15, Oct. 2003.
- GONÇALVES, V. D. et al. The use of antimicrobials in selective coliform media as a tool for quantifying resistant bacteria in aquatic ecosystems in Rio de Janeiro, Brazil. *Rev. bras. micr. biol.*, Salvador, v. 13, n. 1, p. 39-48, Jan./Apr. 2014.
- HARMSZ, M. Total resistance of native bacteria as an indicator of changes in the water environment. *Environ. Pollut.*, Cluj-Napoca, v. 174, p. 83-92. June. 2012.



13. IBEKWE, A. M.; MURINDA, S. E.; GRAVES, A. K. Microbiological Evaluation of Water Quality from Urban Wetlands for Domestic Water Supply Improvement. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, North Carolina, v. 8, n. 12, p. 4460-4476, Dec. 2011.
14. KOLAWOLE, O. M. et al. Assessment of Water Quality in Ase River (Nigeria) and its Indigenous *Clonot* genotypes. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, Nigeria, v. 8, n. 11, p. 4332-4352, Nov. 2011.
15. KORZENIEWSKA, E.; HARNISZ, M. Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-positive *Enterobacteriaceae* in municipal sewage and their isolation on the environment. *J. Environ. Manag.*, Olstyn, v. 126, p. 904-911, July. 2013.
16. KORZENIEWSKA, E.; KORZENIEWSKA, A.; HARNISZ, M. Antibiotic resistant *Enterobacteriaceae* in hospital and municipal sewage and their isolation on the environment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, Olstyn, v. 96, p. 96-102, Feb. 2013.
17. MAGGIORANDI, A.F. et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin. Microbiol. Infect.*, Stockholm, v. 18, n. 3, p. 268-281, Mar. 2012.
18. MARTINEZ, J. L.; BAQUERO, F. Interactions among strategies associated with bacterial infection: Pathogenicity, epidemicity, and antibiotic resistance. *Clin. Microbiol. Rev.*, Washington, v. 4, n. 15, p. 647-679, Oct. 2002.
19. MAYER, L. W. Use of plasmid profiles in epidemiologic surveillance of disease outbreaks and in tracing the transmission of antibiotic resistance. *Clin. Microbiol. Rev.*, Alberta, v. 1, n. 2, p. 228-243, Apr. 1988.
20. MEIRELLES-PEREIRA, F. de. et al. Ecological aspects of the antimicrobial resistance in bacteria of importance to human infections. *Braz. J. Microbiol.*, Rio de Janeiro, v. 33, p. 287-290, Sept. 2002.
21. MURRAY, P. R. et al. *Manual of Clinical Microbiology*. 9 ed. Washington: ASM Press, 2007. 2476 p. Vol. 1.
22. NOVO, A. et al. Antibiotic resistance, antimicrobial residues and bacterial community composition in urban wastewater. *Water research*, Oxford, v. 47, p. 1875-1887, Jan. 2013.
23. OLIVEIRA, A. I. F. C. de; FRANÇA, F. T. R. de; RINTO, A. B. Antimicrobial resistance of heterotrophic marine bacteria isolated from seawater and sands of recreational beaches with different organic pollution levels in southeastern Brazil: evidences of resistance dissemination. *Environ. Monit. Assess. São Vicente*, v. 169, n. 1/4, p. 375-384, Oct. 2009.
24. RIBEIRO, E. N. et al. Resistência a antibióticos em enterobactérias isoladas de esgotos e regiões costeiras. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 21., 2000, Vila Velha. Anais... Vila Velha, [2000?].
25. STANDARD methods for the examination of water and waste-water: 20 ed. Washington: American Public Health Association, 2014. 1268 p.
26. VASQUES, M. R. G. et al. Beta-lactamase producing enterobacteria isolated from surveillance swabs of patients in a Cardiac Intensive Care Unit in Rio de Janeiro, Brazil. *Braz. J. Infect. Dis.*, Rio de Janeiro, v. 15, n. 1, p. 28-33, July. 2011.
27. ZHANG, R. et al. Antibiotics in the offshore waters of the Bohai Sea and the Yellow Sea in China: Occurrence, distribution and ecological risks. *Environ. Pollut.*, Guangzhou, v. 174, p. 71-77, Nov. 2012a.
28. ZHANG, R. et al. Occurrence and risks of antibiotics in the Laizhou Bay, China: Impacts of river discharge. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, Guangzhou, v. 80, p. 208-215, Mar. 2012b.

Submetido em : 22/04/2015  
 Aceito em : 06/08/2015

APÊNDICE C – Artigo submetido – Occurrence of multidrug-resistant *Enterobacteriaceae* in a lagoon complex located at the metropolitan area of Rio de Janeiro, Brazil

**Occurrence of multidrug-resistant *Enterobacteriaceae* in a lagoon complex located at the metropolitan area of Rio de Janeiro, Brazil**

Nogueira, B.A.<sup>a</sup>; Olivella, J.G.B.<sup>a</sup>; Sued, B. P. R.<sup>a</sup>; Pereira, P. M. A.<sup>a</sup>; Gonçalves, V.D.<sup>b</sup>; Cataldo, M.<sup>c</sup>; Meirelles-Pereira, F.<sup>d</sup>; Andrade, A.F.B.<sup>a</sup>; Mattos-Guaraldi, A.L.<sup>a</sup>; Pereira, J.A.A.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

<sup>b</sup> Laboratório de Enterobactérias, Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

<sup>c</sup> Laboratório de Radioecologia e Mudanças Globais, Departamento de Biofísica e Biometria, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

<sup>d</sup> Laboratório de Limnologia, Departamento de Ecologia, Instituto de Biologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. **Running title:** ESBL MDR *Enterobacteriaceae* in water receptacles.

**Key words:** ESBL, MDR *Enterobacteriaceae*, lagoon, water environment

---

**Corresponding author:** Prof. Dr. Ana Luíza de Mattos Guaraldi. Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Av. 28 de Setembro, 87 - Fundos, 3º andar. Vila Isabel, RJ, Brazil, CEP 20 551-030. Fax number: +55 21 2868-8376; E-mail: [guaraldi@uerj.br](mailto:guaraldi@uerj.br).

**Abstract (300words)**

Aquatic ecosystems are considered ideal for the exchange of bacterial genetic material and recognized as a relevant source of antimicrobial multi-resistant (MDR) bacteria. Despite a great number of studies addressing estuarine, freshwater and marine bacterial diversity, few have examined urban coastal lagoons in tropical habitats. In this study the occurrence of extended spectrum beta-lactamase-ESBL MDR *Enterobacteriaceae* in a coastal lagoon complex located at Rio de Janeiro metropolitan area, Brazil was investigated. Water samples collected from three distinct sites (Camorim channel, Jacarepaguá and Marapendi lagoons) were inoculated into both 8 µg/mL gentamicin and 32 µg/mL cephalothin selective media. Ninety-seven strains of the following species were isolated from water samples (30 in gentamicin media and 67 cephalothin media): *Escherichia coli* (n=34), *Enterobacter agglomerans*(n=29), *Citrobacter freundii*(n=15), *Proteus vulgaris*(n=09), *Klebsiella pneumoniae* (n=06), *Proteus mirabilis* (n=02), *Enterobacter aerogenes* (n=01) and *Enterobacter cloacae* (n=01). The use of gentamicin selective media allowed the isolation only of *E. coli*, *E. agglomerans* and *K. pneumoniae* strains. Therefore, the concomitant use of these selective media favored the isolation of a higher number of strains and species from water samples. *Enterobacteriaceae* isolates(34.02%) expressing varied MDR profiles were isolated from Jacarepaguá (n=14) and Marapendi (n=13) lagoons and Camorim channel (n=06) collection sites: *E.coli* (n=11), *E.agglomerans* (n=18), *K. pneumoniae* (n=02), *C. freundii* (n=01) and *P. vulgaris* (n=01). Two *E. coli* and 08 *E.agglomerans* strains were characterized as ESBL-positive. The presence of *bla<sub>TEM</sub>* gene was detected in one *E. coli* and three *E. agglomerans* ESBL-positive strains. Resistance to aminoglycosides and fluoroquinolone were detected in approximately 30 MDR *Enterobacteriaceae* isolates. In conclusion, dissemination of resistance genes in aquatic environments of Rio de Janeiro metropolitan area is substantiated by the presence of potentially pathogenic MDR *Enterobacteriaceae* species and prevalence of specific genes for ESBL production within Jacarepaguá lagoon complex.

## Introduction

Since the early 1980's, a relationship between the use of a third generation cephalosporin and the development of the mechanisms associated with multidrug-resistance (MDR), including beta-lactamases, in *Enterobacteriaceae* family became responsible for 95% of nosocomial and/or community-acquired infections (Coque *et al.*, 2008; Bajaj *et al.*, 2015; Bogaerts *et al.*, 2015).

Over the years there has been a significant increase in dumping of chemical compounds into the environment due, among other factors, to the poor quality of water supply and sewage treatment system, especially in developing countries (Derrien *et al.*, 2012; Lupo *et al.*, 2012). The presence of antimicrobial multi-resistant (MDR) bacteria from different sources (hospital, domestic, industrial, and rural activities) in recreational and fresh waters may affect environmental and human health worldwide (Ishida *et al.*, 2010; Ibekwe *et al.*, 2011; Lupo *et al.*, 2012; Zhao & Dang, 2012, Oliveira *et al.*, 2009; Nogueira *et al.*, 2015). In Brazil, Rio de Janeiro metropolitan area has many coastal ecosystems including the Lagoon Complex of Jacarepaguá, in which has suffered intense aggression to its natural ecosystem due to the anthropic occupation without proper urban infrastructure and the release of industrial and domestic waste in its water bodies. These environmental problems have led to a growing process of water eutrophication, which produces changes in water quality (Cruz *et al.* 2012).

Aquatic environments may provide an ideal setting for the acquisition and dissemination of antibiotic resistance, because they are frequently impacted by anthropogenic activities. Susceptible bacteria may become MDR by acquisition of DNA encoding resistance traits through horizontal gene transfer (Meirelles-Pereira *et al.*, 2002; Martínez, 2009; Martins *et al.*, 2014). Despite a great number of studies addressing bacterial diversity in aquatic environments, few have examined urban coastal lagoons in tropical habitats (Salloto *et al.*, 2012). Therefore, there is an increasing interest in monitoring MDR pathogens in these water bodies by current molecular and microbiological approaches. The aim of the present study was to investigate the presence of MDR *Enterobacteriaceae* strains isolated from the Lagoon Complex of Jacarepaguá. The prevalence of specific genes for extended spectrum beta-lactamase (ESBL) production was also investigated.

## Materials and Methods

**Study area and water sample collection.** The Lagoon Complex of Jacarepaguá, is located within the metropolitan area of Rio de Janeiro, Brazil, between the parallels 22°55'S to the north and 23°05'S to the south and the meridians 43°18'30"W to the east and 43°32'30" to the west. This coastal ecosystem includes Jacarepaguá, Camorim, Tijuca and Marapendi lagoons that receive water from different sources: precipitation and surface runoff, river, sub-surface and sea waters (Santos 2014). The Lagoon Complex of Jacarepaguá is connected to the sea via Joatinga Channel (east side) and Sernambetiba Channel (west side) (Amorim, 2015).

Water samples were collected from three different locations surrounded by a high population density: Jacarepaguá lagoon includes low socioeconomic communities and small areas of environmental protection; Camorim channel that also presents industries and larger environmental protection areas compared to Jacarepaguá lagoon; Marapendi lagoon presenting preservation areas such as the Municipal Natural Park is surrounded by *high* and middle socioeconomic infrastructure (Sallotô et al., 2012).

**Isolation and identification of enterobacterial strains:** Aliquots of water samples collected from each isolation site were inoculated in 100ml of Brain Heart Infusion broth – BHI (2x), as previously described (Gonçalves *et al.* 2015). Subsequently, Gram-negative.....cultura..... strains were identified by phenotypic methods, according to Murray and co-workers (2007).

**Analysis of antimicrobial resistance profiles.** Antimicrobial susceptibility profiles were determined by the disk diffusion method in Mueller-Hinton agar using inoculums equivalent to a 0.5 McFarland standard, according to Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines (CLSI, 2016). Up to 25 commercially-prepared, fixed concentration established by CLSI guidelines, paper antibiotic disks (Oxoid, Hampshire, United Kingdom) were used: cephalothin, cefazolin, cefoxitin, cefuroxime, cefotaxime, ceftriaxone, ceftazidime, cefepime, gentamicin, amikacin, kanamycin, tobramycin, ampicillin, piperacillin/taxobactam, amoxicillin/clavulanic acid, ampicillin/sulbactam, ciprofloxacin, norfloxacin, imipenem, ertapenem, meropenem, aztreonam, chloramphenicol, tetracycline, and cotrimoxazole. *Escherichia coli* ATCC 25922 strain was used as a control. Multidrug resistance (MDR) was

defined as acquired non-susceptibility to at least one agent in three or more antimicrobial categories (Magiorakos et al., 2012).

**Detection of ESBL by phenotypic and genotypic tests.** Microorganisms expressing resistance to 3rd and 4th generation cephalosporins were subjected to the beta-lactamase inhibition test by using cefotaxime and cefotaxime with clavulanic acid in addition to the disk approximation test using ceftazidime, amoxicillin/clavulanic acid and aztreonam (CLSI; 2016). ESBL positive strains identified by the phenotypic tests were subjected to PCR for identification of *bla<sub>TEM</sub>*, *bla<sub>SHV</sub>*, *bla<sub>TOHO</sub>*, *bla<sub>CTX-M</sub>* genes (**Table 1**).

## Results and Discussion

*Preliminary analysis of the pollution impacts on bacterioplankton diversity in the Lagoon Complex of Jacarepaguá revealed 50% of the isolates from Jacarepaguá collection were antibiotic resistant bacteria, including species that are known human pathogens such as Pseudomonas aeruginosa and Vibrio cholera (Salloto et al., 2012).*

*Enterobacteriaceae* is one of the most common families of bacteria found in the microbiota of humans and animals. It's has been increasingly found in wastewater due to environmental contamination by fecal material (Said *et al.*, 2015). In the present investigation 97 *Enterobacteriaceae* strains potentially pathogenic for humans were isolated from three collection sites of the Lagoon Complex of Jacarepaguá located at Rio de Janeiro metropolitan area: Jacarepaguá (n=41) and Marapendi (n=41) lagoons and Camorin channel (n=15).

Environmental pollution is capable of promoting the spread of antimicrobial resistance in aquatic environments. Discharge of waste containing antimicrobial drugs may generate a selective pressure favoring bacterial resistance to many antibiotic groups and growth of antimicrobial resistant populations (Gonçalves *et al.*, 2014; Czekalski *et al.*, 2015).

The use of selective medium containing antimicrobial agents is a relatively simple and efficient method useful to evaluate microorganisms related to hospitalized patients' microbiota that are relevant as potential pathogens in nosocomial infections (Gonçalves *et al.*, 2015). As expected, we were able to observe the presence of a high number of strains isolated in medium containing cephalothin because its use in hospitals is already considered outdated and there are only a few strains that are resistant to this antimicrobial agent. Despite being in an aminoglycosides antimicrobial group, gentamicin is still being used in clinical practice, although some studies already indicate that bacteria resistant to gentamicin are commonly found in aquatic environments (Zowawi *et al.*, 2015).

(A total of 30 (29.7%) MDR *Enterobacteriaceae* strains were isolated in gentamicin selective media: 11 from Jacarepaguá lagoon, seven from Camorim channel and 12 from Marapendi lagoon. A higher number of strains (n=71; 70.3%) was isolated in cephalothin selective media: 33 from Jacarepaguá lagoon, eight from Camorim channel and 30 from Marapendi lagoon). When gentamicin selective media was used, *Escherichia*

*coli* (n=19) was mostly observed, followed by *E. agglomerans* (n=07) and *K.pneumoniae* (n=04). For the cephalothin selective media, a prevalence of *E. agglomerans* (n=22), followed by *E. coli* (n=15), *C. freundii* (n=15), *P. vulgaris* (n=09), *Yersinia enterocolitica* (n=03), *K. pneumoniae* (n=02), *P. mirabilis* (n=02), *E. aerogenes* (n=01), *E. cloacae* (n=01) and *Hafnia alvei* (n=01) was noticed.

According to Magiorakos and co-workers (2012), strains that presented resistance profiles to three or more groups of antimicrobials must be considered as MDR. MDR strains were detected among different species found in the lagoon complex: *E. coli* strains exhibiting different MDR profiles as well as *E. agglomerans*, *C. freundii*, *K. pneumoniae*, *Yersinia enterocolitica* and *P.vulgaris* were isolated from this complex.

In this study we choose to consider as MDR, strains that shown resistance to three or more group of interest: cephalosporin, aminoglycoside, fluoroquinolone and carbapenems. Thus, of the 101 strains obtained in the Jacarepaguá lagoon complex, 33 were considered MDR: 12 from the Jacarepaguá lagoon (Gen = 4; CFL = 8); 14 from the Marapendi lagoon (Gen = 6; CFL = 8) and seven from the Camorim channel (GEN = 4; CFL = 3) as shown in **Table 2**.

The presence of carbapenems in the aquatic environment shows the evolution of antimicrobial use both in the community and in clinical practice (Dienstmann *et al.*, 2010; Henriques *et al.*, 2012).

Several authors argue that numerous pathogens are showing resistance to quinolones in recent decades mainly due to its widespread use. These data suggest that the presence of enteric bacteria resistant to these antibiotics is related to sewage water (Adachi *et al.*, 2013; Xiong *et al.*, 2015).

The presence of strains resistant to two or more antibiotics belonging to the group of aminoglycosides is related to the direct disposal of untreated waste into aquatic environments (Meirelles-Pereira *et al.*, 2002; Krummerer, 2004). Bacterial strains resistant to an antimicrobial of the aminoglycoside group pose a health risk, as they may be tolerant to almost all antibiotics in the same class, challenging their therapeutic efficacy (Farouk *et al.*, 2015).

MDR strains that showed resistance to two or more aminoglycosides (n = 22) were submitted to PCR assays for the presence of the *acc2* and *acc3* genes, the fluorquiolon resistant strains (n = 18) were tested for *qnrA* and *qnrB* while those who presented resistance to carbapenems (n = 21) were submitted to assays for the *bla<sub>KpC</sub>* gene. However, the presence of compatible resistance genes was not observed in any of the cases.



One of the major global concerns is the discharge of wastewater influencing the spread of antimicrobial resistance, especially related to *Enterobacteriaceae* showing resistance to 3rd and 4th generation cephalosporins which is often associated to fecal contamination (Coutinho *et al.*, 2014; Czekalski *et al.*, 2015; Tacão *et al.*, 2015; Van Hoek *et al.*, 2015).

In the present study, a total of 33 strains showed resistance to 3rd and 4th generation cephalosporins (Jacarepagua Lagoon = 14, Lagoa de Marapendi = 12, Camorim Channel = 7) were investigated for the presence of ESBL by phenotypic tests. For 48.5% (n=16) of them, corresponding to three *E. coli*, one *E. agglomerans*, and one *Yersinia enterocolitica* strains isolated from Jacarepagua lagoon, nine *E. agglomerans* strains isolated from Marapendi lagoon and one *K. pneumonia* and one *E. coli* isolated from Camorim channel were considered positive for the presence of ESBL genes.

PCR assays were performed for the *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>TOHO</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub> genes and nine strains were positive for these tests: five *E. agglomerans*, three *E. coli* and one *K. pneumonia*. All MDR *K. pneumoniae* isolated from Camorim channel were ESBL-negative. Analysis of ESBL genes revealed the presence of *bla*<sub>TEM</sub> gene for three *E. coli* and five *E. agglomerans* ESBL-positive strains and *bla*<sub>SHV</sub> genes for one *K. pneumoniae*. However, *bla*<sub>TOHO</sub> and *bla*<sub>CTX-M</sub> genes were not detected for all 33 MDR strains tested (**Table 3**).

ESBLs are enzymes capable of hydrolysing penicillins, broad-spectrum cephalosporins and monobactams, and are generally derived from TEM and SHV-type enzymes. ESBL producing organisms pose unique challenges to clinical microbiologists, clinicians, infection control professionals and antibacterial-discovery scientists. ESBL-producing *Enterobacteriaceae* have been responsible for numerous outbreaks of infection throughout the world and pose challenging infection control issues. In the late 1990s, most strains expressing ESBL had the resistance genes of *bla*<sub>TEM</sub> and *bla*<sub>SHV</sub>. The *bla*<sub>TEM</sub> gene is a resistance gene most often transmitted by plasmids that confer resistance to broad-spectrum penicillins and cephalosporins (Bajaj *et al.*, 2015; Bastos *et al.*, 2015).

Since this type of ecosystem is ideal for the exchange of genetic material between bacteria, antibiotic-resistant genes, which pass along their resistance characteristics, are currently being discussed as emerging environmental contaminants (Bergero *et al.*, 2015; Czekalski *et al.*, 2015).

In conclusion, dissemination of resistance genes in aquatic environments, already considered a public health problem worldwide, is also an alarming problem in Rio de Janeiro metropolitan area substantiated by the detection of multidrug-resistance and

prevalence of specific genes for ESBL production in potentially pathogenic *Enterobacteriaceae* species isolated from the coastal Lagoon complex of Jacarepaguá.

### **Acknowledgments**

This work was supported by grants from CAPES (Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel), FAPERJ (Foundation for Support of Research in the State of Rio de Janeiro), CNPq (Brazilian National Council for Scientific and Technological Development) and SR-2/UERJ.

## References

- Adachi, F., Yamamoto, A., Takakura, K., Kawahara, R. (2013) Occurrence of fluoroquinolones and fluoroquinolones-resistance genes in the aquatic environment. [Sci Total Environ](#) 444: 508- 514.
- Arlet, G., Philippon, A. (1991) Construction by polymerase chain reaction and use of intragenic DNA probes for three main types of transferable beta-lactamases (TEM, SHV, CARB). *FEMS Microbiol Lett* 68: 19-25.
- Bajaj, P., Singh, N. S., Kanaujia, P. K., Viridi, J. S. (2015) Distribution and molecular characterization of genes encoding CTX-M and AmpC  $\beta$ -lactamases in *Escherichia coli* isolated from an Indian urban aquatic environment. *Sci Total Environ* 505: 350-356.
- Bastos, M. S., Menegucci, T. C., Moreira, R. R. B., Garcia, L. B., Cardoso, C. L., Tognim, C. B. (2015) A rapid and simple method to detect ESBL in *Enterobacter cloacae* based on MIC of cefepime. **Rev Soc Bras Med Trop** 48: 208-211.
- Bergero, S., Boopathy, R., Nathaniel, R., Corbin, A., Lafleur, G. (2015) Presence of antibiotic resistant bacteria and antibiotic resistance genes in raw source water and treated drinking water. *Int Biodeterior Biodegradation* 102: 370- 374.
- Bogaerts, P., Huang, T. D., Bouchahrouf, W., Bauraing, C., Berhin, C., Garch, F. E., Glupczynski, Y. (2015) Characterization of ESBL- and AmpC-producing *Enterobacteriaceae* from diseased companion animals in Europe. *Microb Drug Resist* 26: 643-650.
- Clinical Laboratories Standards Institute. (2016) Performance Standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved Standard CLSI Document M2, 2014. Clinical Laboratories Standards Institute, Wayne. PA EUA.
- Coque, T.M., Baquero, F., Canton, R. (2008) Increasing prevalence of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. *Eurosurveillance* 13: **19044**.
- Coutinho, F. H., Silveira, C. B., Pinto, L. H., Sallotô, G. R. B., Cardoso, A. M., Martins, O. B., *et al.* (2014) Antibiotic resistance is widespread in urban aquatic environments of Rio de Janeiro, Brazil. [Microb Ecol](#) 68: 441-452.
- Czekalski, N., Sigdel, R., Birtel, J., Matthews, B., Bürgmann, H. (2015) Does human activity impact the natural antibiotic resistance background? Abundance of antibiotic resistance genes in 21 Swiss lakes. *Environ Int.* 81: 45- 55.
- Derrien, M., Jardé, E., Gruau, G., Pourcher, A. M., Gourmelon, M., Jadas-Hécart, A., Pierson Wickmann, A. C. (2012) Origin of fecal contamination in waters from

- contrastes areas: Stanols as Microbial Source Tracking markers. *Water Res* 46: 4009 – 4016.
- Dienstmann, R., Picoli, S. U., Meyer, G., Schenkel, T., Steyer, J. (2010) [Avaliação fenotípica da enzima *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) em *Enterobacteriaceae* de ambiente hospitalar]. [J Bras Patol Med Lab](#)46: 23- 27.
- Farouk, F., Azzazy, H. M., Niessen, W. M. (2015) Challenges in the determination of aminoglycoside antibiotics, a review. [Anal Chim Acta](#) v. 890: 21- 43.
- Gonçalves, V. D., Lengruher, F. B., Fonseca, B. O., Pereira, R. M. S., de Melo, L. D. B., *et al.* (2015) Detection and characterization of multidrug-resistant enterobacteria bearing aminoglycoside-modifying gene in a university hospital at Rio de Janeiro, Brazil, along three decades. *Biomédica*, Rio de Janeiro: v. 35, p. 117-124. 2015.
- Gonçalves, V. D., Meirelles-Pereira, F., Cataldo, M., Esposto E. M., Esteves, F. A. *et al.* (2014) The use of antimicrobials in selective coliform media as a tool for quantifying resistant bacteria in aquatic ecosystems in Rio de Janeiro, Brazil. *Rev. ciênc. méd. biol.*, Salvador, v. 13, p. 38-41.
- Henriques, I. S., Araújo, S., Azevedo, J. S. N., Alves, M. S., Chouchani, C., Pereira, A., Correia, A. (2012) Prevalence and diversity of carbapenem-resistant bacteria in untreated drinking water in Portugal. [Microb Drug Resist](#) 18: 531- 537.
- Ibekwe, A. M., Murinda, S. E., Graves A. K. (2011) Genetic diversity and antimicrobial resistance for *Escherichia coli* from human and animal sources uncovers multiple resistances from human sources. *PLoS ONE* 6: e20819.
- Ishida, Y., Ahmed, A. M., Mahfouz, N. B., Kimura, T., El-Khodery, S. A., Moawad, A. A., Shimamoto, T. (2010) Molecular analysis of antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria isolated from fish farms in Egypt. *J Vet Med Sci* 72: 727-734.
- Krummerer, K. (2004) Resistance in the environment. *J Antimicrob Chemother* 54: 311-320.
- Lupo, A., Cyne, S., Berendonk, T. U. (2012) Origin and evolution of antibiotic resistance: the common mechanisms of emergence and spread in water bodies. *Front Microbiol* 3: 1-13.
- [Magiorakos, A.P., Srinivasan, A., Carey, R. B.; Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., \*et al.\* \(2012\)](#) Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol and Infect* v. 18, p. 268-281.
- Martínez, J. L. (2009) Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environ Pollut* 157: 2893-2902.

- Martins, V. V., Zanetti, M. O. B., Pitondo-Silva, A., Stehling E. G. (2014) Aquatic environments polluted with antibiotics and heavy metals: a human health hazard. *Environ Sci Pollut R* 21: 5873-5878.
- Meirelles-Pereira, F., Pereira, A. M. S., Silva, M. C. G., Gonçalves, V. D., Brum, P. R., Castro, E. A. R., Pereira, J. A. A. (2002) Ecological aspects of the antimicrobial resistance in bacteria of importance to human infections. *Braz J Microbiol* 33: 287-293.
- Murray, R. K., Granner, D. K., Mayer, P. A., RODWELL, V. W. (2007) *Bioquímica*. 14th ed São Paulo, Bra Harper.
- Nogueira, B. A., Olivella, J. G. B., Gil, A. C., Meirelles-Pereira, F., Gonçalves, V. D. *et al.* (2015) Detection of bacterial samples on the aquatic ecosystems adjacent to Saquarema Lagoon – Rio de Janeiro. *Rev Ciênc Méd Biol* 14: 147-152.
- Oliveira, A. J. F. C., França, P. T. R., Pinto, A. B (2009) Antimicrobial resistance of heterotrophic marine bacteria isolated from seawater and sands of recreational beaches with different organic pollution levels in southeastern Brazil: evidences of resistance dissemination. *Environ Monit Assess* s10661-009-1180-6.
- Pitout, J. D. D., Hossain, A., Hanson, N. D. (2004) Phenotypic and molecular detection of CTX-M beta-lactamases produced by *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. *J Clin Microbiol* 42: 5715-5721.
- Rupp M.E., Fey P.D. (2003) [Extended spectrum beta-lactamase \(ESBL\)-producing \*Enterobacteriaceae\*: considerations for diagnosis, prevention and drug treatment](#). *Drugs* 63(4):353-65. Review.
- Said, L. B., Jouini, A., Klibi, N., Dziri, R., Alonso, C. A., Boudabous, A., *et al.* (2015) Detection of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Enterobacteriaceae* in vegetables, soil and water of the farm environment in Tunisia. *Int J Food Microbiol* 203: 86- 92.
- Salloto, G. R. B., Cardoso, A. M., Coutinho, F. H., Pinto, L. H., Vieira, R. P., Chaia, C. *et al.* (2012) Pollution impacts on bacterioplankton diversity in a tropical urban Coastal Lagoon System. *PLoS ONE* 7: e51175.
- Tacão, M., Correia, A., Henriques, I. (2015) Low prevalence of carbapenem-resistant bacteria in river water: resistance is mostly related to intrinsic mechanisms. [Microb Drug Resist](#) 21: 497- 506.
- Van Hoek, A. H. A. M., Veenman, C., Van Overbeek, W. M., Lynch, G.; Husman, A. M. R.; Blaak, H. (2015) Prevalence and characterization of ESBL- and AmpC-producing *Enterobacteriaceae* on retail vegetables. [Int J Food Microbiol](#) 204: 1- 8.

- Xiong, W., Sun, Y., Zhang, T., Ding, X., Li, Y., Wang, M., Zeng, Z. (2015) Antibiotics, antibiotic resistance genes and bacterial community composition in fresh water aquaculture environment in China. [Microb Ecol](#) 70: 425- 432.
- Zhao, J. Dang, H. (2012) Coastal seawater bacteria harbor a large reservoir of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in Jiaozhou Bay, China. *Microb Ecol* 64: 187-199.
- Zowawi, H. M., Forbe, B. M., Alfaresi, M., Alzarouni, A., Farahat, Y., Chong, T. M., *et al.* (2015) Stepwise evolution of pandrug-resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *Sci Rep* 5: 15082.

Table 1:

<b>Primer</b>	<b>Sequence 5' → 3'</b>	<b>bp</b>	<b>Reference</b>
TEM-F	TTG GGT GCA CGA GTG GGT TA	503 bp	Arlet e Philipon (1991)
TEM-R	TAA TTG TTG CCG GGA AGC TA		
SHV-F	TCG GGC CGC GTA GGC ATG AT	625 bp	Arlet e Philipon (1991)
SHV-R	AGC AGG GCG ACA ATC CCG CG		
CTX-M-1-F3	GAC GAT GTC ACT GGC TGA GC	499 bp	Pitout et al (2004)
CTX-M-1-R2	AGC CGC CGA CGC TAA TAC A		
TOHO-1-2F	GCG ACC TGG TTA ACT ACA ATC	351 bp	Pitout et al (2004)
TOHO-1-1R	C CGG TAG TAT TGT CCT TAA GCC		

Table 2:

Collection site	Espécie	Perfil de resistência
Jacarepaguá lagoon	Ec9G	CFL/CFZ/CRX/CTX/CRO/GEN/AMI/AMP/AMC/CIP NOR/SUT/TET
Jacarepaguá lagoon	Ec11G	CFZ/CRX/CTX/GEN/KAN/TOB/AMP/CIP/NOR/SUT/TET
Jacarepaguá lagoon	Ec12G	CFL/CFZ/CRX/CTX/CRO/GEN/AMP/PPT/AMC/ASB/CIP NOR/IMI/SUT/TET
Jacarepaguá lagoon	Ec13G	CRX/CTX/GEN/AMI/AMP/NOR/SUT/TET
Jacarepaguá lagoon	Ec8CFL	CFL/CFZ/CRX/CTX/CRO/CAZ/CPM/AMI/KAN/AMP/NOR IMI/ETP/MER/ATM/CLO
Jacarepaguá lagoon	Ec12CFL	CFL/CFZ/CRX/CTX/CRO/CPM/AMI/KAN/AMP/AMC ASB/CIP/NOR/IMI/ETP/MER/TET
Jacarepaguá lagoon	Ec16CFL	CFL/CFZ/CFO/CRX/CTX/CRO/CAZ/CPM/AMI/KAN/TOB AMP/IMI/ETP/MER/ATM/SUT
Jacarepaguá lagoon	Eag17CFL	CFL/CFZ/CFO/CRX/CTX/CRO/CAZ/CPM/KAN/PPT/NOR IMI/ETP/ATM
Jacarepaguá lagoon	Eag21CFL	CFL/CFZ/CFO/CRX/CTX/CRO/CAZ/COM/AMI/KAN IMI/ETP/ATM
Jacarepaguá lagoon	Eag23CFL	CFL/CFZ/CFO/CTX/CRO/CAZ/CPM/GEN/AMI/KAN ETP/ATM/SUT/TET
Jacarepaguá lagoon	Ec28CFL	CFL/CFZ/CRX/CTX/GEN/AMP/NOR/TET
Marapendi lagoon	Eag1CFL	CFL/CFZ/CFO/CRX/CTX/CRO/CAZ/COM/GEN/KAN TOB/AMP/IMI/ETP/ATM
Marapendi lagoon	Eag2CFL	CFL/CFZ/CFO/CRX/CTX/CRO/CAZ/CPM/GEN/KAN TOB/IMI/ETP/ATM
Marapendi lagoon	Eag3CFL	CFL/CFZ/CFO/CRX/CTX/CRO/CAZ/COM/GEN/KAN TOB/ETP/ATM
Marapendi lagoon	Eag5CFL	CFL/CFZ/CFO/CRX/CTX/CRO/CAZ/COM/GEN/KAN TOB/ETP/ATM/CLO
Marapendi lagoon	Eag15CFL	CFL/CFZ/CFO/CRX/CTX/CRO/CAZ/CPM/GEN/KAN TOB/ETP/ATM
Marapendi lagoon	Eag23CFL	CFL/CFZ/CFO/CRX/CTX/CRO/CAZ/CPM/GEN KAN/TOB/ETP/ATM
Marapendi lagoon	Eag26CFL	CFL/CFZ/CFO/CRX/CAZ/KAN/TOB/ETP
Marapendi lagoon	Eg28CFL	CFL/CFZ/CFO/CRX/CTX/CRO/CAZ/CPM/KAN TOB/ETP/ATM
Marapendi lagoon	Eag2G	CFL/CFZ/CFO/CRX/CTX/CRO/CAZ/CPM/GEN/AMI KAN/TOB/NOR/ETP/ATM
Marapendi lagoon	Eag5G	CFZ/CFO/CRX/CTX/CRO/CAZ/COM/GEN/AMI KAN/TOB/PPT/AMC/ASB/CIP/NOR/IMI/ETP/ATM/SUT
Marapendi lagoon	Eag7G	CFZ/CFO/CRX/CTX/CRO/CAZ/COM/GEN/AMI/KAN TOB/ETP/ATM/SUT
Marapendi lagoon	Eag11G	CFZ/CFO/CRX/CTX/CRO/CAZ/GEN/AMI/KAN/TOB CIP/ETP/ATM
Marapendi lagoon	Eag14G	CFZ/CFO/CRX/CTX/CRO/CAZ/GEN/AMI/KAN/TOB CIP/ETP/ATM



Marapendi lagoon	Ec15G	CFL/CTX/GEN/KAN/TOB/AMP/AMC/ASB/NOR/SUT/TET
Camorim channel	Kp1CFL	CFL/CFZ/CFO/CRX/CTX/CRO/CAZ/CPM/KAN/AMP/PPT AMC/ASB/IMI/ATM
Camorim channel	Ec8CFL	CFL/CFZ/CFO/CTX/CRO/CAZ/AMP/PPT/AMC/CIP/TET
Camorim channel	Ec14CFL	CFL/CFZ/CRX/CRO/COM/CIP/NOR/IMI/TET
Camorim channel	Kp1G	CFL/CFZ/CRX/CTX/CRO/GEN/AMP/CIP/NOR/SUT
Camorim channel	Kp3G	CFL/CFZ/CRX/CTX/CRO/GEN/AMP/CIP/NOR
Camorim channel	Eag5G	CFL/CFZ/CRX/CX/CRO/GEN/AMP/AMC/NOR/SUT/TET
Camorim channel	Ec8G	CFL/CFZ/CTX/GEN/AMI/TOB/AMP/AMC/ASB/CIP/NOR/TET

---

Table 3:

Strains	Collection site	Phenotypic tests	<i>bla<sub>TEM</sub></i>	<i>bla<sub>SHV</sub></i>	<i>bla<sub>TOHO</sub></i>	<i>bla<sub>CTX-M</sub></i>
Ec12CFL	Jacarepaguá lagoon	-	-	-	-	-
Ec15CFL	Jacarepaguá lagoon	+	+	-	-	-
Ec16CFL	Jacarepaguá lagoon	+	+	-	-	-
Ye18CFL	Jacarepaguá lagoon	-	-	-	-	-
Eag29CFL	Jacarepaguá lagoon	-	-	-	-	-
Eag2CFL	Marapendi lagoon	-	-	-	-	-
Eag3CFL	Marapendi lagoon	-	-	-	-	-
Eag5CFL	Marapendi lagoon	-	-	-	-	-
Eag23CFL	Marapendi lagoon	-	-	-	-	-
Eag2G	Marapendi lagoon	+	+	-	-	-
Eag5G	Marapendi lagoon	+	+	-	-	-
Eag7G	Marapendi lagoon	+	+	-	-	-
Eag11G	Marapendi lagoon	+	+	-	-	-
Eag14G	Marapendi lagoon	+	+	-	-	-
Kp1CFL	Camorim channel	+	-	+	-	-
Ec8CFL	Camorim channel	+	+	-	-	-

**APÊNDICE D** – Artigo submetido – Study of multidrug resistant Enterobacteria isolated from river Waters flowing to Guanabara Bay (Rio de Janeiro, Brazil) and from clinical samples of hospital origin

### Original article

**Running title: Multidrug-resistant Enterobacteria**

**Título corto: Enterobacterias multirresistentes**

**Study of multidrug-resistant Enterobacteria isolated from river waters flowing to Guanabara Bay (Rio de Janeiro, Brazil) and from clinical samples of hospital origin**

**Estudio de Enterobacterias multidrogo-resistentes aisladas en aguas de los ríos que desembocan en la Bahía de Guanabara y en muestras de origen hospitalar de Rio de Janeiro, Brasil**

Verônica Dias Gonçalves<sup>1\*</sup>, Frederico Meirelles-Pereira<sup>2</sup>, Márcio Cataldo<sup>1</sup>, Bianca de Oliveira Fonseca<sup>1</sup>, Barbara Araujo Nogueira<sup>1</sup>, Julianna Giordano Botelho Olivella<sup>1</sup>, Francisco Assis Esteves<sup>2</sup>, Ana Luiza Mattos-Guaraldi<sup>1</sup>, Arnaldo Feitosa Braga de Andrade<sup>1</sup>, Alexandre Ribeiro Bello<sup>1</sup>, José Augusto Adler Pereira<sup>1</sup>

1) Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Faculdade de Ciências Médicas, UERJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

2) Laboratório de Limnologia, Departamento de Ecologia, Centro de Ciências da Saúde, UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

Autor responsable de la correspondencia: Verônica Dias Gonçalves.

Dirección: Departamento de Microbiología, Inmunología y parasitología, Facultad de Ciencias Médicas, UERJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. Av. Professor Manuel de Abreu, 444/ 3º andar, CEP: 20550-170, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Teléfono: +55 (21) 2868-8280. Fax: +55 (21) 2868-8376.

Dirección electrónica: [kaiura@bol.com.br](mailto:kaiura@bol.com.br)

### ABSTRACT

**Introduction:** The use of antibiotics in humans, husbandry and veterinary activities induces selective pressure, leading to the colonization and infection by resistant strains.

**Objective:** Water samples collected from rivers of Guanabara Bay, which suffered minor and major environmental degradation and clinical samples of hospital origin

were evaluated, to detect evidence of the presence of resistance genes to Aminoglycosides, Beta-lactamics and Fluoroquinolones in strains of *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae* and *Escherichia coli*.

**Material and Methods:** For isolation of the water strains were employed culture media containing 32 µg/mL cephalotin and 8 µg/mL gentamicin. The strains from clinical materials were selected using culture media containing 8 µg/mL gentamicin. The strains were identified and submitted to Antimicrobial Susceptibility Tests (AST), plasmid DNA extraction and tests of the Polymerase Chain Reaction (PCR) to detect genes encoding enzymes modifying aminoglycosides (EMA), ESBL e plasmid mechanisms of quinolone resistance (PMQR).

**Results:** The AST of the isolates recovered from water samples showed multidrug-resistance profiles, similar to that found in isolates recovered from clinical materials. All isolates from water samples and 90% of the isolates of clinical samples showed at least one plasmid band. In the PCR assays, 7.4% of the isolates recovered of samples of water and 20% of the isolates of clinical materials showed amplification products for the three antimicrobial classes.

**Conclusion:** We believe that the detection of microorganisms presenting genetic elements in environments as water is necessary to prevention and control of dissemination to these microorganisms with potential to infect humans and other animals in eventual contact with these environments.

**Key words:** Multidrug-resistance, *Enterobacteriaceae*, plasmids, Environmental degradation, Wastewater.

## RESUMEN

**Introducción:** El uso de antibióticos en seres humanos, industria pecuaria y en actividades veterinarias induce una presión selectiva que conduce a la colonización e infección por cepas resistentes

**Objetivo:** Determinar la presencia de genes de resistencia a Aminoglucósidos, Beta-lactámicos y Fluoroquinolonas en cepas de *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae* y *Escherichia coli*, obtenidas en muestras de agua de los ríos que desembocan en la Bahía de Guanabara y en muestras clínicas de hospitales de Rio de Janeiro

**Material y métodos:** En la selección de cepas resistentes obtenidas de agua de los ríos fueron empleados medios de cultivo que contenían 32  $\mu\text{g}$  / ml de cefalotina y 8  $\mu\text{g}$  / ml de gentamicina. En el caso de las muestras de especímenes clínicos se usaron medios de cultivo que contenían 8  $\mu\text{g}$  / ml de gentamicina. Las cepas fueron identificadas y sometidas a pruebas de susceptibilidad antimicrobiana (PSA), extracción de ADN plasmídico y pruebas de reacción en cadena de la polimerasa (RCP) para detectar genes que codifican enzimas que modifican aminoglicósidos (EMA), BLEE y mecanismos de resistencia a quinolonas mediados por plásmidos (RQMP).

**Resultados:** Fueron encontrados perfiles de resistencia a los antimicrobianos similares en los dos grupos. En todas las bacterias obtenidas de las muestras de agua y en 90% de las muestras clínicas fueron demostradas bandas de plásmidos asociados a transferencia de genes de resistencia. Utilizando RCP fueron observados productos de amplificación de los genes de resistencia para las tres clases de antimicrobianos analizados (en 7,4% de las bacterias recuperadas de muestras de agua y en 20% de las bacterias recuperadas de especímenes clínicos).

**Conclusión:** Detectar microorganismos con elementos genéticos que confieren resistencia a los antibióticos en ambientes, como agua, es una estrategia necesaria para prevenir y controlar la diseminación de estos patógenos con potencial para infectar a humanos y otros animales que puedan entrar en contacto con estos ambientes.

**Palabras clave:** multirresistencia, Enterobacteriaceae, plásmidos, degradación ambiental, aguas residuales.

## INTRODUCTION

It is well known that the use of broad-spectrum antibiotics, such as, aminoglycosides, third and fourth cephalosporin's generation and fluoroquinolones enables the selection of opportunistic multidrug resistance bacteria which can colonize inpatients and, in some cases, cause serious infection with difficult treatment (1,2). The human intestine as of many warm-blooded animals is known to harbor bacteria capable of causing infections in hospitals and in the community (3,4).

In the natural environment, selection of multidrug resistance bacteria may occur due to the production of antibiotic compounds by soil bacteria, but also due to discharges of human and animal fecal matter which may contain antimicrobial drug residues

(5,6). Some resistance encoding genes may be chromosomal housekeeping genes involved in the bacterium own protection against antimicrobial compounds produced by themselves or by other bacteria in the surrounding environment (6,7).

Additionally, some antimicrobial drugs are still used in animal farms and aquaculture as growth promoters and as prophylactic measures which also cause an artificial selection of antimicrobial resistance bacteria (8-10). The use of antimicrobial drugs in humans, animal husbandry and veterinary care may enable the selection of bacterial strains with potential resistance traits resulting in host colonization and infection by different bacteria, such as those belonging to the *Enterobacteriaceae* family. This event may result in the appearance of bacteria with different resistance profiles which will challenge treatment programs (11,12).

Another major concern is the existence of mobile genetic elements in some bacteria, elements such as, plasmids; gene cassettes and transposons can assemble blocks of resistance genes and transfer them horizontally enabling other bacteria do acquire genes encoding for resistance mechanisms to several antimicrobial drugs (13-15).

Several bodies of water have had their ecosystem seriously compromised by Human practices and life style. The discharges of households, hospitals and industrial residues to bodies of water without previous appropriate treatment has added to the problematic of bacterial antimicrobial resistance dissemination throughout these environments which are used by humans and animals in many ways, hobby, professionally or for survival, but these users may become colonized or infected by resistant bacteria present (16-18).

Guanabara Bay with its 380 Km<sup>2</sup> is the second largest bay in Brazil involving the all Rio de Janeiro city cost line and has suffered intense degradation for many years caused by population growth and industry development (19). The purpose of this work was to identify specific genes encoding EMA, ESBL and PMQR in *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, *E. coli* and *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae* strains which were isolated from Guanabara bay water and hospital clinical material and thus to understand the dissemination of mobile genetic elements, and their resistance traits, in the natural environment and in hospital settings.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Strain selection**

Thirty-seven strains were studied, 26 *E. coli*, nine *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* and two *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae*. These strains were isolated from water collected in rivers that flow to Guanabara Bay and from clinical specimens collected at a University hospital in Rio de Janeiro city. Environmental samples were collected at Guapimirim, Caceribu and Guaxindiba rivers and in Magé channel (Guapimirim Environmental Protected Area - Magé-RJ) in April 2009 (Figure 1). Collection also took place in rivers belonging to Fundão Island (in two different areas), Bica's beach (Governador Island) and Mangue channel in July 2009 (Figure 1).

### **Strain isolation from clinical material**

A selection criterion was resistance to gentamicin. Colonies growing in Eosin Methylene Blue (EMB - OXOID) media containing 8µg/mL of gentamicin (Sigma) were selected.

### **Strain isolation from water samples**

Sterile flasks were used to collect the water sample which were transported on ice to the laboratory within 6 hours and tested straight after arrival. A selection criterion was resistance to gentamicin as for the clinical samples, but also resistance to cephalotin, the latter determined by adding 32µg/mL of cephalotin (Sigma) into the EMB media. Collection was performed at low tide to determine the effect of higher hydrolytic pressure in the drained areas in study.

### **Antimicrobial susceptibility tests**

The AST was carried out using the agar diffusion method, according to the Clinical Laboratories Standards Institute – *CLSI* (20). *Escherichia coli* strain ATCC 25922 was used as control. The following antimicrobial agents were used with their respective potencies: cotrimoxazol (Sut- 25 µg), cephalotin (Cph- 30 µg), ceftazidime (Caz- 30 µg), cefoxitin (Fox- 30µg), cefotaxime (Ctx- 30 µg), cefuroxime (Crx- 30 µg), ceftriaxone (Cro- 30 µg), cephazoline (Cfz- 30 µg), aztreonam (Atm- 30 µg), ertapenem (Etp- 10 µg), imipenem (Ipm- 10 µg), cefepime (Cpm- 30 µg), piperacillin/tazobactam (Ppt- 100/10 µg), amoxillin/clavulanic acid (Amc- 20/10 µg), Ampicillin/sulbactam (Asb- 10/10 µg), chloramphenicol (Chl- 30 µg), ciprofloxacin (Cip- 5 µg), norfloxacin (Nor- 10 µg), tetracycline (Tet- 30 µg), ampicillin (Amp- 10 µg), gentamicin (Gen- 10 µg), amikacin (Ak- 30 µg), kanamycin (Kan- 30 µg), tobramycin (Tob- 10 µg).

The isolates resistant to second and third cephalosporin's generation in AST were submitted to confirmatory tests of ESBL production by the double-disc synergy test and the approximation test, according to CLSI (21). *Klebsiella pneumoniae* strain ATCC 700603 was used as the test control.

### **Plasmid extraction**

Plasmid extraction was performed on all strains following Gonçalves et al (22). Were used the *E. coli* R861 strain plasmid DNA as weight marker and the *E. coli* K12 R23 as negative control.

### **Gene detection by PCR**

PCR was performed, using primers compatible with ESBL, EMA and PMQR, in all *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae* and *E. coli* strains which were resistant to any antimicrobial drug tested in the AST following the work developed by Arlet & Philipon (23), Pitout et al (24), Van de Klundert & Vliegenthart (25) and Jiang et al (26). Isolates showing resistance to carbapenems were sent to the Healthcare Associated Infections Laboratory- LAPIH of Oswaldo Cruz institute (FIOCRUZ) to perform identification of *bla<sub>KPC</sub>* gene according to Yigit et al (27). TABLE I show all primers used in the PCR reactions and the expected amplicon sizes.

## **RESULTS**

### **Strain isolation from clinical material**

Were isolated five strains of *K. pneumoniae* subsp. *Pneumoniae* and five strains of *E. coli* from the EMB media containing gentamicin.

### **Strain isolation from water samples**

Were isolated 17 *E. coli*, four *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* and one *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae* from the media containing gentamicin and four *E. coli* and one *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae* from the media containing cephalotin.

### **Antimicrobial susceptibility testing and ESBL confirmation test**

To determine the resistance profiles of all isolated strains there were used different classes of antimicrobial drugs, classes ranging from the first used in therapeutics to the ones latest introduced. There were some differences between strains isolated from media supplemented with gentamicin to the ones isolated from media supplemented with cephalotin in the water samples. Within all the isolates obtained from gentamicin media, eight (36.4%) were resistant to cephalotin on the



AST and within the isolates obtained from cephalotin media, two (40%) were resistant to gentamicin on the AST. Also in water isolates, 10 (37%) isolates showed multidrug-resistance profiles similar to the ones displayed by clinical isolates, thus being resistant to drugs used specifically in healthcare settings. Twelve isolates were tested to confirm the presence of ESBL enzymes and 11 (91.7%) of them were positive. Fourteen (51.8%) isolates showed resistance to ciprofloxacin and norfloxacin. Four (14.8%) isolates showed resistance to amikacin and one isolate from Caceribu river and one isolate from Mage channel were resistant to cefepime, a fourth generation cephalosporin usually only used in hospitals. Furthermore, four isolates from Bica's beach, one isolate from Mangue channel and two isolates from Fundão island II were all resistant to cefepime. One isolate of *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae*, also from Fundão island II, was resistant to ertapenem (TABLE II).

Regarding the clinical isolates, eight (80%) showed a multidrug-resistant profile typical in hospital settings. All ten isolates were resistant to amikacin, five (50%) were sensitive to chloramphenicol, six (60%) exhibited resistance to ciprofloxacin and norfloxacin and four (40%) isolates resistance to cefepime. Additionally, three (30%) isolates showed resistance to imipenem and ertapenem which may indicate carbapenemases production and five (50%) isolates indicated to harbor ESBL production (TABLE III)

### **Plasmid DNA extraction**

All water isolates showed a positive result for at least one plasmid type by PCR, although only none (90%) isolates from clinical samples were positive for at least one plasmid type.

### **Polymerase Chain Reaction (PCR)**

Within all the water isolates collected at Guanabara bay, nine (37.5%) showed PCR amplicon specific to EMA, two (18.2%) isolates only for ESBL and one (16.6%) isolate merely for PMQRs. Seven (63.3%) isolates had positive amplification for both EMA and ESBL encoding genes. Two (7.4%) isolates showed presence of EMA, ESBL e PMQR encoding genes. Within the clinical isolates, two (20%) isolates showed gene amplification for EMA and only one (20%) for ESBL. Three (60%) isolates presented an amplicon for both EMA and ESBL; one (16%) isolate for ESBL and PMQR and two (20%) isolates had PCR positive results for all EMA, ESBL and PMQR encoding genes.

TABLE II displays all information regarding water isolates which were positive for at least one of the studied genes, as collection site, most relevant environment parameters, resistance profiles and amplified genes by PCR. In the other hand, TABLE III shows the information regarding the clinical isolates, such as, type of specimen, hospital ward and antimicrobial resistance profile and amplified genes by PCR.

## **DISCUSSION**

The number of bacterial strains resistant to antimicrobial drugs has been increasing considerably in the natural environment, due to the vast use of these drugs in hospitals and in the community as well as in animal husbandry and veterinary care. Augmentation of this problem occurs due to the hospital sewage dumping in the natural environment, particularly in bodies of water, which allows the dissemination of bacterial strains harboring resistant and virulent mechanisms throughout the natural environment. This latter fact may contribute to an outbreak of massive proportions and may also allow the dissemination of mobile genetic elements carrying resistant genes and concomitant virulent genes.

Water sample collection was performed in two different areas of Guanabara Bay, areas substantially distinct from each other, regarding their ecology and preservation practices and legislation. In protected area of Guapimirim it is supposed to find good quality water for human consumption and recreation, together with well-preserved mangrove. Differently, the Fundão and Governador islands are known to be strongly affected by massive discharges of treated and untreated human and animal sewage due to the vast population nearby.

It was possible to notice no differences between resistance profile on the isolates from Guapimirim area, Fundão Island, Governador Island and Mangue channel, although, Guapimirim isolates showed resistance profiles less diverse within different antimicrobial classes. In all collection sites of Guapimirim area there was at least one isolate showing resistance profile compatible with hospital strains which are known to be submitted to more severe antimicrobial drugs.

According to Negreiros et al (28), the population growth and industry development, including pharmaceutical industries, surrounding these bodies of water have been contributing to their degradation. The authors also state that there is a massive agricultural activity in the vicinities of these bodies of water. Besides its

privileged geographical location these areas have been affected by the lack of sewage treatment infrastructures and policies unable to fulfill the demand of population growth.

The majority of multidrug resistant strains were, expectedly, isolated in the areas where higher human impact is observed.

It cannot be discharged the fact that bacteria with resistant genes, enclosed in plasmids, may be disseminated to the bodies of water and humans might be colonized with these strains, by using the water for consumption, recreational or professional reasons (29,30). Prado et al (31) demonstrated the presence of *K. pneumoniae* multidrug resistant strains in water samples collected from hospital sewage treatment facilities. The latter authors observed that almost 50% of the isolates were positive for beta-lactamic enzyme production and inside these group, 70% were resistant to gentamycin and 10% resistant to ciprofloxacin. In the present study, 80% of the water isolates belonged to *E. coli* and within these, 52% was collected in the Guapimirim protected area noticing some multidrug resistant isolates; this may indicate that these areas might be subjected to untreated e dumping.

Regarding the clinical isolates, the use of selective agar media supplemented with gentamycin did not allow the isolation of an enormous amount of isolates, although it was obtained a vast percentage of multidrug-resistance. According to Magiorakos et al (32) resistance to gentamycin may indicate a multidrug-resistant profile.

Water isolates collected in all sites exhibited plasmids with different weights even those strains with intrinsic resistant which were not submitted to antimicrobial pressure. Likewise, clinical isolates presented plasmids with different weights. Vaydia (14) studying *E. coli* e *K. pneumoniae* from clinical origin containing plasmids and showing resistance to beta-lactamic and other antimicrobials, identified by conjugation, the transference of genes encoding those traits.

In this study it was detected by PCR the presence of genes encoding resistance to the antimicrobial groups proposed for this study. The water isolates Ec 4Ge e Kp 8Gb<sub>1</sub>, collected at Mage and Mangue channels, showed genes encoding for resistance to the three groups of antimicrobial drugs, as well as the isolates Kp 7438 e Kp7474, collected from clinical specimen; peritoneal fluid and end of Tenckoff catheter, respectively.

Previous studies have described the existence of Enterobacteriaceae strains, isolated from food, water and clinical specimens associated to human infections,

harboring genes encoding resistance to different antimicrobial classes and different genes encoding for the same antimicrobial class. Ryu et al (33) reported the existence of integrons containing genes encoding resistance to ESBLs, EMAs and tetracycline in *E. coli* strains isolated from meat fish and seafood in Korea. Shin et al (2) isolated from clinical specimens in Korea, *E. coli* and *K. pneumoniae* strains resistant to aminoglycosides, including gentamycin, harboring genes encoding for ESBLs and PMQRs associated with integrons enclosed in plasmids transferable by conjugation.

Gene *aacC2* was detected in 58.3% of the water isolates and 70% of the clinical isolates. Gonçalves et al (34) detected this gene in clinical isolates containing a transposon and insertion sequences (*IS*) this fact may indicate that this gene is vastly disseminated in hospital settings, water, soil and natural environment. Genes found in bacteria isolated from water and animals are similar to those found in pathogenic bacteria isolated from clinical specimens, furthermore, mobile genetic elements, such as, integrons and transposons, are certainly involved in the transfer of these.

All water isolates showing positive result for ESBL confirmatory test had at least one ESBL encoding gene amplified by PCR. Encoding genes for ESBL production are generally the same between isolates collected from the natural environment, animals and humans. Coque et al (35) advice for the need of an environmental surveillance to identify bacterial clones capable to produce ESBLs in the community and the natural environment.

Isolate Koz 6CFL from water sample collected at Fundão island II and isolate Kp 2141b isolated from different secretion, revealed resistance to fourth cephalosporin's generation and carbapenems in the AST, even though, both the confirmatory test for carbapenem enzyme production and PCR for *bla<sub>KPC</sub>*, were negative. Thus resistance to imipenem and ertapenem seem to be associated to other resistance mechanisms.

Leavitt et al (36) identified *K. pneumoniae* strains resistant to ertapenem which were not carbapenemases producers but instead harboring genes for CTX-M, SHV and TEM associated to changes in the cell wall permeability due to a lack of gene expression for cell wall membrane proteins. In the present study, isolate Koz 6CFL showed the presence of genes encoding for CTX-M, SHV and TEM, while isolate Kp 2141b only presented encoding genes for CTX-M. The existence of these encoding genes in clinical isolates will have serious consequences for antibiotic therapy and their presence in environmental isolates may indicate discharge into the natural

environment sewage improperly treated which may contain antimicrobial drug residues and/or bacteria carrying resistance genes in mobile genetic elements.

Strains Ec 1Gd, Ec 4Ge and Kp 8Gb<sub>1</sub> isolated from Guapimirim river, Magé river and Manguê channel, respectively, showed PCR results positive for *qnrB* gene. Takasu et al (37) detected the presence of *qnrB* in bodies of water isolates in Vietnam concluding that the presence of this gene in isolates originated from bodies of water is not associated to the use of quinolone antimicrobials in animal husbandry, aquaculture or infections control. Although, the existence of these genes in *natura* is not yet proven to be intrinsic to the bacterial genome. According to Strahilevitz et al (38) the origins of *qnr* family genes was not only in environmental bacteria but also in bacteria isolated from humans and animals. Nordman e Poirel (39) stated that *qnr* genes in Enterobacteriaceae can be associated to ESBLs, CTX-M-1 or CTX-M-9 which may indicate that genes encoding beta-lactamases and quinolone resistance mechanisms may be located in the same plasmid with possibility of transfer to other species.

The presence in hospital settings of Enterobacteriaceae strains harboring resistance genes to several classes of antimicrobial drugs or several genes encoding for one same class is a well established fact (40). Besides the small bacterial population analyzed in the present study, it was possible to detect a representative group, with well discernible characteristics, which is occurring in hospitals all over the world. In a study by Minarini et al (41), Enterobacteriaceae strains harboring *qnr* genes were isolated from outpatients in several Brazilian states. Although the clinical isolates in this study come from inpatients, these results corroborate the ones from Minarini et al (41) showing that *qnrB* is more prevalent in Brazil than *qnrA*, while in the latter study samples from Rio de Janeiro state were not studied.

Öktem et al (42) studying *E. coli* and *K. pneumoniae* strains isolated from blood showing resistance to beta-lactamic and quinolone drugs, found a correlation between the existence of plasmids containing at least one beta-lactamases encoding gene, *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> or *bla*<sub>CTX-M</sub>, associated with the presence of *qnrA* gene. All the isolates in the study, except for Kp 2692, showed presence of plasmid by PCR testing. The existence of plasmids concomitantly harboring genes encoding resistance for different classes of antimicrobial drugs may promote dissemination of bacteria involved in infection of complex treatment (35).

Sewage treatment plants constitute a favorable environment for the selection and transfer of resistance genes between bacteria. Mokracka et al (43) studied the water from different sites at a sewage treatment plant and found *E. coli* strains containing integrons, even in samples from the end effluent, and some strains even had genes encoding for different antimicrobial classes. In the present study it was found an isolate (Kp 2Ge) from water collected at Caceribu river which containing the *aacC2*, *bla<sub>TEM</sub>*, *bla<sub>SHV</sub>* and the *bla<sub>CTX-M-1</sub>* genes. There was also an isolate (Ec 4Ge) from water collected at Magé channel enclosing *aacC2*, *bla<sub>TEM</sub>*, *bla<sub>CTX-M-1</sub>* and *qnrB* genes. Despite the fact that Caceribu River and Magé channel are part of a protected area, they have been degraded due to discharges of different anthropic residues. These results corroborate with the data from INEA (19).

Within the isolates from water samples collected in the areas of higher degradation, the isolates, Koz 6Gb and Koz 6CFL (collected at Fundão island II) contained *aacC2*, *bla<sub>TEM</sub>*, *bla<sub>SHV</sub>* and *bla<sub>CTX-M-1</sub>* genes. Isolates Ec 7Ga, Ec 7Gb, Ec 7Gc e Ec 7CFLd, from water samples collected at Bica's beach, showed presence of *aacC2*, *bla<sub>TEM</sub>* e *bla<sub>CTX-M-1</sub>* genes and isolate Kp8Gb from water samples collected at Mangue channel harbored the *aacC2*, *bla<sub>TEM</sub>*, *bla<sub>CTX-M-1</sub>* and *qnrB* genes.

Presence of *E. coli* strains in water samples is an indicator of fecal contamination (44). Multidrug-resistant *Enterobacteriaceae* strains which colonize human and animal intestines are continuously discharged to the natural environment and may cause serious opportunistic infections and behave as reservoirs for antimicrobial resistant genes. The genes identified in the present study indicate that the water bodies where samples were collected were exposed to sewage dumping from households, hospitals and industries, enabling the presence of bacteria with the latter characteristics in these natural bodies of water.

Procedures, such as, the proper use antimicrobial drugs in hospitals, veterinary care and aquaculture, may contribute to a more efficient control of the dissemination of bacteria harboring plasmids containing genes encoding for antimicrobial resistance mechanisms. It is clear the need of a committed effort to sustain an efficient microbiological monitoring and prevent the discharges of antimicrobial drugs residues and bacteria into the natural environment. It is also paramount the detection of multidrug-resistant bacteria in bodies of water as these are efficient ways for dissemination of bacteria and all the traits they carry.

## ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge Fiocruz/LAPIH/IOC/Brazil, particularly to Ana Paula D'Alincourt Carvalho Assef, PhD and Polyana Pereira, MSc for performing the KPC PCR and Dr. Julio Cesar Delgado Correal (Hospital Universitário Pedro Ernesto – HUPE/UERJ) for Spanish version of the abstract.

## FINANCIAL SUPPORT

This research was supported by grants from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil; Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Brazil; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brazil.

## CONFLICT OF INTEREST

Authors declare that no conflict of purchased.

## REFERENCES

1. **Ramphal R, Ambrose PG.** Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases and Clinical Outcomes: *Current Data. Clin Infect Dis* 2006; 42 (suppl 4): S164-172.
2. **Shin SY, Kwon KC, Park JW, Song JH, Ko YH, Sung JY, et al.** Characteristics of *aac(6)-Ib-cr* Gene in Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Isolated from Chungnam Area. *Korean J Lab Med* 2009; 29: 541-550.
3. **Harada K, Morimoto E, Kataoka Y, Takahashi T.** Clonal spread of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* isolates among pups in two kennels. *Acta Vet Scand* 2011; 53: 11-17.
4. **Alem N, Frikh M, Srifi A, Maleb A, Chadli M, Sekhsokh Y, et al.** Evaluation of antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* strains isolated in Rabat University Hospital (Morocco). *BMC Res Notes* 2015; 8: 392.
5. **Ajiboye RM, Solberg OD, Lee BM, Raphael E, DebRoy C, Riley LW.** Global Spread of Mobile Antimicrobial Drug Resistance Determinants in Human and Animal *Escherichia coli* and *Salmonella* Strains Causing Community-Acquired Infections. *Clin Infect Dis* 2009; 49: 365-71.
6. **Sengupta S, Chattopadhyay MK, Grossart H-P.** The multifaceted roles of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Front Microbiol* 2013; 4: 47.

7. **Martinez JL.** The role of natural environments in the evolution of resistance traits in pathogenic bacteria. *Proc R Soc B* 2009; 276: 2521–2530.
8. **Bonelli RR, Moreira BM, Picão RC.** Antimicrobial resistance among Enterobacteriaceae in South America: History, current dissemination status and associated socioeconomic factors. *Drug Resistance Updates* 2014; 17: 24–36.
9. **Bok E, Mazurek J, Stosik M, Wojciech M, Baldy-Chudzik K.** Prevalence of Virulence Determinants and Antimicrobial Resistance among Commensal *Escherichia coli* Derived from Dairy and Beef Cattle. *Int J Environ Res Public Health* 2015; 12: 970-985.
10. **Resende JA, Borges ML, Pacheco KD, Ribeiro IH, Cesar DE, Silva VL, et al.** Antibiotic resistance in potentially bacteriocinogenic probiotic bacteria in aquaculture environments. *Aquac Res*, 2017; 48: 2113-2119.
11. **Guenther S, Ewers C, Wieler LH.** Extended-spectrum beta-lactamases producing *E. coli* in wild life, yet another form of environmental pollution? Review Article. *Front Microbiol* 2011; 2: 246. <http://www.frontiersin.org/doi:103389/fmicb.2011.00246>.
12. **Jones-Dias D, Manageiro V, Graça R, Sampaio DA, Albuquerque T, Themudo P, et al.** QnrS1- and Aac(6')-Ib-cr-Producing *Escherichia coli* among Isolates from Animals of Different Sources: Susceptibility and Genomic Characterization. *Front. Microbiol* 2016; 7:671. <http://www.frontiersin.org/doi:103389/fmicb.2016.00671>.
13. **Giedraitienė, A., Vitkauskienė, A., Naginienė, R. and Pavilionis, A.** Antibiotic Resistance Mechanisms of Clinically Important Bacteria. *Medicina (Kaunas)* 2011; 47(3): 137-46.
14. **Vaidya, V.K.** Horizontal transfer of antimicrobial resistance by extended spectrum  $\beta$  lactamase-producing Enterobacteriaceae. *J Lab Physicians* 2011; 3:, 37-42.
15. **Lyimo, B., Buza, J., Subbiah, M., Temba, S., Kipasika, H., Smith, W., et al.** IncF Plasmids Are Commonly Carried by Antibiotic Resistant *Escherichia coli* Isolated from Drinking Water Sources in Northern Tanzania. Hindawi Publishing Corporation *Int J Microbiol* 2016; 7 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/3103672>.



16. **Ibekwe, A.M., Murinda, S.E. and Graves, A.K.** Microbiological Evaluation of Water Quality from Urban Watersheds for Domestic Water Supply Improvement. *Int J Environ Res Public Health* 2011; 8: 4460-4476.
17. **Bayram, A., Önsoy, H., Bulut, V.N. and Akinci, G.** Influences of urban wastewaters on the stream water quality: a case study from Gumushane Province, Turkey. *Environ Monit Assess* 2013; 185: 1285-1303.
18. **Derrien, M., Jardé, E., Gruau, G., Pourcher, A.M., Gourmelon, M., Jadas-Hécart, A., et al.** Origin of fecal contamination in waters from contrasted areas: Stanols as Microbial Source Tracking markers. *Water Res* 2012; 46: 4009-4016.
19. **INEA-** Instituto Estadual de Meio Ambiente. Available at <http://www.inea.rj.gov.br> Access on 15/02/2016.
20. **Clinical Laboratory Standards Institute.** Performance Standards for antimicrobial susceptibility testing. Twenty-fourth Informational Supplement M100-S24. Wayne, PA: CLSI; 2014.
21. **Clinical Laboratory Standards Institute.** Performance Standards for antimicrobial disk susceptibility testing. Approved Standard CLSI Document M2. Wayne, PA: CLSI; 2010.
22. **Gonçalves VD, Provençano AF, Espírito-Santo C, Bernardes O, Queiroz MLP, Bello AR, Pereira JAA.** Evaluation of different protocols for detection of enterobacterial plasmids codifying for antimicrobial resistance. *Sodebrás* 2013; 8 (84): 9-15.
23. **Arlet G, Philippon A.** Construction by polymerase chain reaction and use of intragenic DNA probes for three main types of transferable beta-lactamases (TEM, SHV, CARB). *FEMS Microbiol Lett* 1991; 66 (1): 19-25.
24. **Pitout JDD, Hossain A, Hanson ND.** Phenotypic and Molecular Detection of CTX-M- $\beta$ -Lactamases Produced by *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. *J Clin Microbiol* 2004; 42 (12): 5715–5721.
25. **van de Klundert JAM, Vliengenthart JS.** PCR detection of genes coding aminoglycoside-modifying enzymes. In: Persing DH, Smith TF, Tenover FC., White TJ Eds. Diagnostic molecular microbiology: principles and Applications. Rochester: Mayo Foundation 1993; 547-552.
26. **Jiang Y, Zhou Z, Qian Y, Wei Z, Yu Y, Hu S, et al.** Plasmid-mediated quinolone resistance determinants *qnr* and *aac(6')-Ib-cr* in extended-spectrum

- b-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in China. *J Antimicrob Chemother* 2008 61: 1003–1006.
27. **Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, et al.** Novel Carbapenem-Hydrolyzing  $\beta$ -Lactamase, KPC-1, from a Carbapenem-Resistant Strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45 (4): 1151-1161.
  28. **Negreiros DH, Araújo FP, Coreixas MA.** Nossos Rios. Niteroi: Instituto Baía de Guanabara 2002; 31p.
  29. **Oliveira AJFC, França PTR, Pinto AB.** Antimicrobial resistance of heterotrophic marine bacteria isolated from seawater and sands of recreational beaches with different organic pollution levels in southeastern Brazil: evidences of resistance dissemination. *Environ Monit Assess* 2010; 169: 375-384.
  30. **Zhao J-y, Dang H.** Coastal Seawater Bacteria Harbor a Large Reservoir of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Determinants in Jiaozhou Bay, China. *Microb Ecol* 2012; 64 (1): 187-199.
  31. **Prado T, Pereira WC, Silva DM, Seki LM, Carvalho APD'A, Asensi MD.** Detection of extended-spectrum b-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in effluents and sludge of a hospital sewage treatment plant. *Lett Appl Microbiol* 2008; 46: 136–141.
  32. **Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al.** Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect* 2012; 18: 268–281.
  33. **Ryu S-H, Park S-G, Choi S-M, Hwang Y-O, Ham H-J, Kim S-U, et al.** Antimicrobial resistance and resistance genes in *Escherichia coli* strains isolated from commercial fish and seafood. *Int J Food Microbiol* 2012; 152 (1-2): 14-18. <https://doi.org/1-.1016/j.ijfoodmicro.2011.10.003>
  34. **Gonçalves VD, Lengruher FB, Fonseca BO, Pereira RMS, Melo LDB, Lopes UG et al.** Detection and characterization of multidrug-resistant enterobacteria bearing aminoglycoside-modifying gene in a university hospital at Rio de Janeiro, Brazil, along three decades. *Biomédica* 2015; 35: 117-124.

35. **Coque TM, Baquero F, Canton R.** Increasing prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Euro Surveill* 2008; 13 (47). <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19044>.
36. **Leavitt A, Carmeli Y, Chmelnitsky I, Goren M.G, Ofek I, Navon-Venezia S.** Molecular Epidemiology, Sequence Types, and Plasmid Analyses of KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae* Strains in Israel. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54 (7): 3002-3006.
37. **Takasu H, Susuki S, Reungsang A, Viet PH.** Fluoroquinolone (FQ) Contamination Does Not Correlate with Occurrence of FQ-Resistant Bacteria in Aquatic Environments of Vietnam and Thailand. *Microbes Environ* 2011 26 (2): 135–143.
38. **Strahilevitz J, Jacoby GA, Hooper DC, Robicsek A.** Plasmid-Mediated Quinolone Resistance: a Multifaceted Threat. *Clin Microbiol Rev* 2009; 22 (4): 664-689.
39. **Nordmann P, Poirel L.** Emergence of plasmid-mediated resistance to quinolones in Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother* 2005; 56: 463–469.
40. **Jeong HS, Bae IK, Shin JH, Kim SH, Chang CL, Jeong J, et al.** Fecal Colonization of *Enterobacteriaceae* Carrying Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Determinants in Korea. *Microb Drug Resist* 2011; 17 (4): 507-512.
41. **Minarini LAR, Poirel L, Cattoir V, Darini ALC, Nordmann, P.** Plasmid-mediated quinolone resistance determinants among enterobacterial isolates from outpatients in Brazil. *J Antimicrob Chemother* 2008; 62: 474-478.
42. **Öktem IMA, Gülay Z, Bicmen M, Gür D et al.** *qnrA* Prevalence in extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-positive enterobacteriaceae isolates from Turkey. *Jpn J Infect Dis* 2008; 61: 13-17.
43. **Mokracka J, Koczura R, Jabłońska L, Kaznowski A.** Phylogenetic groups, virulence genes and quinolone resistance of integron-bearing *Escherichia coli* strains isolated from a wastewater treatment plant. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2011; 99: 817–824.
44. **Kolawole OM, Ajayi KT, Olayemi AB, Okoh AI.** Assessment of Water Quality in Asa River (Nigeria) and Its Indigenous *Clarias gariepinus* Fish. *Int J Environ Res Public Health* 2011; 8: 4332-4352.

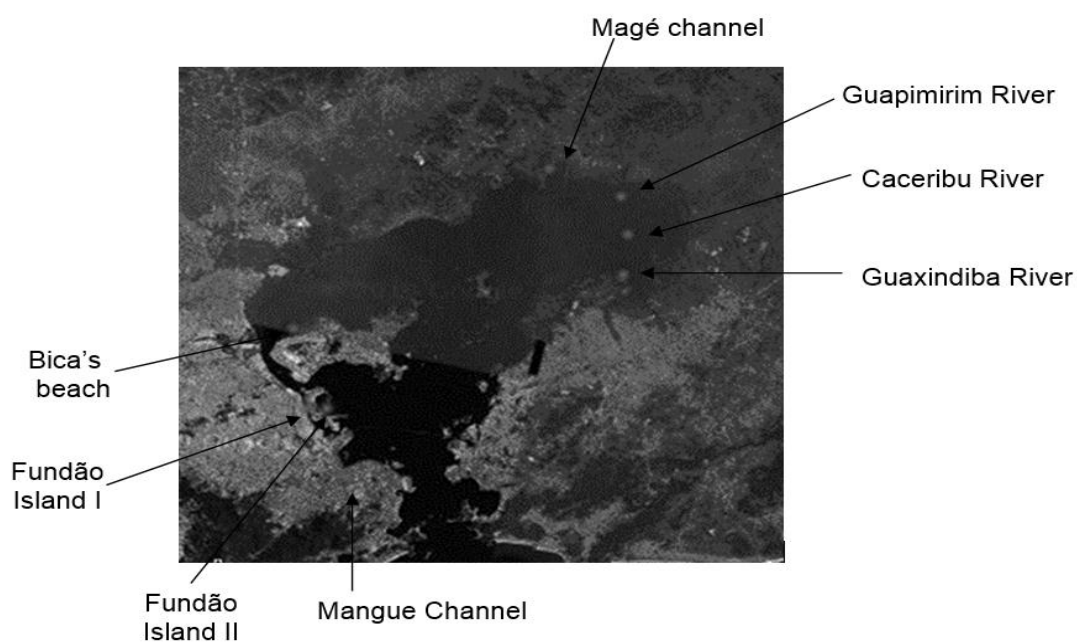


Fig.1: The geographical areas where water samples were collected along Guanabara Bay. (Source: Google maps).

TABLE I

Primers used on the PCR assays for detection of EMA, ESBL and PMQR encoding genes.

<i>Primer</i>	Sequence 5' → 3'	Amplicon size	Reference
Acc3IIa-F Acc3IIa-R	ACT GTG ATG GGA TAC CGC TC CTC CGT CAG CGT TTC AGC TA	237 bp	(25)
TEM-F TEM-R	TTG GGT GCA CGA GTG GGT TA TAA TTG TTG CCG GGA AGC TA	503 bp	(23)
SHV-F SHV-R	TCG GGC CGC GTA GGC ATG AT AGC AGG GCG ACA ATC CCG CG	625 bp	(23)
CTX-M-1-F3 CTX-M-1-R2	GAC GAT GTC ACT GGC TGA GC AGC CGC CGA CGC TAA TAC A	499 bp	(24)
TOHO-1-2F TOHO-1-1R	GCG ACC TGG TTA ACT ACA ATC C CGG TAG TAT TGT CCT TAA GCC	351 bp	(24)
qnrA up qnrA dw	AAG GAA GCC GTA TGG ATA TT AGC TAA TCC GGC AGC ACT AT	670 bp	(26)
qnrB up qnrB dw	CGA CCT GAG CGG CAC TGA AT TGA GCA ACG ATG CCT GGT AG	515 bp	(26)

qnrS up	ACC TTC ACC GCT TGC ACA TT	509 bp	(26)
qnrS dw	CCA GTG CTT CGA GAA TCA GT		
KPC-F	TGT CAC TGT ATC GCC GTC	1011 bp	(27)
KPC-R	CTC AGT GCT CTA CAG AAA AAC C		

---

TABLE II

Enterobacteriaceae isolated from water on the different collection sites at Guanabara Bay, including their resistance profiles and the studied genes found by PCR.

Collection site	Phosphorus (µM/L)	Strain	Resistance profiles	Identified genes
Guapimirim river	2,4	Ec 1Gb	Cph/Amp/Cip/Nor/Tet/Gen/Tob	<i>aacC2</i>
		Ec 1Ge	Amp/Gen/Kan	<i>aacC2</i>
		Kp 1Gd	Amp/Cip/Nor/Tet/Chl/Gen/Kan/Tob	<i>qnrB</i>
Caceribu river	8,6	Ec 2Ga <sub>1</sub>	Amp/Gen/Kan/Tob	<i>aacC2</i>
		Ec 2Ga <sub>2</sub>	Amp/Gen/Ak	<i>aacC2</i>
		Ec 2Gc	Amp/Cip/Nor/Gen	<i>aacC2</i>
		Ec 2CFLd	Cph/Cfz/Cro/Crx/Ctx/Amp	<i>bla</i> <sub>TOHO-1</sub>
		Kp 2Ge	Cph/Cfz/Cro/Crx/Ctx/Cpm/Atm/Amp/Cip/Nor/Tet/Gen/Amc/Sut	<i>aacC2/bla</i> <sub>TEM</sub> / <i>bla</i> <sub>SHV</sub> / <i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>
		Kp 2Gf	Amp/Tet/Gen	<i>aacC2</i>
Guaxindiba river	54,5	Ec 3CFLc	Cph/Cfz/Crx/Ctx/Amp/Amc	<i>bla</i> <sub>TOHO-1</sub>
Magé Channel	3,2	Ec 4Ge	Cph/Cfz/Cro/Crx/Ctx/Caz/Cpm/Atm/Amp/Cip/Nor/Tet/Chl/Gen/Kan/Tob/Ppt/Amc/Sut	<i>aacC2/bla</i> <sub>TEM</sub> / <i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub> / <i>qnrB</i>
Fundão island I	13,2	Ec 5Ga	Amp/Tet/Gen/Kan	<i>aacC2</i>
		Ec 5Gd	Amp/Cip/Nor/Tet/Gen/Kan	<i>aacC2</i>
Fundão island II	49,7	Ec 6Ga	Amp/Cip/Nor/Tet/Chl/Gen	<i>aacC2</i>
		Ko 6Gb	Cph/Cfz/Cro/Crx/Ctx/Caz/Cpm/Atm/Amp/Cip/Nor/Tet/Gen/Kan/Tob/Amc/Sut	<i>aacC2/bla</i> <sub>TEM</sub> / <i>bla</i> <sub>SHV</sub> / <i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>
		Ko 6CFL	Cph/Cfz/Cro/Crx/Ctx/Caz/Cpm/Atm/Ipm/Etp/Amp/Cip/Nor/Tet/Gen/Kan/Tob/Ppt/Amc/Asb/Sut	<i>aacC2/bla</i> <sub>TEM</sub> / <i>bla</i> <sub>SHV</sub> / <i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>
Bica's beach	19,5	Ec 7Ga	Cph/Cfz/Cro/Crx/Ctx/Cpm/Amp/Cip/Nor/Tet/Chl/Gen/Tob/Amc/Sut	<i>aacC2/bla</i> <sub>TEM</sub> / <i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>
		Ec 7Gb	Cph/Cfz/Cro/Crx/Cpm/Atm/Amp/Cip/Nor/Tet/Chl/Gen/Amc/Asb/Sut	<i>aacC2/bla</i> <sub>TEM</sub> / <i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>
		Ec 7Gc	Cph/Cfz/Cro/Crx/Ctx/Cpm/Atm/Amp/Cip/Nor/Tet/Chl/Gen/Ami/Amc/Sut	<i>aacC2/bla</i> <sub>TEM</sub> / <i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>
		Ec 7CFLd	Cph/Cfz/Cro/Crx/Ctx/Cpm/Atm/Amp/Cip/Nor/Tet/Chl/Gen/Amc/Sut	<i>aacC2/bla</i> <sub>TEM</sub> / <i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>
Mangue Channel	64,6	Kp 8b <sub>1</sub>	Cph/Cfz/Cro/Crx/Ctx/Caz/Atm/Amp/Cip/Nor/Tet/Gen/Kan/Tob	<i>aacC2/bla</i> <sub>TEM</sub> / <i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub> / <i>qnrB</i>

Ec- *E. coli*; Kp- *K. Pneumoniae*; Ko- *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae*; Cph-cephalotin; Cfz- cephalosporin; Cro- ceftriaxone; Crx- cefuroxime; Ctx- cefotaxime; Caz- ceftazidime; Cpm- cefepime; Atm- aztreonam; Ipm- imipenem; Etp- ertapenem; Amp- ampicillin; Cip- ciprofloxacin; Nor- norfloxacin; Tet- tetracycline; Chl- chloramphenicol; Gen- gentamicin; Ak- amikacin; Kan- kanamycin; Tob- tobramycin; Ppt- piperacillin/tazobactam; Amc- amoxicillin/clavulanic acid; Asb- ampicillin/sulbactam; Sut- cotrimoxazol.

TABLE III

Enterobacteriaceae isolated from clinical specimens, including their resistance profiles and the studied genes found by PCR.

Unit	Specimen	Strain	Resistance profiles	Identified genes
Ambulatory care	Urine	Ec 1407	Amp/Cip/Nor/Tet/Gen/Tob/Sut	<i>aacC2</i>
		Ec 1798	Cph/Cfz/Cro/Crx/Ctx/Caz/Cpm/Atm/Amp/Tet/Chl/Gen/Kan/Tob/Asb/Sut	<i>aacC2/ bla<sub>TEM</sub>/bla<sub>CTX-M-1</sub></i>
		Ec 2383	Amp/Cip/Nor/Tet/Gen/Sut	<i>aacC2</i>
Thorax surgery	Pleural fluid	Ec 1633a	Cph/Cfz/Crx/Caz/Amp/Cip/Nor/Chl/Gen/Kan/Tob/Asb/Sut	<i>bla<sub>TEM</sub>/ bla<sub>TOHO-1</sub>/ qnrA</i>
ICU	Different secretion	Kp 2141b	Cph/Cfz/Cro/Fox/Crx/Caz/Atm/lpm/Etp/Amp/Gen/Kan	<i>bla<sub>TOHO-1</sub></i>
GP clinic	Blood	Kp 2492	Cph/Cfz/Cro/Crx/Ctx/Amp/Tet/Gen/Sut	<i>aacC2/ bla<sub>TEM</sub>/ bla<sub>CTX-M-1</sub>/ bla<sub>TOHO-1</sub></i>
PID unit	Urine	Kp 2692	Cph/Cfz/Cro/Crx/Ctx/Cpm/Amp/Cip/Nor/Tet/Gen/Kan/Tob/Sut	<i>aacC2/ bla<sub>TEM</sub>/bla<sub>SHV</sub>/ bla<sub>CTX-M-1</sub></i>
Nephrology	Peritoneal fluid	Kp 7438	Cph/Cfz/Cro/Crx/Ctx/Cpm/ Atm/lmp/Etp/Amp/Cip/Nor/Tet/Chl/ Gen/Tob/Ppt/Asb/Sut	<i>aacC2/ qnrB/ bla<sub>KPC</sub></i>
	End portion of Tenckoff catheter	Kp 7474	Cph/Cfz/Cro/Fox/Crx/Ctx/Cpm/Atm/lmp/Etp/Amp/Cip/Nor/Tet/ Chl/Gen/Tob/Ppt/Asb/Sut	<i>aacC2/ qnrB/ bla<sub>KPC</sub></i>

Ec- *E. coli*; Kp- *K. Pneumoniae*; ICU- Intensive care unit; GP- General Practitioner; PID- Infectious and Parasitic Diseases; Cph-cephalotin; Cfz- cephazolin; Cro- ceftriaxone; Fox- ceftiofloxacin; Crx- cefuroxime; Ctx- cefotaxime; Caz- ceftazidime; Cpm- cefepime; Atm- aztreonam; lpm- imipenem; Etp- ertapenem; Amp- ampicillin; Cip- ciprofloxacin; Nor- norfloxacin; Tet- tetracycline; Chl- chloramphenicol; Gen- gentamicin; Ak- amikacin; Kan- kanamycin; Tob- tobramycin; Ppt- piperacillin/tazobactam; Amc- amoxicillin/clavulanic acid; Asb- ampicillin/sulbactam; Sut- cotrimoxazol.