



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Barbara Araujo Nogueira

**Detecção e caracterização fenotípica e genotípica de cepas bacterianas
multirresistentes no Complexo Lagunar de Jacarepaguá – Rio de Janeiro**

Rio de Janeiro

2016

Barbara Araujo Nogueira

**Deteção e caracterização fenotípica e genotípica de cepas bacterianas resistentes no
Complexo Lagunar de Jacarepaguá – Rio de Janeiro**

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. Arnaldo Feitosa Braga de Andrade

Coorientador: Prof. Dr. José Augusto Adler Pereira

Rio de Janeiro

2016

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

N778 Nogueira, Barbara Araújo.

Detecção e caracterização fenotípica e genotípica de cepas bacterianas multirresistentes no Complexo Lagunar de Jacarepaguá – Rio de Janeiro / Barbara Araújo Nogueira – 2016.

87 f.

Orientador: Arnaldo Feitosa Braga de Andrade.

Coorientador: José Augusto Adler Pereira.

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

1. Ecossistemas aquáticos - Tratamento - Teses. 2. Enterobactérias - Teses. 3. Antimicrobianos. 4. Resistência Microbiana a Medicamentos. 5. Plasmídeos. I. Andrade, Arnaldo Feitosa Braga de. II. Pereira, José Augusto Adler. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 574.5

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

Assinatura

Data

Barbara Araujo Nogueira

**Deteccão e caracterização fenotípica e genotípica de cepas bacterianas multirresistentes
no Complexo Lagunar de Jacarepaguá – Rio de Janeiro**

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 04 de abril de 2016.

Orientador: Prof. Dr. Arnaldo Feitosa Braga de Andrade

Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Coorientador: Prof. Dr. José Augusto Adler Pereira

Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Ana Luíza de Mattos Guaraldi

Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof.^a Dra. Ana Cláudia de Paula Rosa Ignácio

Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof.^a Dra. Ana Paula D'Alincourt Carvalho Assef

Função Oswaldo Cruz

Rio de Janeiro

2016

DEDICATÓRIA

Dedico esse Mestrado aos meus pais que sempre me incentivaram a buscar os meus sonhos e a ser melhor a cada dia.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a todos os meus protetores espirituais que permitiram que mais essa etapa da minha vida fosse concluída. Sem a fé que me guiou eu não teria chegado até aqui.

Aos meus pais Marco e Deborah e ao meu irmão Bernardo por todo amor, carinho, dedicação e incentivo. Por nunca permitirem que eu desistisse, por todo o apoio nos momentos de dúvidas e por terem feito o possível e o impossível por mim.

A minha avó Cleonice e minha madrinha Isabel que sempre foram um exemplo na minha vida me despejando carinho e atenção sempre que eu precisei. Elas são meu orgulho, minha inspiração e sem elas nada disso valeria a pena.

Aos meus orientadores Prof. Arnaldo e Prof. José Augusto por todas as conversas, conselhos e incentivos. São excelentes profissionais e me deram a honra de compartilhar seus conhecimentos comigo. Cada reunião foi uma aula que eu levarei para toda a minha vida tanto no campo profissional quanto pessoal.

A Verônica por estar junto de mim nessa minha caminhada acadêmica desde o início do meu estágio. Obrigada pelo acolhimento, pelos ensinamentos e por toda a ajuda. Mesmo estando longe, você foi de grande valia para esse trabalho.

Ao Márcio e ao Fred por terem embarcado nesse projeto comigo, se disponibilizando a irem fazer coleta, a opinarem e lerem o meu trabalho em diversos momentos. Obrigada por cada conselho, por cada dica, por cada conversa. Além de excelentes profissionais, são pessoas muito especiais que vou ter uma eterna dívida de gratidão. Cada conversa com vocês foi uma aula dos mais diversos assuntos.

Ao prof. Adenilson pelo auxílio inestimável nas análises estatísticas. Com certeza todos os dados analisados e discutidos foram muito importantes para agregar informação ao trabalho.

Aos meus amigos Rafael, Danielle e Isabel por todas as histórias, viagens, risadas, conselhos e momentos compartilhados em mais de uma década de amizade. Que essa amizade nunca diminua pois vocês são o meu suporte e minha alavanca. Obrigada por dividirem comigo seu tempo, alegrias, preocupações, sorrisos e lágrimas. Obrigada por todos os momentos bons e ruins, eles só serviram para fortalecer ainda mais a nossa amizade.

A minha eterna e orgulhosa turma da Universidade Gama Filho: Lucas, Julianna, Grégor, Raissa, Liana, Marcela e Vítor por todas as aulas, trabalhos de campo, churrascos,

focadas e risadas que passamos juntos. Agradeço imensamente essa amizade durar muito mais do que a faculdade e por estarem comigo até o fim. Agradeço por todas as conversas e por ter colegas de profissão tão leais e capacitados quanto eles.

Aos meus amores laboratoriais: Bruna, Paula, Cíntia, Lincoln, Louisy e a todos do laboratório 3 que se mostram sempre dispostos a ajudar. Obrigada pela companhia diária. Obrigada por compartilharem suas famílias, seus momentos especiais e o desejo que ajudar o próximo buscando sempre o nosso melhor. Sem a companhia de vocês esse trabalho não teria sido terminado com tanta felicidade.

Agradeço também a CAPES pelo auxílio financeiro inestimável a essa pesquisa e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas por acreditarem no meu projeto.

E a todos que, de modo geral, torceram por mim direta ou indiretamente. Meu muito obrigada!

Foi um dia memorável, pois operou grandes mudanças em mim. Mas isso se dá com qualquer vida. Imagine um dia especial na sua vida e pense como teria sido seu percurso sem ele. Faça uma pausa, você que esta lendo, e pense na grande corrente de ferro, de ouro, de espinhos ou flores que jamais o teria prendido não fosse o encadeamento do primeiro elo de um dia memorável.

Charles Dickens – Grandes Esperanças

RESUMO

NOGUEIRA, Barbara Araújo. *Detecção e caracterizações fenotípica e genotípica de cepas bacterianas multirresistentes no Complexo Lagunar de Jacarepaguá – Rio de Janeiro*. 2016. 87 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

A deficiência na qualidade da água de abastecimento e na rede de coleta de esgoto vem contribuindo para o comprometimento da qualidade ambiental e das espécies que habitam esses ecossistemas. Ambientes aquáticos são considerados uma das principais vias de introdução de genes de resistência, o que os torna fonte de disseminação de organismos resistentes aos antimicrobianos entre populações humanas e animais. O Complexo Lagunar de Jacarepaguá encontra-se sob influência de águas ricas em matéria orgânica, devido principalmente a impactos antropogênicos, o que auxilia na degradação do meio ambiente natural local. No meio ambiente, cepas ambientais, como a família das enterobactérias, possuem a capacidade de adquirir resistência quando em contato com organismos patogênicos. A resistência a betalactâmicos, fluorquinolonas, aminoglicosídeos e carbapenêmicos, indica perfis hospitalares em cepas isoladas em ambientes aquáticos. Atualmente *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter cloacae* são as três espécies da família das enterobactérias que mais frequentemente estão associadas a infecções humanas. O objetivo do presente estudo foi analisar cepas isoladas de amostras de água do Complexo Lagunar de Jacarepaguá, procurando comparar dois períodos, no que diz respeito à marcadores de resistência específicos para aminoglicosídeos, fluorquinolonas, beta-lactâmicos e carbapenêmicos. As amostras foram obtidas da Lagoa de Jacarepaguá, Lagoa de Marapendi e Canal de Camorim nos anos de 2005, 2007 e 2013. As cepas foram identificadas ao nível de espécie e submetidas testes de susceptibilidade a antimicrobianos. As cepas que apresentaram resistência a três ou mais grupos de antimicrobianos pré determinados (cafosporinas de terceira e quarta geração, aminoglicosídeos, quinolonas e carbapenêmicos), foram consideradas multirresistentes e submetidas a ensaios de PCR. As cepas com resistência a três ou mais grupos de antimicrobianos foram submetidas a ensaios de conjugação bacteriana. Todas as cepas selecionadas apresentaram capacidade de transferência de resistência. Das 56 cepas analisadas, foi possível detectar a presença de 48 (85,7%) *Escherichia coli*, 6 (10,7) *Klebsiella pneumoniae* e duas (3,5%) *Enterobacter cloacae*. Das 56 cepas analisadas 14 foram submetidas a ensaios de PCR para detectar a presença de genes de ESBL. Três cepas apresentaram produtos de amplificação para o gene *bla_{TEM}*, uma (para o gene *bla_{CTX-M}*, uma para o gene *bla_{TOHO}* e nenhuma apresentou produto de amplificação para o gene *bla_{SHV}*. Nenhuma das cepas selecionadas apresentou positividade para os genes analisados para fluorquinolonas, aminoglicosídeos e carbapenêmicos. Quando comparados, os dados encontrados em 2005/2007 e 2013 demonstram certa regularidade na proporção de cepas multirresistentes durante os períodos avaliados, porém observamos um aumento na qualidade da água na lagoa de Marapendi. O uso inadequado de antimicrobianos no ambiente favorece a seleção de clones resistentes, por isso, a vigilância microbiológica constante deve permitir detectar a ocorrência, ou não, da progressão do processo de degradação pela urbanização descontrolada e pela descarga ilegal de esgoto.

Palavras-chave: Ambientes aquáticos. Enterobactérias. Antimicrobianos. Multirresistência. Plasmídeo.

ABSTRACT

NOGUEIRA, Barbara Araújo. *Detection and phenotypic and genotypic characterization of multidrug-resistant bacterial strains in the Complexo f Jacarepaguá Lagoon – Rio de Janeiro*. 2016. 87 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

The deficit in the water quality and sewerage system has contributed to the decrease of environmental quality and, consequently, the health of the species inhabiting these ecosystems. Aquatic environments are not only a source of spread of antimicrobial-resistant organisms, but also are considered the main routes by which resistance genes are introduced into natural ecosystems. The Lagoon Complex of Jacarepagua is under the influence of water rich in organic matter, due primarily to anthropogenic impacts, assisting in the degradation of the local environment. Environmental bacterial strains, especially the family of enterobacteria, act as unlimited source of genes able to acquire resistance when in contact with pathogenic organisms. The resistance, especially to betalactams, fluoroquinolones, aminoglycosides and carbapenems, indicates a hospital profile in isolated strains in aquatic environments. Nowadays *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter cloacae* are the most frequent species of the enterobacteriae family associated to humans infections. The aim of this study was analyse isolated strains of water samples from the lagoon complexo f Jacarepaguá, looking to compare two periods, as regards resistance markers to AMEs, PMQRs, ESBLs and carbapanems. The samples were collected in the Jacarepagua lagoon, Marapendi lagoon and Camorim channel in the years of 2005, 2007 and 2013. The strains were identified thurgh the species level and submitted to the antimicrobial susceptibility tests. All selected strains are able to resistance transfer. The strains who shows resistance to three or more pré-determined antimicrobial groups were considered multiresistant and submitted to PCR assays. The strains with broad resistance profile were submitted to bacterial conjugation assays. From the 56 analysed strains, was possible todetect the presence of 48 (85,7%) *Escherichia coli*, 6 (10,7) *Klebsiella pneumoniae* and two (3,5%) *Enterobacter cloacae*. Fourteen were submitted to PCR assays to detect the presence of ESBLs genes. Three strains shown amplification products to *bla*_{TEM} gene, one to *bla*_{CTX-M}, one to *bla*_{TOHO} and none to *bla*_{SHV} gene. None of the isolates strains were positive for the fluoroquinolones, aminoglycosides and carbapenems tested genes. When compared, the data found in 2005/2007 and 2013 show regularity in the proportion of multidrug-resistant strains during the studied periods, however we noticed an improvement in the water quality in Marapendi lagoon. The inappropriate use of antimicrobials in the environment favors the selection of resistant clones, so the constant microbiological surveillance should be able to detect the occurrence or not, the progression of the degradation process by the uncontrolled urbanization and illegal sewage discharge.

Keywords: Aquatic environment. Enterobacteria. Antimicrobials. Multidrug resistance. Plasmids.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Indicação dos pontos de coleta realizados em 2005, 2007 e 2013 no Complexo Lagunar de Jacarepaguá	33
Figura 2 –	Disposição correta dos diversos discos empregados no testes om inibidores e potenciador para detecção de carbapenemase ao longo da placa.....	38
Gráfico 1 –	Demonstração quantitativa das cepas obtidas em cada ponto de coleta em 2005/2007 e 2013 nas amostras de água coletadas com Complexo Lagunar de Jacarepaguá, região oeste da cidade do Rio de Janeiro.....	41
Gráfico 2 –	Identificação e contagem das espécies isoladas em cada ponto de coleta em 2005/2007 e 2013 nas amostras de água coletadas no Complexo Lagunar de Jacarepaguá, região oeste da cidade do Rio de Janeiro.....	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	<i>Primers</i> compatíveis com perfil de ESBL, EMA, QNR e KpC que serão utilizados para ensaios de PCR.....	40
Tabela 2 –	Perfis de resistência encontrados nas cepas isoladas em 2005 e 2007 no Complexo Lagunar de Jacarepaguá	44
Tabela 3 –	Perfil de resistência das cepas isoladas em meios contendo 8 µg/mL de gentamicina e 32 µg/mL de cefalotina em amostras de água do Complexo Lagunar de Jacarepaguá em 2013	45
Tabela 4 –	Padão de multirresistência pré-determinado como ponto de corte para análise estatística.....	47
Tabela 5 -	Perfis genotípicos identificados através de ensaios de PCR para a presença de genes de ESBL.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CLED	Cystine Lactose Electrolyte Deficient
CLSI	Clinical & Laboratory Standards Institute
DNA	Ácido desoxirribonucleico
Ec	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
Ecl	<i>Enterobacter cloacae</i>
<i>E. cloacae</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
EMA	Enzimas Modificadoras de Aminoglicosídeos
ESBL	Betalactamase de Espectro Estendido
INEA	Instituto Estadual do Ambiente
Kp	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
MHA	Muller Hinton Ágar
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Reação de Cadeia da Polimerase
PMQR	Plasmídeo Mediando Resistência a Quinolona
VM	Vermelho de Metila
VP	Vogel Proskauer

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celcius
%	Porcentagem
>	Menor que
<	Maior que
h.	Hora
m ³	Metros cúbicos
Km ²	Quilômetros quadrados
mL	Mililitro
mM	Milimolar
μg	Micrograma
μg/mL	Micrograma por mililitro
NaCl	Cloreto de sódio
H ₂ S	Ácido sulfídrico
T/dia	Toneladas por dia

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	15
1	OBJETIVOS	31
1.1	Objetivo geral	31
1.2	Objetivos específicos	31
2.	MATERIAIS E MÉTODOS	32
2.1.	Área de Estudo	32
2.2.	Coleta de amostras	33
2.3.	Seleção e identificação das cepas	33
2.4.	Determinação do perfil de susceptibilidade aos agentes antimicrobianos ...	34
2.4.1.	<u>Disco difusão</u>	34
2.4.2	<u>Teste de inibição de betalactamase pelo ácido clavulânico</u>	35
2.4.3.	<u>Teste de aproximação de discos por difusão em Ágar</u>	36
2.4.4.	<u>Teste com inibidores e potenciador para detecção de Carbapenemases</u>	36
2.5.	Ensaio de conjugação bacteriana	38
2.6.	Detecção de genes por Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)	39
3.	RESULTADOS	41
3.1.	Seleção e identificação das cepas	41
3.2.	Determinação do perfil de susceptibilidade aos agentes antimicrobianos	42
3.2.1.	<u>Disco difusão</u>	42
3.2.2	<u>Identificação de perfis fenotípicos compatíveis com a presença de ESBL.</u>	47
3.2.3.	<u>Testes com inibidor e potenciador para detecção de Carbapenemase</u>	47
3.3.	Ensaio de conjugação bacteriana	48
3.4.	Análise estatística	48
3.5.	Reação em cadeia de polimerase (PCR)	49
3.5.1.	<u>Presença de betalactamase de espectro estendido</u>	49
3.5.2.	<u>Gene <i>bla_{KPC}</i></u>	50
3.5.3.	<u>Presença de plasmídeo mediando resistência a quinolonas</u>	50
3.5.4.	<u>Enzimas modificadoras de aminoglicosídeos</u>	51
4.	DISCUSSÃO	52
	CONCLUSÃO	65
	REFERÊNCIAS	67

ANEXO A – Fotos de gel de betalactamase de espectro estendido (ESBL)	80
ANEXO B – Fotos de gel de quinolonas mediando plasmídeos de resistência (PMQR)	84
ANEXO C – Fotos de gel de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos	86
ANEXO D – Fotos de gel de carbapenemase	87

INTRODUÇÃO

Poluição no ambiente aquático

A presença de microrganismos nos mais diversos ambientes e sua relação com humanos e animais vêm sendo estudada há cerca de um século e meio. Nos últimos anos, houve um aumento significativo de diversos compostos químicos devido a diversas atividades antropogênicas que ocorrem no meio ambiente comprometendo qualidade desses habitats. Dentre outros fatores, a deficiência na qualidade da água de abastecimento e na rede de coleta e tratamento de esgoto são os principais veículos de disseminação desses microrganismos que muitas vezes podem ser patogênicos. Esse fato vem contribuindo para o comprometimento da qualidade ambiental e, conseqüentemente, da saúde das espécies que habitam esses ecossistemas (ANDERSON, et al., 2003; ARIAS, 2007; IBEKWE, MURINDA, GRAVES, 2011; DERRIEN et al., 2012; LUPO, COYNE, BERENDONK, 2012).

A biota aquática vem sendo constantemente exposta a diversas substâncias tóxicas que são lançadas diretamente no ambiente, provenientes das mais diversas fontes de emissão. O desenvolvimento das cidades contribuiu de forma direta ou indireta para que os recursos naturais se tornem receptores de lixos tóxicos provenientes de efluentes industriais, drenagens agrícolas realizados em ambientes rurais, derrames acidentais de lixos químicos e esgotos domésticos lançados em rios e mares. Esses contaminantes além da eutrofização podem contribuir ativamente para a poluição dos ecossistemas aquáticos com uma ampla gama de agentes tóxicos como metais pesados, agrotóxicos, compostos orgânicos e introdução de espécies que antes não eram encontradas nesses ambientes. Como consequência, tem-se observado que certas substâncias são capazes de interagir com os organismos vivos, causando uma queda na qualidade da água em função das diversas alterações que, dependendo do grau de contaminação e do tempo de exposição, podem acarretar em um grave desequilíbrio como, por exemplo, a alteração na dinâmica das comunidades biológicas. (GOULART; CALLISTO, 2003; ARIAS, 2007; ALMEIDA et al., 2012).

A poluição no ambiente aquático é um problema relevante e crescente, sendo necessário o acompanhamento sistemático da qualidade da água através de testes específicos de monitoramento. Devido principalmente ao crescimento populacional, houve um aumento do uso de corpos d'água como receptores de efluentes orgânicos, resultando

em uma diminuição das condições sanitárias nas comunidades ribeirinhas (MEIRELLES-PEREIRA et al., 2002; CORTÊS et al., 2010). As indústrias que se estabelecem nessas áreas, também contribuem para o despejo de resíduos e substâncias químicas, podendo acarretar diversas doenças. Geralmente, os efeitos causados em níveis mais baixos de organização biológica podem ser diretamente ligados à exposição aos agentes contaminantes uma vez que as respostas moleculares e bioquímicas ocorrem mais rapidamente. A presença de resíduos químicos e metabólitos são indicadores diretos da disponibilidade de contaminantes para os organismos (ARIAS, 2007; KALAWOLLE et al., 2011).

O uso recreativo de água pode trazer benefícios importantes para saúde e bem-estar. De acordo com a Organização Mundial da Saúde- OMS (2015), efeitos adversos podem estar associados com o uso recreativo da água, caso esta se encontre imprópria para o uso. Daí a importância do monitoramento desses ambientes, uma vez que, dependendo das atividades recreativas exercidas, há a possibilidade de exposição de diversas vias, como pele, olhos e mucosas, a substâncias tóxicas. Sendo assim, a frequência de uso, os níveis de contaminação e probabilidade de exposição são fatores cruciais para a avaliação da qualidade da água desses ambientes (ALMEIDA, 2012).

A qualidade de qualquer corpo d'água, seja de superfície ou subterrâneo, é influenciada tanto de forma natural, quanto por atividade humana. Alguns autores definiram como "uma relação quantificável entre a densidade do indicador na água e os potenciais riscos de saúde humana envolvida no uso da água" um critério de qualidade da água desenvolvido através de um sistema de indicadores. Desde a década de 1970, pesquisadores e gestores de recursos hídricos argumentam que as metodologias tradicionais, baseadas em características físicas, químicas e bacteriológicas utilizadas para classificação de águas, não são suficientes para atender a seus múltiplos usos, sendo deficiente a avaliação da qualidade para recreação e ecológica do ambiente. A avaliação de impactos ambientais em ecossistemas aquáticos vem sendo realizada através da análise de certos parâmetros como condutividade, concentração de fósforo e nitrogênio total, pH e temperatura da água que, em conjunto, são capazes de fornecer informações sobre a qualidade desses corpos d'água, e quando associados com a análise da presença de coliformes fecais, fornecem o "cenário sanitário-ecológico" do ecossistema. (VON SPERLING, 2009; KOLAWOLE, AJIBOLA; OSUOLALE, 2008; ARIAS, 2007).

Geralmente, as águas recreacionais contêm uma mistura de micróbios patogênicos e não patogênicos, como bactérias, vírus e protozoários que podem ser adquiridos através de despejo de esgoto doméstico e de atividades industriais. A presença de tais

microrganismos em águas recreacionais afeta a qualidade desses habitats e, consequentemente, a saúde humana (MEIRELLES-PEREIRA et al., 2002; OLIVEIRA, FRANÇA; PINTO, 2009)

Ambientes que recebem esgoto de origem hospitalar podem apresentar um grau de degradação mais elevado quando comparados com aqueles que recebem esgoto apenas de origem comunitária, devido à presença de resíduos químicos, assim como antimicrobianos, além de cepas bacterianas apresentando diferentes perfis de resistência com possibilidade de transmissão e disseminação para as cepas nativas do ambiente (GOULART, CALLISTO, 2003; SATO et al., 2005; OLIVEIRA; PINHATA, 2008; COCULESCO, 2009).

Grande quantidade de microrganismos em um corpo d'água são indicadores de altos níveis de nutrientes na água. As águas contaminadas apresentam uma contagem bacteriana alta, sendo de vital importância o tratamento de efluentes com o objetivo de manter a qualidade e a biodiversidade dos ambientes aquáticos (TORTORA; FUNKE; CASE, 2008; COCULESCO, 2009).

Monitoramento ambiental

Com o aumento das populações humanas no entorno de ambientes aquáticos urbanos, ocorrem mudanças no ambiente resultando em impactos antropogênicos que passam a afetar a qualidade dos ecossistemas costeiros, principalmente devido à descarga de esgotos e de compostos químicos, como pesticidas, hormônios e antimicrobianos que são amplamente utilizados em clínicas de uso humano e veterinário (BERTO et al., 2009).

Bactérias resistentes a antimicrobianos já podem ser encontradas em praticamente qualquer ambiente, tornando eventualmente, difícil a cura da infecção pela maioria dos antimicrobianos utilizados. Além disso, os genes de resistência não respeitam fronteiras geográficas nem ecológicas, podendo ser disseminados em qualquer ambiente, sendo a principal rota, ambientes aquáticos (ISHIDA et al., 2010).

A presença de cepas resistentes aos antimicrobianos em água doce vem sendo estudada no mundo todo e, a frequência com que cepas contendo genes de resistência têm sido descritas na literatura, reflete a capacidade de disseminação e evolução sob a pressão seletiva causada pelo uso dos antimicrobianos (HAWKEY, JONES, 2009). Águas recreacionais podem ser fontes de disseminação de organismos resistentes a antimicrobianos, tanto provenientes de áreas hospitalares, quanto de ambiente veterinário (BAQUERO; MARTÍNEZ; CANTÓN, 2008). Alguns desses antimicrobianos não

metabolizados acabam sendo excretados através da rede de esgoto e lançados em rios, lagos e lagoas, sem tratamento prévio (ARVANITIDOU; KATSOUYANNOPOULOS; TSAKRIS, 2001; ASH, MAUCK; MORGAN, 2002).

O monitoramento ambiental dos processos de aquisição e disseminação de genes envolvidos em resistência e virulência bacteriana e codificados em elementos genéticos móveis como plasmídios, integrons e transpósons provenientes, tanto de ambiente hospitalar quanto extra-hospitalar, visa detectar a associação entre despejo de esgoto e resíduos de diferentes origens em receptáculos aquáticos com a resistência que microrganismos eventualmente presentes nesses ambientes vêm adquirindo (ZHAO et al., 2010).

Complexo Lagunar de Jacarepaguá

O Rio de Janeiro é o segundo Estado em corpos d'água costeiros, contendo 50 ambientes desse tipo localizados entre a Ilha Grande e a Baixada Campista. Os ecossistemas costeiros são particularmente abundantes na costa fluminense e são exemplos das sequências sedimentares transgressivas e regressivas do nível do mar. (SALLOTÔ, 2012).

O Complexo Lagunar de Jacarepaguá compreende as lagoas de Jacarepaguá, Tijuca e Marapendi. Recebe cerca de 3.200 m³ de esgoto doméstico não tratado, além de 1.300 T/dia de lodo de esgoto que causam o assoreamento. Este é considerado um sistema estrangulado, pois quase não há renovação das águas, uma vez que a entrada de água do mar não é eficiente, sendo maior à exportação do sistema para o mar. Em períodos de grande intensidade de chuva, observa-se a descarga de sedimentos nas áreas adjacentes. Pode-se afirmar que esse sistema é equivalente a um estuário com uma mistura de águas salinas e dulcícolas (SAMPAIO, 2008).

A lagoa de Jacarepaguá é um sistema de água salobra, enquanto a lagoa da Tijuca contém predominantemente água salgada. A lagoa de Marapendi apresenta um sistema dulcícola com características de lago costeiro. Para evitar a propagação de mosquitos naquela área, foi estabelecida a comunicação da lagoa de Marapendi com a lagoa da Tijuca através do canal artificial de Marapendi (SAMPAIO, 2008). Este complexo lagunar, assim como seus rios e canais, encontra-se sob grande influência de águas residuais, ricas em matéria orgânica de origem urbana e industrial. As suas margens estão servindo como entulhos de obras, efluentes sanitários e industriais, prejudicando o fluxo das águas e interferindo nos processos hidrológicos e geomorfológicos. As condições de

poluição e uso inadequado do espaço urbano contribuem para a degradação do meio ambiente natural local (SAMPAIO, 2008).

O Instituto Nacional do Ambiente (INEA) é o responsável pelo monitoramento sistemático de qualidade da água do Complexo Lagunar de Jacarepaguá, realizado mensalmente em oito estações de amostragem onde são analisados os principais indicadores físicos e químicos de qualidade de água, bem como a comunidade de fitoplâncton, além de testes semi-quantitativos para detecção de toxinas de cianobactérias (*Microcystis aeruginosa*) na água e análises em sedimentos. Dentre as análises realizadas, pode-se incluir a contagem de coliformes termotolerantes e fecais que corresponde a enterobactérias. Estas são bacilos Gram-negativos, não esporulados, cujas células apresentam membrana citoplasmática, peptidoglicano, fímbrias e membrana externa. São anaeróbicos facultativos, capazes de reduzir nitrato a nitrito, apresentam catalase positiva, oxidase negativa, são capazes de fermentar glicose, em sua maioria são móveis, com exceção de *Klebsiella*, *Shigella* e *Yersinia*, algumas estirpes fermentam lactose, como por exemplo: *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Serratia* (DENTON, 2007; TRABULSI, ALTERTHUM, 2008).

Enterobacteriaceae

As enterobactérias são bacilos Gram-negativos, não esporulados, cujas células apresentam membrana citoplasmática, peptidoglicano, fímbrias e membrana externa. São anaeróbicos facultativos, capazes de reduzir nitrato a nitrito, apresentam catalase positiva, oxidase negativa, são capazes de fermentar glicose, em sua maioria são móveis, com exceção de *Klebsiella*, *Shigella* e *Yersinia*, algumas estirpes fermentam lactose, como por exemplo: *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Serratia* (DENTON, 2007; TRABULSI, ALTHERUM, 2008).

A família *Enterobacteriaceae* compreende diversos gêneros bacterianos e muitos deles, são isolados em humanos. Inúmeros desses patógenos estão associados a IRAS (Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde) e animais devido a sua capacidade de se tornarem reservatórios de genes de resistência que são capazes de causar essas infecções (TORTORA, FUNKE, CASE, 2005). As *Enterobacteriaceae* tornaram-se uma das causas mais importantes de IRAS e de infecções comunitárias, se destacando por serem ubíquas, ou seja, são encontradas no solo, água, vegetação e fazerem parte da microbiota intestinal normal de humanos e outros animais. As enterobactérias apresentam e produzem diversos fatores de virulência. Estima-se que pelo menos 20 espécies sejam responsáveis por 95% das

infecções bacterianas, sendo cerca de 30-35% relacionadas às sepses, 70% com infecções no trato urinário, além de infecções intestinais (COQUE, BAQUERO, CANTON, 2008; TRABULSI, ALTERTHUM, 2008).

Estudos indicam que atualmente *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter cloacae* são as três espécies desta família que mais frequentemente estão associadas a IRAS / infecções nosocomiais, principalmente no trato urinário (COQUE, BAQUERO, CANTON, 2008, FALAGAS, KARAGEORGOPOULOS, 2009, GIBSON, COBBOLD, TROTT, 2010).

Enterobacter cloacae

Enterobacter cloacae foi descrita pela primeira vez em 1890 como *Bacillus cloacae* e só adquiriu o nome, pelo qual é conhecido até hoje, em 1960 (HORMAECHE, EDWARDS 1960). Ela pode ser encontrada com uma maior frequência em animais, esgotos, fezes humanas e solo e água contaminados (SANDERS JR., SANDERS, 1997; HOFFMANN, ROGGENKAMP, 2003).

Enterobacter cloacae é um importante patógeno nosocomial e muitas vezes, está associado a infecções no trato urinário e respiratório, bem como endocardite, artrite séptica, osteomielite e infecções da pele e tecidos moles. A pele e o trato gastrointestinal são os sítios anatômicos onde a essa espécie pode ser encontrada mais comumente (SANDERS JR., SANDERS, 1997; MEZZATESTA, GONA, STEFANI, 2012).

O tratamento de infecções associadas à presença desses microrganismos vem se tornando progressivamente mais difícil devido à resistência aos antimicrobianos. Eles produzem Betalactamases, que são capazes de codificar resistência aos antimicrobianos do grupo das cefalosporinas. São particularmente resistentes a ampicilina, a amoxicilina e as cefalosporinas e, hoje em dia, seu tratamento consiste basicamente no uso de antimicrobianos como a Cefepima e Gentamicina (WISPLINFGHOFF et al, 2004).

Klebsiella pneumoniae

No cenário clínico, o gênero *Klebsiella* é um dos mais importantes da família das Enterobacteriaceae, sendo a *Klebsiella pneumoniae* a espécie mais isolada. Embora encontradas na microbiota da boca, pele e intestino, ela pode causar além de pneumonia, infecções no trato urinário inferior e trato biliar (RYAN, RAY, 2014)

Infecções por *K. pneumoniae* são causadas a partir da entrada de agentes no organismo, através do consumo de vegetais ou água contaminados. Também pode ocorrer

durante internação hospitalar. Algumas cepas de *Klebsiella pneumoniae* podem causar quadros graves de pneumonia em humanos (TORTORA, FUNKE, CASE, 2008; TRABULSI, ALTERTHUM, 2008).

A resistência aos antimicrobianos, observada em *K. pneumoniae*, está principalmente relacionada a capacidade de transferência de plasmídeos permitindo que essa espécie apresente resistência a múltiplos antimicrobianos. Em alguns casos, quando a *K. pneumoniae* apresenta a capacidade de produzir ESBL, ela geralmente vem associada a resistência a outros antimicrobianos como aminoglicosídeos, fluoroquinolonas, tetraciclina, cloranfenicol e trimetoprim/sulfametoxazol. (ENDIMIANI et al., 2008; GROOPMAN, 2008; HUDSON, 2014).

O tratamento utilizado em pacientes que apresentam infecções por *K. pneumoniae* sensíveis a antimicrobianos é geralmente por ampicilina/ sulbactam, piperacilina/ tazobactam, ticarcilina/ clavulanato, ceftazidima, cefepime, norfloxacin, meropenem, e ertapenem. Alguns especialistas recomendam o uso de meropenem para pacientes com infecções causadas por cepas produtoras de ESBL (TAVARES, 2009).

***Klebsiella pneumoniae* resistente a carbapenêmicos (KpC)**

A resistência de Enterobactérias ao grupo de antimicrobianos denominado carbapenêmicos vem emergindo como um grande desafio nos cuidados a saúde. Uma das muitas enterobactérias que apresentam resistência aos carbapenêmicos é *K. pneumoniae* (KpC) e, ao longo dos últimos 10 anos, têm-se visto um aumento progressivo no número de surtos em que elas estão relacionadas (LIMBAGO et al., 2011; YGITI et al., 2001).

A KpC é resistente a quase todos os antimicrobianos disponíveis e infecções causadas por elas vem acarretando altas taxas de mortalidade. O mecanismo mais importante de resistência por KpC é a produção de uma enzima, a carbapenemase *bla_{KpC}*. A grande capacidade de disseminação do gene *bla_{KpC}* está ligado à disseminação plasmidial e a associação com transposon Tn4401 (CUZON, 2011). Os carbapenêmicos são frequentemente utilizados como último recurso para tratamento de cepas bacterianas resistentes (ENDIMIANI et al., 2008). As opções terapêuticas para o tratamento de KpC são polimixina B, tigeciclina e até os aminoglicosídeos, porém, quando a sensibilidade a estes é confirmada pelo resultado da cultura e antibiograma (ANVISA, 2014).

Escherichia coli

A espécie *Escherichia coli* abrange uma enorme população de bactérias que exibem um grau elevado tanto de diversidade genética quanto fenotípica. É um dos habitantes mais comuns do trato gastrointestinal e sua presença em água e alimentos é um dos principais indicadores de contaminação fecal. Esta estreita relação com as fezes de humanos e animais, representa a base de testes de contaminação fecal utilizados na Saúde Pública. Ela não é normalmente patogênica, entretanto pode estar associada a infecções no trato urinário (TRABULSI, ALTERTHUM, 2008; TORTORA, FUNKE, CASE, 2008; HARADA et al 2011).

Cepas de *E.coli* podem ser resistentes a um número crescente de antimicrobianos, mas dificilmente uma mesma espécie apresenta resistência a mais de dois ou três fármacos. Como outras formas de vida, as cepas de *E. coli* evoluem através de processos naturais de mutação, duplicação e transferência horizontal de genes (LAWRENCE, OCHMAN, 1998). Ela possui a capacidade de transferência de DNA bacteriano através da conjugação, transdução ou transformação, o que permite a propagação horizontal do material genético para a população existente (BRÜSSOW, CANCHAYA, HARDT, 2004). Algumas cepas patogênicas normalmente são responsáveis por surtos de diarreia, muitas vezes fatais para crianças principalmente em países em desenvolvimento (NATARO, KAPER, 1998). Particularmente o patotipo O157:H7, quando envolvido, acomete frequentemente crianças e idosos, através de alimentos (carnes e vegetais) e água contaminada, podendo causar uma diarreia aguda com risco de comprometimento renal (HUDAULT, GUIGNOT, SERVIN, 2001; JURE et al, 2010).

A veiculação hídrica de cepas de *E. coli* expressando fatores de virulência e mecanismos de resistência contra antimicrobianos, pode exercer um papel importante para o surgimento de surtos que podem acometer um grande número de pessoas que eventualmente consomem e utilizam água contaminada para lavagem de alimentos e para o lazer (HARADA, 2011).

Pires (2007), em seu estudo sobre suscetibilidade bacteriana das infecções comunitárias indicou que *E. coli* são mais vulneráveis à amicacina (98,6%), gentamicina (96,2%), quinolonas (90,9%) e norfloxacina (89,8%), apresentando resistência em alguns casos também a sulfametoxazol-trimetoprima (50,6%).

Antimicrobianos

Davies e Davies (2010) afirmam que a partir do final do século XIX, houve um estímulo para a busca de medidas preventivas e terapêuticas devido à descoberta de que várias doenças eram causadas por um certo tipo de agentes infecciosos. Porém, somente em meados do século XX, com a introdução dos antimicrobianos, houve o desenvolvimento de um tipo de tratamento apto a combater infecções causadas por bactérias. Contudo, graças ao fenômeno da resistência, devido principalmente, à ampla utilização de drogas para o combate da infecção, as opções de tratamento vêm ficando cada vez mais escassas (PAPP-WALLACE, 2011).

Diversos antimicrobianos utilizados no tratamento de infecções são sintetizados por microrganismos encontrados no ambiente, sendo que nestes a principal função destes compostos é inibir o crescimento de outros organismos, diminuindo a competição interespecífica. Desta forma, alguns mecanismos de resistência evoluíram para cada vez mais serem capazes de evitar a ação destes compostos, sendo seus produtores a principal fonte de genes de resistência (TAVARES, 2009).

Tem sido discutido o papel de substâncias antimicrobianas como sinalizadores no meio ambiente. Isto porque, em baixas concentrações, elas desencadeiam mudanças específicas no transcriptoma bacteriano que são diferentes da resposta geral ao estresse (MARTINEZ, 2009).

Presença de antimicrobianos no ambiente aquático

Ambientes aquáticos constituem não só uma fonte de disseminação de organismos resistentes aos antibióticos entre populações humanas e animais, como também é são considerados como a principal via pela qual genes de resistência são introduzidos em ecossistemas naturais. Bactérias ambientais funcionam como uma fonte ilimitada de genes capazes de adquirir resistência quando entram em contato com organismos patogênicos. Além disso, a introdução e acúmulo progressivo no ambiente de agentes antimicrobianos, detergentes, desinfetantes e resíduos industriais, contribuem para a evolução e disseminação de tais organismos resistentes na água ambiente. O uso contínuo de diversos agentes antimicrobianos ao longo dos anos pode ter favorecido o desenvolvimento de mecanismos de resistência nos microrganismos, o que pode representar um risco em potencial não só para seres humanos e animais como também para os ecossistemas aquáticos que podem vir a ser prejudicados por estas substâncias (ANDERSSON, 2003; CONSTANZO, MURBY E BATES, 2005; MARTINS, et al., 2014).

De acordo com Coculescu (2009), a resistência microbiana aos antimicrobianos tornou-se, nas últimas duas décadas, um processo rápido e descontrolado em todo o mundo. Hoje, ela é debatida como um dos principais problemas de Saúde Pública a nível mundial. Os ambientes aquáticos são locais de intensa troca de material genético, em que originalmente bactérias sensíveis podem tornar-se resistentes através da transferência horizontal de genes, processo este que representa uma ameaça à Saúde Pública, pois patógenos oportunistas podem tornar-se resistentes aos diversos antimicrobianos (TZOC, ARIAS, VALIENTE, 2004; BENETT, 2008; ASH; MAUCK; MORGAN, 2002; BAQUERO et al., 1998).

A presença de cepas apresentando perfis de multirresistência em ambientes aquáticos vem sendo estudado ao longo dos anos, Gonçalves et al. (2015) afirma que a utilização de gentamicina nos meios empregados para a seleção das cepas nas amostras de água permitem a detecção de grupos de organismos com marcadores de resistência específicos para cepas de origem hospitalar. O uso de cefalotina como meio de seleção ocorre devido a sua ampla utilização no meio comunitário uma vez que este antimicrobiano não está associado a ambientes de alta pressão seletiva. Sendo assim, a presença de cepas resistentes a cefalotina no ambiente aquático deve ser maior quando comparada a presença de cepas resistentes à gentamicina.

Resistência bacteriana

A resistência bacteriana pode ser tanto por um fenômeno genético, relacionado à existência de genes estruturais, que codificam diferentes mecanismos bioquímicos impedindo a ação das drogas, quanto pode estar relacionada à evolução de bactérias devido à presença de agentes antimicrobianos produzidos industrialmente. Algumas bactérias podem tornar-se resistentes através de mutações espontânea que ocorrem em seus genes durante seu processo reprodutivo resultando em erros eventualmente benéficos de cópia na sequência de bases que formam o DNA cromossômico ou através da importação dos genes *intra* e *inter* espécies. Além dos eventos de mutação, a variação genética ocorre como consequência de eventos de recombinação resultantes, em sua maioria, de transferências genéticas entre organismos. As cepas resistentes se tornam predominantes devido à pressão seletiva que os antimicrobianos exercem, fazendo desaparecer as cepas sensíveis. O uso prolongado de antimicrobianos pode, gradualmente, começar a desenvolver resistência em cepas que antes eram consideradas sensíveis (TAVARES, 2000; MARTÍNEZ, 2009).

Alguns dos genes capazes de codificar fatores de resistência em cepas bacterianas existiam antes da introdução de antimicrobianos como meio de tratamento, como mecanismos de defesa contra antimicrobianos produzidos por eles mesmos ou por outros microrganismos no meio ambiente. É a chamada resistência natural, codificada no cromossoma bacteriano. A resistência adquirida aos antimicrobianos surgiu por conta da exposição e seleção de cepas naturalmente resistentes a certos fármacos, por exemplo: em agricultura, medicina humana ou veterinária (BENNET, 2008; COCULESCU, 2009).

A pressão seletiva pelo uso de antimicrobianos não é a única causa da manifestação de resistência. De acordo com Alexander et al. (2015), cinco principais mecanismos são conhecidos por contribuir para o desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos e sua disseminação no ambiente: transferência horizontal de genes, pressão seletiva, predisposição para mutação genética e disseminação de cepas bacterianas resistentes aos antimicrobianos na medicina humana e veterinária. Os mecanismos bioquímicos e genéticos envolvidos na resistência a antimicrobianos são os mais importantes fenômenos envolvidos no processo de seleção e dispersão de genes de resistência (COCULESCU, 2009).

A presença de cepas multirresistentes pode estar relacionada com a capacidade que as bactérias possuem em transferir horizontalmente genes de resistência, levando a uma dificuldade no tratamento de infecções (XIONG et al., 2015; BAJAJ et al., 2014).

As alterações envolvidas na resistência a antimicrobianos são resultado de modificações na estrutura ou no funcionamento da célula bacteriana. Um grande complicador se refere ao enorme potencial de aquisição e montagem de blocos de genes de resistência, e a transferência horizontal por elementos genéticos especializados como os plasmídeos, cassetes de genes e transpósons, através dos quais, as bactérias podem se tornar resistentes a um ou vários agentes antimicrobianos (MA et al., 2009; LEAVITT et al., 2010).

Transferência de plasmídeos

A transferência de genes de resistência, envolvendo elementos genéticos móveis como plasmídeos, é mais eficaz do que a mutação cromossômica, e permite a transferência de genes envolvendo recombinação e transposição, promovendo a captura de diferentes genes de resistência a diversas classes de antimicrobianos utilizados atualmente, principalmente Betalactâmicos, Fluorquinolonas e Aminoglicosídeos, entre diferentes gêneros bacterianos. Os plasmídeos contêm genes que conferem à célula características biológicas adicionais, entre as quais, a expressão de resistência aos antimicrobianos e

determinantes genéticos capazes de aumentar a virulência do microrganismo (BENNET, 2008; CARATOLLI, 2009; TAVARES, 2009, SAN MILLAN et al., 2015).

Muitos plasmídeos são conjugativos, ou seja, promovem a ligação física entre bactérias codificando funções necessárias para promover a transferência horizontal de DNA entre as cepas, promovendo a manutenção do plasmídeo na população bacteriana. Existem plasmídeos que apresentam genes de resistência a um ou mais antimicrobianos, conhecidos como plasmídeos de resistência e que podem existir de maneira autônoma ou integrada aos plasmídeos conjugativos. (HAWKEY; JONES, 2009; TAVARES, 2009; GIEDRAITIENÈ et al., 2011).

Várias famílias de plasmídeos vêm sendo descritas na literatura, principalmente as que se encontram presentes em enterobactérias, associando resistência para diferentes grupos de antimicrobianos, tolerância a metais pesados, produção de toxinas e síntese de enzimas (CARATOLLI, 2009). Chmelnitsky et al. (2009) indentificaram cepas hospitalares de *Klebsiella pneumoniae* expressando genes da família *bla*_{KPC} associados as famílias *bla*_{CTX-M} e *bla*_{SHV}. Coque, Baquero e Canton (2008) realizaram um levantamento em diversos países da Europa sobre a prevalência de *E. coli* e *K. pneumoniae* de origem hospitalar e comunitária e produtoras de ESBL. Nesse estudo, foram identificados clones de plasmídeos para diferentes famílias de ESBL, QNR e *aac(6')-Ib-cr*.

A transferência de plasmídeos por conjugação bacteriana é considerada por alguns autores como o principal mecanismo de resistência bacteriana aos antimicrobianos. Esse processo requer o contato direto célula-célula além de cepas de tipos opostos, nesse caso, as células doadoras devem transportar os plasmídeos e as receptoras não. Em bactérias Gram negativas, o plasmídeo transporta genes que codificam a síntese de *pili* sexuais permitindo a ligação entre as bactérias. Durante esse processo, o plasmídeo é replicado durante a transferência de uma cópia do filamento simples do DNA para o receptor, onde o filamento é sintetizado (TORTORA, FUNKE, CASE, 2008; TAVARES, 2009).

A capacidade de transferência de genes seja por conjugação, ou por outras formas de transferência de material genético como a transdução e/ou transformação forma uma importante rede de comunicação genômica (HAWKEY, JONES, 2009). O genoma bacteriano tem capacidade de estruturação por conta de elementos e mecanismos especializados de recombinação, integração e deleção, incluindo os rearranjos gênicos, determinando enorme plasticidade informacional (MARTINEZ, 2009; STOKES, GILLINGS, 2011).

Uma vez introduzidos na célula bacteriana, os genes podem se incorporar ao cromossomo e se recombinar com ele. A transferência de plasmídeos codificando resistência aos antimicrobianos é uma preocupação em nível de Saúde Pública, tendo atraído a atenção de pesquisadores de todo o mundo (KRUSE; SORUM, 1994).

Betalactamase de Espectro Estendido - ESBL

O início dos anos de 1980 foi marcado pela introdução de cefalosporinas de terceira geração para o tratamento de infecções. A partir de então foi observada uma forte correlação entre o uso de antimicrobianos de amplo espectro e o desenvolvimento de resistência, com um grande aumento no número de betalactamases descritas, principalmente por ESBLs capazes de hidrolisar cefalosporinas e monobactâmicos e cefalosporinas mediadas por plasmídeos (*ampC*) (BAJAJ et al., 2015; BOGAERTS, 2015; DAVIES, DAVIES, 2010).

Quando se trata de bactérias Gram negativas, as ESBLs são um dos principais mecanismos de resistência os antimicrobianos contra os betalactâmicos. As betalactamases são codificadas em genes cromossômicos ou plasmidiais podendo ser adquirida por transferência genética horizontal onde sua principal atividade é conferir resistência a cefalosporinas hidrolizando o anel betalactâmico, destruindo a ação antimicrobiana. Uma exposição prolongada é capaz de selecionar mutações ou levar a uma superprodução de betalactamases capazes de hidrolizar cefalosporinas e monobactâmicos de amplo espectro levando ao surgimento de betalactamases de espectro estendido (ESBLs) inativadas apenas por ácido clavulânico (HAWKEY; JONES, 2009).

Segundo Bush e Fisher (2011), a produção de betalactamase é um dos mecanismos mais frequentemente associados à ocorrência de cepas multirresistentes em Gram negativos, tanto no ambiente hospitalar quanto no comunitário. A associação desses genes betalactâmicos com os genes de outras classes de antimicrobianos é responsável pelo desenvolvimento de resistência a um determinado elemento genético.

Um exemplo da intensa disseminação de betalactamase em enterobactérias são as CTX-M. Estas enzimas vêm sendo descritas no mundo todo, pois são as principais enzimas associadas responsáveis por surtos causados por agentes infecciosos, contudo aquela não é a única família capaz de expressar resistência (CARATOLLI, 2009, SIBH, et al., 2012).

A presença do gene *ampC* é amplamente distribuída entre *Enterobacteriaceae* e, muitas vezes está relacionada com a resistência a Cefotaxima. A expressão fenotípica para

a presença desse gene é causa de preocupação uma vez que a resistência causada por essas enzimas pode resultar em falha terapêutica, sendo necessária a utilização de agentes antimicrobianos mais eficazes como as carbapenemas (BOGAERTS, 2015; LIAO, 2015; MAMMERI et al., 2010).

Os genes que expressam proteínas para betalactamases geralmente estão presentes em regiões transponíveis do cromossomo e/ou de plasmídeos, sendo assim, é possível transferir essa resistência para outros microrganismos, permitindo a disseminação de resistência a estes agentes antimicrobianos (LIVERMORE, 1995). Os genes costumeiramente encontrados em enterobactérias pertencem às famílias TEM, SHV, CTX e OXA, e são classificados de acordo com a sequência de aminoácidos que possuem (HAMMERUM; HEUER, 2009).

Carbapenemases

Os carbapenêmicos são os principais antimicrobianos utilizados para o tratamento de infecções por bactérias produtoras de ESBL, pois possuem um maior espectro de ação contra Gram-negativos. Seus principais integrantes são imipenem, meropenem e ertapenem. O uso inconsequente de carbapenêmicos resultou no surgimento e propagação de cepas resistentes a esses antimicrobianos (CURIÃO, 2010).

A produção de carbapenemase está relacionada com a presença do gene *bla_{KPC}* que, além de ser considerada o principal mecanismo de resistência em Gram negativo, é muitas vezes carregadas por plasmídeos em conjunto com genes de resistência capazes de codificar resistência a outra classe de antimicrobianos (CURIÃO, 2010, MONTEZI, 2015; HENRIQUES, 2012).

Esse panorama revela uma grande ameaça à Saúde Pública mundial, uma vez que restam poucas opções para o tratamento de infecções causadas por bactérias que apresentam resistência aos carbapenêmicos (PAPP-WALLACE, 2011).

Enzimas modificadoras de Aminoglicosídeos – EMAs

Os aminoglicosídeos são antimicrobianos constituídos por três açúcares aaminados, ligados pelas porções glicosídicas, compreendendo a estreptidina (estreptomicina) e as deoxiestreptaminas (outros aminoglicosídeos como gentamicina, tobramicina, amicacina), e que atuam na subunidade 30S do ribossomo bacteriano deformando e alterando o funcionamento dessa organela. São ativos principalmente contra enterobactérias (TAVARES, 2009).

A resistência pode ser de origem cromossômica ou plasmidial, sendo o plasmídeo conjugativo o mais frequentemente associado à resistência. Diversos mecanismos podem estar envolvidos na resistência bacteriana aos aminoglicosídeos, como por exemplo, mutações em genes ribossomais ou transporte de membrana e produção de enzimas que alteram os sítios de ligação (NORDMANN; POIREL, 2005; TAVARES, 2009).

A resistência a gentamicina pode estar associada à presença de todas as classes de EMA, sendo mais frequente nas subclasses *aac(2'-I)*, *aac(3)*, *aac(6')*, *ant(2'')* e *aph(3')* (RAMIREZ E TOLMASKY, 2010). Uma subclasse de acetilases *aac(6')*, a *aac(6')-Ib*, é bastante relevante entre Gram negativos. Esta EMA confere resistência a tobramicina, kanamicina e amicacina mas não a gentamicina.

Um dado interessante é o surgimento de uma *aac(6')-Ib-cr*, uma variante de *aac(6')-Ib*, que além de conferir resistência a aminoglicosídeos, confere resistência também a ciprofloxacina e norfloxacina, estando bastante disseminada entre as enterobactérias (SABTCHEVA et al, 2009; KIM et al, 2011).

Já foram detectados genes para *aac(6')-Ib-cr* associados a genes das famílias QNR, CTX-M, SHV e KPC e contidos num mesmo cassete de genes em diferentes integrons (JIANG et al, 2008; CHMELNISKY et al, 2009).

Resistência a quinolonas mediadas por plasmídeos – PMQR

Quinolonas são antimicrobianos sintéticos que começaram a ser produzidos na década de 60. Com base nisso, imaginou-se que a existência de genes de resistência a quinolonas seria improvável. Acreditava-se que apenas mutações no DNA girase, Topoisomerase IV, diminuição da permeabilidade e/ou excesso de produção de bombas de efluxo resultariam em uma resistência a esses antimicrobianos, portanto, a resistência as quinolonas não poderiam se espalhar através de transferência horizontal de genes (SANCHES, 2008).

Portanto, a resistência as quinolonas não poderiam se espalhar através de transferência horizontal de genes. Contudo, em 1998 foi verificado que bactérias ambientais isoladas antes de sua invenção já possuíam capacidade de promover o efluxo dessas drogas. Codificado em plasmídeos, o QNR, mostrou que a resistência não era a função primária desses mecanismos. Mais recentemente, dois outros mecanismos de resistência às quinolonas foram descritos, a quinolona inativadora de aminoglicosídeo *aac(6')-Ib-cr* e o determinante de efluxo de quinolona, *qepA* (SANCHES et al., 2008; MARTINEZ, 2009).

As quinolonas são compostos que bloqueiam a ação da DNA girase bacteriana resultando no relaxamento de suas espirais, passando a ocupar um espaço maior que o contido

nos limites do corpo bacteriano. Essa resistência pode ocorrer através de mutação cromossômica nos genes que são responsáveis pelas enzimas alvo (DNA girase e topoisomerase IV) ou por alteração da permeabilidade à droga pela membrana celular bacteriana (porinas), mecanismos de bomba de efluxo, proteção de alvo e modificação da droga envolvendo vários genes de origem cromossomal. Essas enzimas são importantes para a replicação, regulação, transcrição e reparo da molécula de DNA bacteriano (NORDMANN; POIREL, 2005; TAVARES, 2009).

Acredita-se que os mecanismos de resistência codificados em plasmídeos tenham se originado no ambiente aquático, já que em bactérias que habitam estes ambientes os genes de QNR estão localizados no cromossomo e apresentam ausência de elementos de transposição ou eventos de inserção (MARTINEZ, 2009; POIREL, LEVIANDIER, NORDMANN, 2006, SANCHES, 2008).

Desde então, diversos genes codificados em elementos transponíveis e mediando a resistência a quinolonas, têm sido relatados e isolados em ambientes clínicos, em humanos e animais, inclusive novas variantes de QNR, capazes de codificar proteínas de bomba de efluxo (CERQUETTI et al., 2009; MA et al., 2009).

1 OBJETIVOS

1.1 Objetivo geral

Analisar cepas isoladas de amostras de água do Complexo Lagunar de Jacarepaguá, procurando comparar dois períodos, no que diz respeito à marcadores de resistência específicos para aminoglicosídeos, fluorquinolonas, beta-lactâmicos e carbapenêmicos.

1.2 Objetivos específicos

- Identificar fenotipicamente as cepas encontradas;
- Caracterizar as cepas através do teste de suscetibilidade aos antimicrobianos;
- Avaliar a capacidade de transferência plasmidial através de ensaios de conjugação bacteriana;
- Analisar genotipicamente os genes codificando para resistência nas cepas, através de ensaios da PCR;
- Comparar os resultados obtidos nas cepas isoladas em 2005/2007 com o das isoladas em 2013;

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Área de estudo

A Região Lagunar de Jacarepaguá é formada pelos rios Guerengüê e Passarinhos. Limita-se pelo Oceano Atlântico e pelos maciços da Pedra Branca e da Tijuca. Possui cerca de 280 Km² de área e é composto por diversos rios que deságuam em suas águas e, que por sua vez, se ligam ao mar pelo canal da Barra da Tijuca, permitindo a troca de água. Toda a área desta sub-região hidrográfica está inserida nos bairros de Jacarepaguá, Barra da Tijuca e Grumará no Município do Rio de Janeiro (SECRETARIA DE ESTADO DO AMBIENTE, 2015).

O Complexo Lagunar de Jacarepaguá está localizado no município do Rio de Janeiro entre a latitude 22°58'W e 23°01'S e longitude 43°0'S e 43°29'W, possui uma área de, aproximadamente, 13,24 km² e é formado por três principais lagoas: Tijuca, Jacarepaguá e Marapendi. A lagoa de Jacarepaguá é a mais interiorizada do conjunto, e possui a área de 4,07 km², Camorim comporta-se como um canal de ligação entre as lagoas da Tijuca, a leste e de Jacarepaguá, a oeste e com área de lagoa de 0,80 km². A lagoa de Marapendi é cercada pela Reserva de Marapendi, uma reserva ecológica criada em 1991 na qual podem ser encontrados exemplares de fauna e flora da lagoa circunvizinha e possui uma largura máxima de 0,35 km com comprimento de 10 km (COMITE BAÍA DE GUANABARA, 2016)

Figura 1 - Indicação dos pontos de coleta realizados em 2005, 2007 e 2013 no Complexo Lagunar de Jacarepaguá



Fonte: Google maps, 2013.

2.2 Coleta de amostras

Foram coletados 100 ml de água em uma única coleta no mes de agosto nos anos de 2005, 2007 e 2013. As amostras foram obtidas da Lagoa de Jacarepaguá, por estar mais afastada da ligação que esse Complexo lagunar tem com o mar; no Canal de Camorim que serve como meio de ligação entre a Lagoa de Jacarepaguá e a Lagoa da Tijuca e na Lagoa de Marapendi pois esta se encontra dentro de uma Área de Proteção Ambiental.

As amostras foram armazenadas em recipientes estéreis, acondicionadas em gelo e transportadas até o Departamento de Microbiologia e Imunologia, na Universidade do Estado do Rio de Janeiro, em um intervalo de 6 horas entre a coleta e a chegada ao laboratório, para a realização de análises microbiológicas.

2.3 Seleção e identificação das cepas

Para a seleção das cepas, 100 mL de água de cada ponto foram inoculadas em garrafas contendo 100 mL de caldo Brain Heart infusion - BHI (Merck) 2X concentrado, contendo 8 µg/mL de gentamicina (Sigma) e contendo 32 µg/mL de cefalotina (Sigma). As garrafas

foram incubadas durante 24 h em estufa a 37°C. Após o tempo de incubação, as amostras foram inoculadas em placas contendo meio Cystine Lactose Electrolyte Deficient Agar – CLED (Oxoid, Hampshire, GBR) pela técnica de esgotamento e, novamente, incubadas por 24 h. em estufa a 37°C. As colônias observadas nas placas após o período de incubação foram submetidas a sucessivas sementeiras em placas contendo meio CLED com antimicrobianos até a obtenção de culturas puras, para a identificação morfológica e bioquímica.

As cepas com características morfo tintoriais compatíveis com as espécies bacterianas de interesse foram identificadas segundo Murray et al. (2007). Foram avaliados: motilidade, produção de H₂S e gás indol, fermentação de glicose e lactose, produção de uréia, utilização de citrato como fonte de carbono, descarboxilação de lisina e ornitina, dehidrolização de arginina, prova de vermelho de metila (VM) e Voges Proskauer (VP). As cepas identificadas foram estocadas em GC medium base, acrescido de 20% de glicerol, a -20°C, para as análises posteriores.

2.4 Determinação do perfil de susceptibilidade aos agentes antimicrobianos

2.4.1 Disco difusão

A determinação do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos foi realizada segundo normas do Clinical Laboratories Standards Institute – CLSI (2014). As cepas estocadas foram sementeiras por esgotamento em MHA (Merck) e incubadas por 18 h. em estufa a 37°C. A partir desse crescimento, preparou-se solução salina (0,85% NaCl) com turvação correspondente ao grau 0,5 da escala de Mc Farland e foram realizados inóculos em placas com MHA utilizando swabs embebidos com as suspensões em solução salina. Sobre a superfície inoculada foram depositados discos contendo os agentes antimicrobianos (Cefar, São Paulo, BRA).

As placas foram incubadas por 18 h., em estufa a 37°C, e os halos de inibição foram analisados segundo Clinical Laboratories Standards Institute - CLSI (2014). A cepa de *E. coli* ATCC 25922 foi usada como controle para os discos de agentes

antimicrobianos e a cepa de *E. coli* ATCC 35218 foi empregada como controle para inibidor de Betalactamase.

Foram utilizados os seguintes agentes antimicrobianos com suas respectivas potências: Cefalotina (30 µg), Cefazolina (30 µg), Cefoxitina (30 µg), Cefuroxima (30 µg), Cefotaxima (30 µg), Ceftriaxona (30 µg), Ceftazidime (30 µg), Cefepime (30 µg), Gentamicina (10 µg), Amicacina (30 µg), Kanamicina (30 µg), Tobramicina (10 µg), Ampicilina (10 µg), Piperaciclina/Taxobactam (100 µg/10 µg), Amoxicilina/ Ácido clavulânico (20 µg/10 µg), Ampicilina/ Sulbactam (10 µg/10 µg), Ciprofloxacina (5 µg), Norfloxacina (10 µg), Imipenem (10 µg), Ertapenem (10 µg), Meropenem (10 µg), Aztreonam (30 µg), Cloranfenicol (30 µg), Tetraciclina (30 µg), e Cotrimoxazol (25 µg).

O uso de meios seletivos viabiliza o isolamento de cepas apresentando perfis de resistência para marcadores de diversas classes de antimicrobianos. Foi considerado então, um grupo de antimicrobianos relevantes como recursos terapêuticos que, ao longo das últimas décadas, tem se constituído como alvo do interesse central na evolução da resistência transferível. Consideramos multirresistentes as cepas que apresentaram resistência a três ou quatro grupos de antimicrobianos, são eles: Cefalosporinas de 3ª e 4ª geração, Aminoglicosídeos, Quinolonas e Carbapenêmicos. A ausência de caráter multirresistente corresponde então, a números de marcadores menores do que três.

Após a leitura dos halos formados no teste de difusão em ágar, as cepas com perfil de resistência para cefalosporinas de 3ª geração foram submetidas ao teste de inibição de betalactamase pelo ácido clavulânico e ao teste de aproximação de disco para a indicação de presença de ESBL de acordo com o CLSI (2014) e, as cepas que apresentaram resistência aos carbapenêmicos testados foram submetidas ao teste com inibidores e potenciador para detecção de carbapenemases segundo a nota técnica da ANVISA (2013).

2.4.2 Teste de inibição de betalactamase pelo ácido clavulânico

A partir do crescimento em ágar, foram preparadas suspensões salinas (0,85% NaCl) com turvação correspondente ao grau 0,5 da escala de Mc Farland e realizaram-se inóculos em placas com MH ágar. Sobre a superfície inoculada foram depositados os discos contendo betalactâmicos isoladamente e conjugado com ácido clavulânico (Oxoid)

e as placas foram incubadas por 18h em estufa a 35°C. Foram consideradas produtoras de ESBLs as cepas que apresentaram halos nos discos conjugados com aumento maior que 5 mm em relação aos discos apresentando somente os betalactâmicos. Foi empregado neste teste cefotaxima e cefpodoxima, ambos associados ao ácido clavulânico (CLSI, 2014). A cepa de *K. pneumoniae* ATCC 700603 foi utilizada como controle positivo para este teste.

2.4.3 Teste de aproximação de discos por difusão de Ágar

A partir do crescimento obtido em ágar, foram preparadas suspensões salinas (0,85% NaCl) com turvação correspondente ao grau 0,5 da escala de Mc Farland e realizaram-se inóculos em placas com MH ágar. Sobre a superfície inoculada foram depositados, lado a lado, discos contendo Ceftazidime, Amoxicilina associada a Ácido clavulânico e Aztreonam, nesta ordem, com distâncias de 20 mm entre eles a partir de seus centros. As placas foram incubadas por 18h em estufa a 37°C e a leitura foi realizada a partir da observação de *ghost zone* ou “zona fantasma” formada nos espaços entre os discos. A cepa de *K. pneumoniae* ATCC 700603 será usada como controle para este teste (CLSI, 2014).

2.4.4 Teste com inibidores e potenciador para detecção de carbapenemases

Para as cepas do grupo CESP (*Citrobacter freundii*, *Enterobacter spp.*, *Serratia spp.*, *Providencia spp.*, *Morganella morganii* e *Hafnia alvei*), foram considerados os resultados para Imipenem e Meropenem, enquanto para os não pertencentes do grupo CESP, também foi considerado o valor para Ertapenem. Foram testados com discos de meropenem e imipenem, com e sem adição de EDTA, Cloxacilina (CLOXA) e ácido fenilborônico (AFB).

Os discos de imipenem e meropenem foram depositados em tampas de placa de Petri estéril e adicionados 10 µg de solução de EDTA, CLOXA e AFB, deixados para secar por cerca de 20 minutos.

A partir do crescimento das cepas a serem testadas, foram preparadas suspensões em solução salina (0,85% NaCl) com turvação correspondente ao grau 0,5 da escala de Mc Farland da cepa *E. coli* ATCC 25922. Após o preparo, a solução foi inoculada em placas de

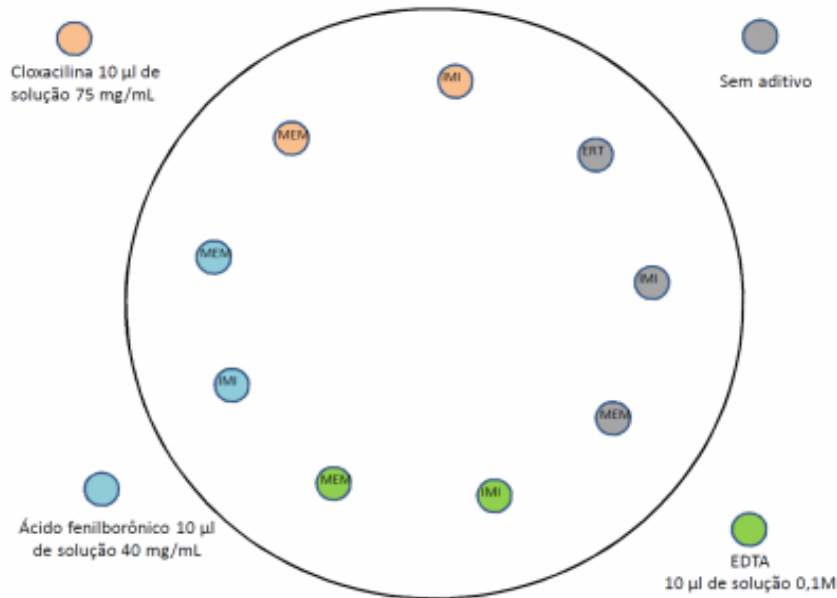
MHA e foram dispostos os discos de antimicrobianos com e sem as soluções de EDTA, CLOXA e AFB.

A cepa *E. coli* ATCC 25922 foi utilizada como controle negativo e *K. pneumoniae* BR-1²³, *K. pneumoniae* KPC-2⁶ e *E. coli* CMY-2³⁷ como controles positivos respectivamente para os discos contendo EDTA, AFB e CLOXA respectivamente.

Para as cepas não pertencentes ao grupo CESP, aquelas que apresentaram diferença de diâmetro >5 mm no halo para os carbapenêmicos com EDTA em relação aos carbapenêmicos sem EDTA foram consideradas potenciais produtoras de metalo-betalactamase; as que apresentaram diferença de diâmetro apenas com AFB foram consideradas produtoras de KpC; as que apresentaram diferença de diâmetro para AFB e CLOXA foram consideradas produtoras de AmpC plasmidial e deficientes de porinas; enquanto as cepas que apresentaram diferença de diâmetro no halo de inibição >5 mm com AFB, CLOXA e EDTA foram consideradas mutantes deficientes em porinas ou produtoras de OXA-48.

Para as cepas pertencentes ao grupo CESP, apenas os resultados de Imipenem e Meropenem foram considerados. Cepas com diferença >5 mm entre o diâmetro do halo de inibição do disco com e sem EDTA foram consideradas potenciais produtoras de metalo-betalactamase. Para os resultados com CLOXA e AFB, a ANVISA recomenda que a detecção dos genes seja realizada através de técnicas de biologia molecular.

Figura 2 - Disposição correta dos diversos discos empregados no Teste com inibidores e potenciador para detecção de carbapenemase ao longo da placa



ERT – ertapenem; MEM – meropenem; IMP – imipenem.

Fonte: ANVISA, 2015

2.5 Ensaios de conjugação bacteriana

As cepas isoladas de amostras de água que expressaram fenotipicamente um maior número de marcadores de resistência foram submetidas a ensaios de conjugação bacteriana segundo Clowes & Hayes (1968). A cepa receptora foi uma *E. coli* K12 R23, que não apresenta plasmídeo e é resistente a 1000 µg/mL de Rifampicina e sensível a antimicrobianos de uso habitual. As cepas foram incubadas em Caldo BHI a 35-37°C “overnight” e, adicionadas em frascos contendo 4,5 mL de Caldo BHI estéril, numa porção de 1:5 doadora:receptora em cada frasco, completando 5 mL. As culturas foram agitadas e incubadas a 35-37°C por 3 h., agitadas novamente e inoculadas em placas de MH ágar 200 µg/ml de rifampicina; 8 µg/mL de gentamicina e 200 µg/ml de rimapicina com 8 µg/ml de gentamicina. As placas foram incubadas a 35-37°C por 24/48 h e analisadas quanto à presença de colônias.

2.6 Detecção de genes por reação em cadeia de polimerase (PCR)

As cepas que apresentarem perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos de interesse, foram submetidas a ensaios de PCR utilizando *primers* de oligonucleotídeos compatíveis com perfil de ESBLs, EMAs e QNRs.

As reações ocorreram de acordo com Van de Klundert, Vliegthart (1993); Arlet, Philipon (1991); Pitout et al. (2004), e Jiang et al. (2008). As amostras de DNA foram obtidas através de suspensão de uma colônia em 100 μ L de água Milli-Q e as reações foram conduzidas em um volume final de 50 μ L.

Foi preparada uma mistura para cada par de oligonucleotídeo com todos os reagentes da reação, que depois foi dividida em alíquotas às quais foram adicionados 2 μ L de cada DNA alvo.

As concentrações finais de cada componente da reação foram: 1,5 mM $MgCl_2$, 0,2 mM de uma mistura de DNTPs, 20 pmol de cada *primer*, tampão de PCR 1x concentrado e 1.25 U DNA Taq Polimerase.

As reações foram submetidas a ciclos de temperatura no termociclador DNA Thermal Cycler. Cerca de 10 μ L de material amplificado foi depositado juntamente com 10 μ L de água miliq em slots de e-gel 2% agarose Invitrogen. A corrida e a visualização das amostras foram realizadas em E-gel safe imagerTM Real-time transilluminator da Life Technology LTDA. A Tabela 1 apresenta os diversos *primers* que foram utilizados.

Tabela 1 - *Primers* compatíveis com perfil de ESB, EMA, QNR e KpC que serão utilizados para ensaios de PCR

Primer	Sequência 5' → 3'	Produto	Referência
Acc3IIa-F Acc3IIa-R	ACT GTG ATG GGA TAC CGC TC CTC CGT CAG CGT TTC AGC TA	237 bp	Van de Klundart e Vliegthart (1993)
TEM-F TEM-R	TTG GGT GCA CGA GTG GGT TA TAA TTG TTG CCG GGA AGC TA	503 bp	Arlet e Philipon (1991)
SHV-F SHV-R	TCG GGC CGC GTA GGC ATG AT AGC AGG GCG ACA ATC CCG CG	625 bp	Arlet e Philipon (1991)
CTX-M-1-F3 CTX-M-1-R2	GAC GAT GTC ACT GGC TGA GC AGC CGC CGA CGC TAA TAC A	499 bp	Pitout et al (2004)
TOHO-1-2F TOHO-1-1R	GCG ACC TGG TTA ACT ACA ATC C CGG TAG TAT TGT CCT TAA GCC	351 bp	Pitout et al (2004)
qnrA up qnrA dw	AAG GAA GCC GTA TGG ATA TT AGC TAA TCC GGC AGC ACT AT	670 bp	Jiang et al (2008)
qnrB up qnrB dw	CGA CCT GAG CGG CAC TGA AT TGA GCA ACG ATG CCT GGT AG	515 bp	Jiang et al (2008)
KPC-F KPC-R	TGT CAC TGT ATC GCC GTC CTC AGT GCT CTA CAG AAA AAC C	1011 bp	Yigti et al (2001)

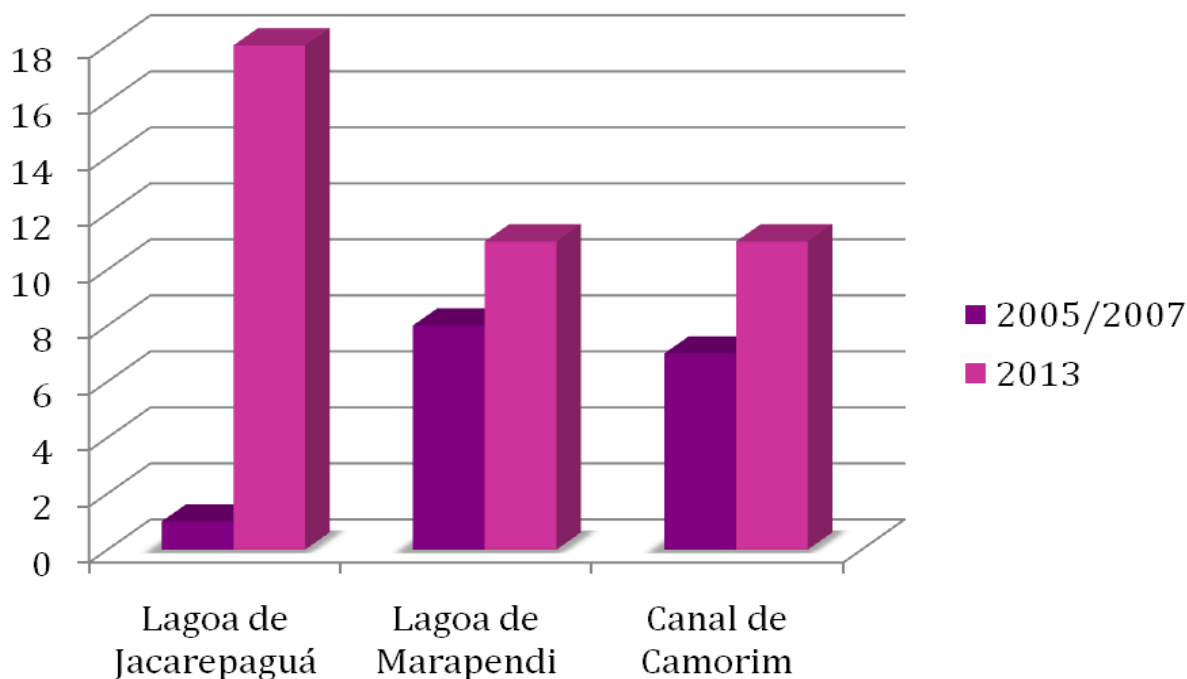
Fonte: A Autora, 2015

3 RESULTADOS

3.1 Seleção e identificação das cepas

Nas amostras de água analisadas em 2005 e 2007 na localidade estudada, foram isoladas 16 cepas de bacilos Gram negativos, sendo 8 (50%) da Lagoa de Marapendi, 1 (6,25%) da Lagoa de Jacarepaguá e 7 (43,75%) do Canal de Camorim. Em 2013, foram isoladas 40 cepas de bacilos Gram-negativos, sendo 18 (45%) da Lagoa de Jacarepaguá; 11 (27,5%) da Lagoa de Marapendi e 11 (27,5%) do Canal de Camorim (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Demonstração quantitativa das cepas obtidas em cada ponto de coleta nos anos de 2005, 2007 e 2013 nas amostras de água coletadas no Complexo Lagunar de Jacarepaguá, região oeste da cidade do Rio de Janeiro

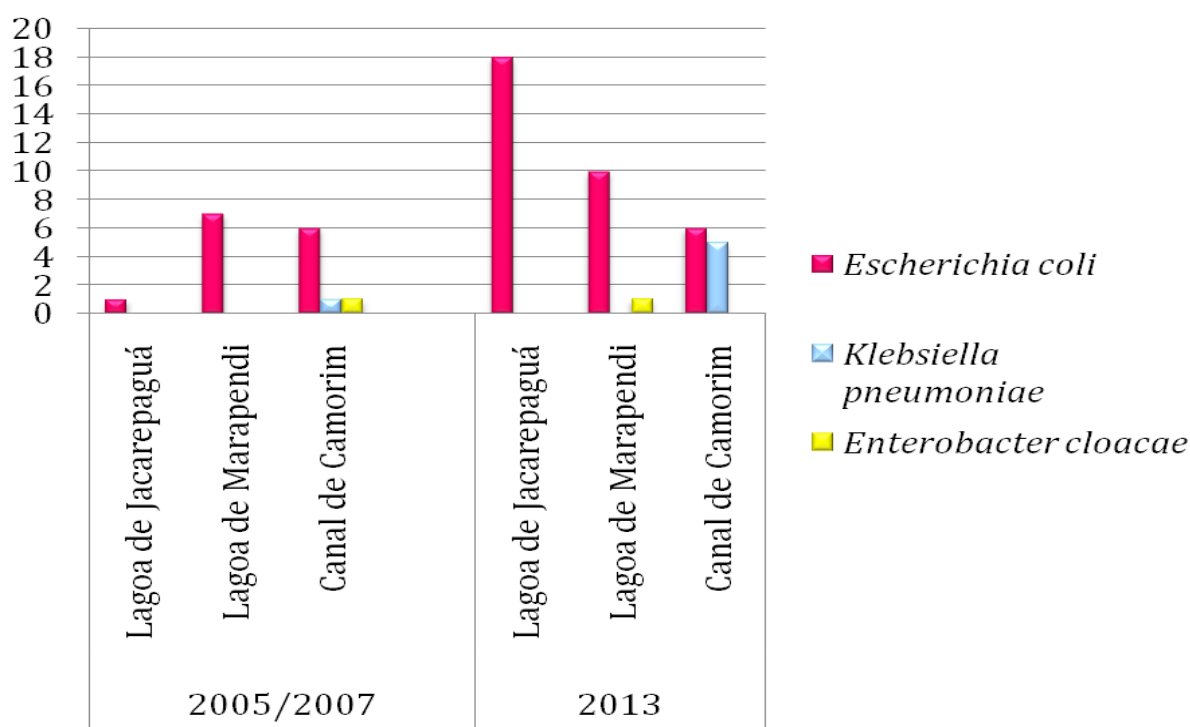


Fonte: A Autora, 2015

Dentre as 17 cepas analisadas entre 2005 e 2007, foi encontrado uma *Escherichia coli* na Lagoa de Jacarepaguá, oito *Escherichia coli* na Lagoa de Marapendi enquanto no Canal de Camorim foram obtidas seis *Escherichia coli*, uma *Klebsiella pneumoniae* e uma

Enterobacter cloacae. Já em 2013, dos 40 isolados, 18 cepas foram identificadas como *Escherichia coli* na Lagoa de Jacarepaguá, na Lagoa de Marapendi foram obtidas 10 *Escherichia coli* e uma *Enterobacter cloacae* e no Canal de Camorim foram isolados seis *Escherichia coli* e cinco *Klebsiella pneumoniae* (Gráfico 2).

Gráfico 2 - Identificação e contagem das espécies isoladas em cada ponto de coleta em 2005, 2007 e 2013 nas amostras de água coletadas no Complexo Lagunar de Jacarepaguá, região oeste da cidade do Rio de Janeiro



Fonte: A Autora, 2015

3.2 Determinação do perfil de susceptibilidade aos agentes antimicrobianos

3.2.1 Disco difusão

Das cepas analisadas em 2005 e 2007, todas (100%) apresentaram resistência a pelo menos três classes de antimicrobianos testados. Sendo constatada a presença de diversas cepas apresentando resistência a cefalosporinas de terceira e quarta gerações, indicativa da presença

de ESBLs, além de resistência a ciprofloxacina e norfloxacina, indicativo para a presença de PMQRs e cepas com perfis de resistência compatíveis com a presença de EMA. Apenas uma cepa apresentou resistência a imipenem, um carbapenêmico utilizado apenas na prática clínica. Dentre as 17 cepas analisadas, 12 (70,5%) foram consideradas multirresistentes de acordo com o ponto de corte pré-determinado nesse estudo (Tabela 2).

Tabela 2 - Perfis de resistência encontrados nas cepas isoladas em 2005 e 2007 no Complexo Lagunar de Jacarepaguá

Ponto de coleta	Cepa	Perfil de resistência
Lagoa de Jacarepaguá	Ec5/05	CFL/CFZ/CRX/CAZ/GEN/AMP/ATM/CLO/TET
Lagoa de Marapendi	Ec1/05	CFL/CFZ/CRX/CTX/CRO/CPM/GEN/TOB/KAN/AMP ASB/CIP/NOR/CLO/SUT/TET
Lagoa de Marapendi	Ec2/05	CFL/CFZ/CRX/CTX/CRO/CPM/GEN/TOB/AMP/ASB CIP/NOR/ATM/CLO/SUT/TET
Lagoa de Marapendi	Ec1/07	CFL/CFZ/CRX/CTX/CRO/CPM/GEN/TOB/KAN/AMP ASB/CIP/NOR/CLO/SUT/TET
Lagoa de Marapendi	Ec2/07	CFL/CFZ/CRX/CTX/CRO/CPM/GEN/TOB/KAN/AMI AMP/CIP/NOR/CLO/SUT/TET
Lagoa de Marapendi	Ec3/07	CFL/CFZ/CRX/CTX/CRO/CPM/GEN/TOB/KAN/AMP ASB/CIP/NOR/ATM/CLO/SUT/TET
Lagoa de Marapendi	Ec4/07	CFL/CFZ/CRX/CTX/CRO/CPM/GEN/TOB/KAN/AMP CIP/NOR/SUT/TET
Lagoa de Marapendi	Ec19/07	CFL/CFZ/CRX/CTX/CRO/CPM/GEN/TOB/KAN/AMP ASB/CIP/NOR/ATM/SUT/TET
Lagoa de Marapendi	Ec20/07	CFL/CFZ/CRX/CTX/CRO/CPM/AMP/ASB/CIP/NOR/ CLO/SUT/TET
Canal de Camorim	Ec4/05	CFL/CFZ/TET/AMP/CIP/NOR
Canal de Camorim	Kp7/05	CFL/CFZ/CRX/CTX/CRO/CPM/GEN/TOB/KAN/AMP ASB/CLO/SUT/TET
Canal de Camorim	Ec5/07	CFL/CFZ/CRX/CTX/CRO/CPM/GEN/AMP/CIP/NOR CLO/SUT/TET
Canal de Camorim	Ec6/07	CFL/CFZ/CRX/CTX/CRO/CPM/GEN/AMP/CIP/NOR CLO/SUT/TET
Canal de Camorim	Ec7/07	CFL/CFZ/CRX/CTX/CRO/CAZ/CPM/GEN/TOB/AMP CIP/NOR/ATM/CLO/SUT/TET
Canal de Camorim	Ec8/07	CFL/CFZ/CRX/CTX/CRO/CPM/GEN/TOB/KAN/AMP ASB/CIP/NOR/ATM/CLO/SUT/TET
Canal de Camorim	Ec14/07	CFL/CFZ/CRX/CRO/CPM/CIP/NOR/IMI/TET
Canal de Camorim	Ec123/07	CFL/CFZ/AMP/CLO

Legenda: Ec- *E. coli*; Kp- *K. pneumoniae*; Ec1- *Enterobacter cloacae*; Cfl- Cefalotina; Cfz- Cefazolina; Crx- Cefuroxima; Caz- Ceftazidima; Ctx- Cefotaxima; Cro- Ceftriaxona; Cpm- Cefepime; Gen- Gentamicina; Tob- Tobramicina; Kan- Kanamicina; Ami- Amicacina; Amp- Ampicilina; Asb- Ampicilina/Sulbactam; Cip- Ciprofloxacina; Nor- Norfloxacin; Imi- Imipenem; Atm- Aztreonam; Clo- Cloranfenicol; Sut- Cotrimoxazol; Tet- Tetraciclina.

Fonte: A Autora, 2015

Com relação às cepas isoladas em 2013, pode-se observar a ocorrência de resistência a pelo menos sete classes de antimicrobianos na totalidade das cepas (100%) tanto naquelas previamente isoladas com gentamicina quanto nas cepas isoladas com cefalotina (Tabela 3).

A tabela nos permitiu verificar a presença de cepas indicativas fenotipicamente para presença de ESBLs apresentando resistência a cefalosporinas de terceira e quarta geração,

resistência a ciprofloxacina e norfloxacina indicando a presença de genes de QNR, verificamos também cepas com perfis fenotípicos compatíveis com genes de EMAs e algumas com resistência a carbapenêmicos, indicando a possível presença do gene *bla_{KPC}*.

Tabela 3 - Perfil de resistência das cepas isoladas em meios contendo 8 µg/mL de Gentamicina e 32 µg/mL de Cefalotina em amostras de água do Complexo Lagunar de Jacarepaguá em 2013 (Continua)

Local de coleta	Espécie	Perfil de resistência
Lagoa de Jacarepaguá	Ec1G/13	CFL/CFZ/CTX/GEN/AMI/TOB/AMP/AMC/SUT TET
Lagoa de Jacarepaguá	Ec3G/13	CFL/CFZ/CTX/GEN/AMI/TOB/AMP/SUT TET
Lagoa de Jacarepaguá	Ec4G/13	CFZ/CTX/GEN/TOB/AMP/AMC/SUT/TET
Lagoa de Jacarepaguá	Ec5G/13	CFZ/CTX/GEN/AMI/TOB/AMP/AMC/ASB/SUT TET
Lagoa de Jacarepaguá	Ec8G/13	CFL/CFZ/CFO/CTX/GEN/AMI/TOB/AMP/SUT/TET
Lagoa de Jacarepaguá	Ec9G/13	CFL/CFZ/CRX/CTX/CRO/GEN/AMI/AMP/AMC CIP/NOR/SUT/TET
Lagoa de Jacarepaguá	Ec10G/13	CFL/CTX/GEN/KAN/TOB/AMP/ASB/SUT/TET
Lagoa de Jacarepaguá	Ec11G/13	CFZ/CRX/CTX/GEN/KAN/TOB/AMP/CIP/NOR SUT/TET
Lagoa de Jacarepaguá	Ec12G/13	CFL/CFZ/CRX/CTX/CRO/GEN/AMP/PPT/AMC ASB/CIP/NOR/IMI/SUT/TET
Lagoa de Jacarepaguá	Ec1CFL/13	CFL/CFZ/CRX/CTX/AMI/AMP/ATM/TET
Lagoa de Jacarepaguá	Ec7CFL/13	CFL/CFZ/CRX/CTX/CRO/AMP/IMI/MER/SUT
Lagoa de Jacarepaguá	Ec8CFL/13	CFL/CFZ/CRX/CTX/CRO/CAZ/CPM/AMI/KAN AMP/NOR/IMI/ETP/MER/ATM/CLO
Lagoa de Jacarepaguá	Ec12CFL/13	CFL/CFZ/CRX/CTX/CRO/CPM/AMI/KAN/AMP AMC/ASB/CIP/NOR/IMI/ETP/MER/TET
Lagoa de Jacarepaguá	Ec15CFL/13	CFL/CFZ/CRX/CTX/CRO/CPM/AMI/AMP/IMI ATM/SUT
Lagoa de Jacarepaguá	Ec16CFL/13	CFL/CFZ/CFO/CRX/CTX/CRO/CAZ/CPM/AMI KAN/TOB/AMP/IMI/ETP/MER/ATM/SUT
Lagoa de Jacarepaguá	Ec27CFL/13	CFL/CFZ/CRX/CTX/AMP
Lagoa de Jacarepaguá	Ec28CFL/13	CFL/CFZ/CRX/CTX/GEN/AMP/NOR/TET
Lagoa de Jacarepaguá	Ec13G/13	CRX/CTX/GEN/AMI/AMP/NOR/SUT/TET
Lagoa de Marapendi	Ec1G/13	CTX/GEN/AMP/SUT/TET
Lagoa de Marapendi	Ec3G/13	GEN/AMP/AMC/SUT/TET
Lagoa de Marapendi	Ec4G/13	CFZ/GEN/AMP/ASB/NOR/SUT/TET
Lagoa de Marapendi	Ec6G/13	CTX/GEN/AMP/SUT/TET
Lagoa de Marapendi	Ec10G/13	GEN/TOB/AMP/ASB/NOR/SUT/TET
Lagoa de Marapendi	Ec12G/13	CFL/GEN/KAN/AMP/SUT/TET

Tabela 3 - Perfil de resistência das cepas isoladas em meios contendo 8 µg/mL de Gentamicina e 32 µg/mL de Cefalotina em amostras de água do Complexo Lagunar de Jacarepaguá em 2013 (Continuação)

Local de coleta	Espécie	Perfil de resistência
Lagoa de Marapendi	Ec15G/13	CFL/CTX/GEN/KAN/TOB/AMP/AMC/ASB/NOR SUT/TET
Lagoa de Marapendi	Ec19CFL/13	CFL/CFZ/CRX/CTX/AMP/SUT
Lagoa de Marapendi	Ec22CFL/13	CFL/CFZ/CRX/AMP/SUT
Lagoa de Marapendi	Ec125CFL/13	CFL/CFZ/CRX
Canal de Camorim	Kp1G/13	CFL/CFZ/CRX/CTX/CRO/GEN/AMP/CIP/NOR SUT
Canal de Camorim	Ec2G/13	CFZ/CTX/GEN/AMP/CIP/NOR/TET
Canal de Camorim	Kp3G/13	CFL/CFZ/CRX/CTX/CRO/GEN/AMP/CIP/NOR CLO/SUT
Canal de Camorim	Kp7G/13	CFL/CFZ/CRX/CTX/CRO/GEN/AMP/AMC/SUT TET
Canal de Camorim	Ec8G/13	CFL/CFZ/CTX/GEN/AMI/TOB/AMP/AMC/ASB CIP/NOR/TET
Canal de Camorim	Kp1CFL/13	CFL/CFZ/CFO/CRX/CTX/CRO/CAZ/CPM/KAN AMP/PPT/AMC/ASB/IMI/ATM
Canal de Camorim	Ec5CFL/13	CFL/CFZ/CRX/CRO/AMP
Canal de Camorim	Ec8CFL/13	CFL/CFZ/CFO/CTX/CRO/CAZ/AMP/PPT/AMC CIP/TET
Canal de Camorim	Ec10CFL/13	CFL/CFZ/CRX/AMP
Canal de Camorim	Kp13CFL/13	CFL/CFZ/AMP/ASB/TET
Canal de Camorim	Ec14CFL/13	CFL/CFZ/CRX/CRO/CPM/CIP/NOR/IMI/TET

Legenda: Ec- *Escherichia coli*; Kp- *Klebsiella pneumoniae*; Ec1- *Enterobacter cloacae*; 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, Ppt- Piperacilina/Tazobactam; Amc- Amoxilina/Acido Clavulânico; Asb- Ampicilina/Sulbactam; Cip- Ciprofloxacina; Nor- Norfloxacinina; Ipm- Imipenem; Etp- Ertapenem; Mer- Meropenem; Atm- Aztreonam Clo- Cloranfenicol; Sut- Cotrimoxazol; Tet- Tetraciclina.

Fonte: A Autora, 2015

Quando levamos em consideração os pontos de cortes pré-determinados, ou seja, apresentando resistência a três ou mais grupos de antimicrobianos, sendo eles ESBLs, EMAs, PMQRs e Carbapenêmicos, foi possível verificar que, nas cepas obtidas na lagoa de Jacarepaguá, nenhuma isolada em 2005 e 2007 apresentou o padrão de multirresistência enquanto nove cepas isoladas em 2013 apresentaram esse padrão; na lagoa de Marapendi, verificamos uma discrepância no padrão de multirresistência, em 2005 e 2007, sete cepas apresentaram perfis fenotípicos compatíveis com os pré-determinados enquanto em 2013, apenas uma cepa apresentou esse perfil; no canal de Camorim, foram obtidas cinco e seis amostras respectivamente apresentando esses perfis (Tabela 4).

Tabela 4 - Padrão de multirresistência pré-determinado como ponto de corte para análise estatística

Local de coleta	ESBL		EMA		PMQR		Carbapenêmicos		Multirresistência	
	05/07	2013	05/07	2013	05/07	2013	05/07	2013	05/07	2013
Lagoa de Jacarepaguá	1	18	1	16	0	7	0	6	0	9
Lagoa de Marapendi	8	4	7	7	8	3	0	0	7	1
Canal de camorim	6	9	5	6	6	6	1	2	5	6

Legenda: ESBL – Betalactamase de espectro estendido; EMA – Enzimas modificadoras de aminoglicosídeos; PMQR- Resistência a quinolona mediada por plasmídeos

Fonte: A Autora, 2015

3.2.2 Identificação de perfis fenotípicos compatíveis com a presença de ESBL

A identificação de perfis fenotípicos compatíveis com a presença de ESBLs foi realizada através dos testes de inibição de beta-lactamase pelo ácido calvulânico e teste de aproximação de disco por difusão em ágar para cepas que apresentaram resistência a cefalosporinas de terceira e quarta gerações.

Das 56 cepas testadas, 18 apresentaram perfil de resistência indicativo para a presença de genes compatíveis com ESBLs, sendo, dentre as 18 cepas positivas, 13 (72%) pertencentes a amostras de água coletadas em 2005 e 2007 e cinco (28%) foram detectadas nas amostras de água coletadas em 2013.

3.2.3 Testes com inibidor e potenciador para detecção de Carbapenemase

Para as cepas que apresentaram resistência a, pelo menos, um dos carbapenêmicos testados: Imipenem, Meropenem ou Ertapenem, foi realizado o teste com inibidores e potenciador para detecção de carbapenemase da ANVISA. Das 56 cepas analisadas, sete (12,5%) apresentaram perfil fenotípico compatível com a produção do gene *bla_{KPC}*.

3.3 Ensaio de conjugação bacteriana

A conjugação bacteriana foi realizada em cepas que apresentaram resistência a Gentamicina. Foram testadas 14 cepas isoladas em 2005/ 2007 e 23 cepas isoladas em 2013. Dentre o total de 37 cepas testadas, onze apresentaram perfis indicativos de transferência plasmidial, todas provenientes das coletas de 2005/2007. Foram obtidas 35 colônias que apresentaram uma provável transferência de DNA plasmidial a partir da observação dos resultados dos testes bioquímicos e dos testes de susceptibilidade aos antimicrobianos.

3.4 Análise estatística

Considerando as perdas de cepas isoladas, principalmente para a coleta de 2005 e 2007, foi realizado o Teste Exato de Fisher, visando indicar as eventuais variações na multirresistência para dois períodos: 2005/ 2007 e 2013.

Para o período de 2005/2007, não encontramos diferença significativa entre Camorim e Marapendi ($p= 0.4467$). Para o período de 2013, constatamos que houve uma diminuição de proporções de cepas multirresistentes quando comparamos Camorim e Marapendi ($p>0,05$); quando comparamos Jacarepaguá e Marapendi, encontramos um valor próximo à significância (Midi $P = 0,05348$); entretanto não houve diferença significativa entre Jacarepaguá e Camorim ($p> 0,05$).

Quando comparados os dois períodos, averiguamos a existência de uma diminuição significativa das proporções de cepas multirresistentes quando comparamos 2005/ 2007 e 2013 ($p> 0,05$). Analiticamente, não encontramos diferenças de proporções de cepas multirresistentes entre 2005/ 2007 e 2013 para o canal de Camorim ($p> 0,05$), mas, sim, para a lagoa de Marapendi ($p= 0,004882$).

3.5 Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)

De acordo com o perfil fenotípico de resistência encontrado nas cepas analisadas, foram realizadas técnicas de PCR para diferentes genes de resistência. As cepas que apresentaram resistência a cefalosporinas de 3^a e 4^a gerações e foram positivas para os testes de inibição de beta-lactamase pelo ácido clavulânico e aproximação de disco por difusão em ágar, foram testadas para a presença dos genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M} e *bla*_{TOHO}. As cepas que apresentaram positividade no teste com inibidores e potenciador para detecção de carbapenemase, foram testadas para a presença do gene *bla*_{KPC}. Para as cepas que apresentaram resistência aos antimicrobianos da classe das fluorquinolonas, foram realizados testes para a presença dos genes *qnrA* e *qnrB*. Para as amostras que apresentaram perfis fenotípicos compatíveis com a presença de genes de aminoglicosídeos, a técnica de PCR foi utilizada para verificar a presença do gene *aacC3* (ANEXOS A, B, C, D).

3.5.1 Presença de betalactamase de espectro estendido

Das 18 (32%) cepas que apresentaram resistência a cefalosporinas de terceira e quarta geração, 14 foram positivas para os testes fenotípicos indicativos da presença de genes de ESBL e submetidas a ensaios da PCR. Três cepas (21,4%) apresentaram produtos de amplificação para o gene *bla*_{TEM}, uma (7,1%) para o gene *bla*_{CTX-M}, uma (7,1%) para o gene *bla*_{TOHO} e nenhuma apresentou produto de amplificação para o gene *bla*_{SHV}. Vale ressaltar que nove cepas (64,3%) apresentaram produtos de amplificação para os genes *bla*_{TEM} e *bla*_{CTX-M} sendo todas provenientes das coletas realizadas nos anos de 2005 e 2007 (Tabela 5).

Tabela 5 - Perfis genotípicos identificados através de ensaios de PCR pra a presença de genes de ESBLs

Espécie	Ponto de coleta	Teste fenotípico de ESBL	<i>bla</i> _{TEM}	<i>bla</i> _{SHV}	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>bla</i> _{TOHO}
Ec8CFL/13	Lagoa de Jacarepaguá	-	NT	NT	NT	NT
Ec12CFL/13	Lagoa de Jacarepaguá	-	NT	NT	NT	NT
Ec15CFL/13	Lagoa de Jacarepaguá	+	+	-	-	-
Ec16CFL/13	Lagoa de Jacarepaguá	+	+	-	-	-
Ec1/05	Lagoa de Marapendi	+	+	-	+	-
Ec2/05	Lagoa de Marapendi	+	+	-	+	-
Ec1/07	Lagoa de Marapendi	+	+	-	+	-
Ec2/07	Lagoa de Marapendi	+	+	-	+	-
Ec3/07	Lagoa de Marapendi	+	+	-	+	-
Ec4/07	Lagoa de Marapendi	+	-	-	+	-
Ec19/07	Lagoa de Marapendi	-	NT	NT	NT	NT
Ec20/07	Lagoa de Marapendi	+	-	-	-	+
Kp7/05	Canal de Camorim	-	NT	NT	NT	NT
Ec5/07	Canal de Camorim	+	+	-	+	-
Ec6/07	Canal de Camorim	+	+	-	+	-
Ec7/07	Canal de Camorim	+	+	-	+	-
Ec8/07	Canal de Camorim	+	+	-	+	-
Ec8CFL/13	Canal de Camorim	+	+	-	-	-

Legenda: Ec- *Escherichia coli*; Kp- *Klebsiella pneumoniae*; CFL- Cefalotina; + positivo; - negativo; NT- não testado.

Fonte: A Autora, 2015

3.5.2 Gene *bla*_{KpC}

Dentre as sete cepas que apresentaram resistência a Imipenem, Ertapenem e Meropenem, nenhuma foi positiva no teste com inibidores e potenciador para detecção de carbapenemase, mesmo assim, foi realizada a técnica de PCR para confirmação dos resultados detectados.

3.5.3 Presença de Plasmídeo Mediando Resistência a Quinolonas

Das 26 cepas que apresentaram resistência aos antimicrobianos da classe das Fluoroquinolonas, 22 (84,6%) foram submetidas a ensaios de PCR, sendo quatro cepas

(18,18%) provenientes da lagoa de Jacarepaguá em 2013; oito (36,36%) obtidas na lagoa de Marapendi nos anos de 2005/ 2007; dez (45,45%) encontradas no canal de Camorim, sendo cinco referentes aos anos de 2005/ 2007 e cinco ao ano de 2013 e nenhuma apresentou positividade para os genes QNRa e QNRb testados.

3.5.4 Enzimas Modificadoras de Aminoglicosídeos

As cepas que apresentaram resistência a pelo menos três dos aminoglicosídeos testados foram submetidas a técnica de PCR para identificação do gene *aacC3*. Das 18 cepas previamente selecionadas, nenhuma apresentou positividade para o gene citado.

4 DISCUSSÃO

Nas regiões Sul e Sudeste é comum a presença de sistemas lagunares e lagoas costeiras, sendo o Rio de Janeiro, um dos Estados que mais apresenta esses sistemas em seu território. Há mais de 5 décadas esses ambientes costeiros vêm sofrendo alterações para ceder lugar ao meio urbano. As regiões da Barra da Tijuca e de Jacarepaguá viveram na década de 70 um intenso processo de ocupação urbana que dura até hoje. (PRAST, BENTO, 2011; ROSMAN, 2012; PIMENTA, MARQUES, ARAÚJO, 2003). Essa ocupação submete esses sistemas a processos de deterioração da qualidade das suas águas. O crescimento populacional, bem como a ocupação irregular da faixa marginal dos corpos hídricos nessa região, não foi acompanhado pelo desenvolvimento de infraestruturas urbanas de água e esgoto fazendo com que a região sofra com a falta de escoamentos sanitários adequados.

Entre 1960 e 2014, a população da Barra da Tijuca cresceu 69 vezes mais do que a do Município do Rio de Janeiro, enquanto Jacarepaguá cresceu 1,9 vezes mais. (Fonte: Adaptado de IPP, 2001). Esta apropriação das margens, associada à incorporação desta área à malha urbana carioca vem fazendo todo o conjunto lagunar sentir a influência do processo ocupacional que a região apresenta. Os aterros e os desmatamentos, concatenados ao despejo de dejetos, rejeitos industriais, lixo e o aporte de água doce do esgotamento sanitário que vem se ampliando ao longo das últimas décadas, está acarretando problemas como assoreamento, mortandade de peixes, mudança na tonalidade da água, mau cheiro, “explosão” de algas, enchentes entre outros fenômenos. (PIMENTA, et al., 2003).

Recentemente os terrenos na Barra da Tijuca e Jacarepaguá, principalmente aqueles localizados no entorno do Complexo Lagunar de Jacarepaguá, têm ganhado mais visibilidade pública, pois irão abrigar parte dos equipamentos para as Olimpíadas de 2016. De acordo com Carvalho (2013), caso não haja uma intervenção política para gerenciar a ocupação, a degradação do meio ambiente lagunar vai se agravar e poderá influenciar na população local.

De acordo com a Secretaria Estadual de Meio Ambiente e Desenvolvimento Sustentável- SEMADS o sistema de esgotamento sanitário da Barra da Tijuca somente foi inaugurado em 2007 quando teve início a operação do emissário submarino. Contudo, foi apenas em 2009 que a estação de tratamento de esgotos da Barra da Tijuca começou a operar. De acordo com a CEDAE (2014), a previsão é que até 2016 toda a rede de esgoto esteja implementada. Se, até o ano de 2007, essa região não tinha tratamento de esgoto, atualmente a CEDAE atende 85% desta área. Devido a demora na implantação do sistema de esgotamento

sanitário, desencadeou-se um problema ambiental nas lagoas do Complexo Lagunar de Jacarepaguá, principalmente porque ambientes aquáticos são um importante local de disseminação bacteriana com genes de resistência capazes de causar infecções em humanos. Em nossos estudos, em especial na área da Lagoa de Marapendi, foi possível observar uma diminuição significativa nos perfis de resistência encontrados nas cepas analisadas em 2013, quando comparadas com as cepas analisadas em 2005 e 2007. Podemos supor que a implantação do sistema de tratamento de esgoto está auxiliando na diminuição de cepas multirresistentes nesse ambiente. Nos outros pontos analisados, observamos de fato, uma mudança nos perfis de resistência, porém ainda é possível encontrar cepas bacterianas multirresistentes com perfis indicativos de ambientes hospitalares.

Devido ao ponto de corte pré-selecionado em nossos estudos, verificamos que na lagoa de Jacarepaguá em 2013 obtivemos 18 cepas com perfil de resistência para ESBLs, 16 para EMAs, sete para PMQRs e seis para KpC. Apuramos também que, de acordo com a nosso critério de multirresistência, nove cepas provenientes da lagoa de Jacarepaguá em 2013 podem ser consideradas multirresistentes. Devido à perda de cepas nas amostras de água analisadas em 2005/ 2007, dispusemos apenas uma cepa com perfil de resistência compatível com ESBL e EMA e nenhuma com perfil de multirresistência. Em Marapendi foi possível detectar nas amostras de água analisadas em 2013, quatro cepas com perfil de resistência para ESBLs, sete para EMA, três para PMQR e nenhuma para KpC. Em 2005/ 2007 observamos a presença de oito cepas com perfil de resistência para ESBL, sete para EMA, oito para PMQR e nenhuma para KpC. Um dado notável é que nas cepas analisadas em 2005/2007 sete apresentaram perfil de multirresistência enquanto apenas uma apresentou esse perfil nas cepas de 2013. No canal de Camorim em 2013 conferimos que nove cepas apresentaram perfis compatíveis com ESBL, seis com EMA e PMQR e duas para KpC enquanto em 2005/ 2007, seis cepas apresentaram perfil de ESBL, cinco para EMA, seis para PMQR e apenas uma para KpC. De acordo com nossos estudos, o canal de Camorim se manteve equivalente durante os anos de 2005/ 2007 e 2013, onde foi encontrado cinco e seis cepas, respectivamente, com perfis de multirresistência compatíveis com os previamente selecionados.

A família Enterobactériaceae está entre as principais encontradas na microbiota de humanos e animais. De acordo com Said (2015), essas bactérias, quando encontradas em águas residuais e diferentes ambientes, indicam contaminação ambiental por material fecal devido ao despejo de esgoto sem tratamento prévio.

Foi possível detectar a presença de 16 cepas de Enterobacteriaceae isoladas em 2005 e 2007 e 40 cepas isoladas em 2013. Em todos os anos foi possível verificar a predominância

de *Escherichia coli*, aparecendo em 87,5% das cepas identificadas em 2005 e 2007 e em 82% das cepas identificadas em 2013. Foi possível detectar uma igualdade numérica de *Klebsiella pneumoniae* (6,25%) e *Enterobacter cloacae* (6,25%) nas cepas provenientes dos anos de 2005 e 2007 enquanto em 2013, houve prevalência de *Klebsiella pneumoniae* (14%) sobre a *Enterobacter cloacae* (4%).

Durante nossas análises, verificamos a presença de cepas de *E. coli* multirresistentes em todos os ambientes analisados. Na lagoa de Jacarepaguá, obtivemos um total de 19 cepas de *E. coli* sendo nove apresentando perfil de multirresistência; na lagoa de Marapendi, notamos uma alteração no perfil resistência ao longo dos anos estudados, das 18 cepas analisadas, as oito obtidas em 2005/ 2007 foram identificadas como multirresistentes enquanto das dez cepas obtidas em 2013, apenas duas apresentaram esse caráter; no Canal de Camorim foram detectadas sete cepas de *E. coli*, sendo 5 provenientes dos anos de 2005/ 2007 e duas do ano de 2013, todas com perfil de multirresistência. Lawrence (1998) afirma que cepas de *E. coli* são resistentes a diversos antimicrobianos, porém dificilmente elas apresentam perfis de resistência para dois ou mais grupos de antimicrobianos sendo vulnerável para amicacina, gentamicina e quinolonas, entretanto, em nossos estudos, obtivemos cepas de *E. coli* resistentes a mais de três grupos de antimicrobianos, incluindo ao grupo dos antimicrobianos citados acima.

A presença de *Klebsiella pneumoniae* se restringiu ao Canal de Camorim e pudemos verificar a presença de quatro cepas, sendo uma encontrada em 2005/ 2007 e três analisadas em 2013, dentre as quais, duas apresentaram perfis de multirresistência. Nathisuwan (2012) afirma que algumas *k. pneumoniae*, quando capazes de produzir betalactamase, se tornam resistentes a antimicrobianos como aminoglicosídeos, fluoroquinolonas, tetraciclina, cloranfenicol e trimetoprim/ sulfametoxazol, dados esses que vão de encontro com os nossos, uma vez que nossas cepas conferiram resistência a todos os antimicrobiano citados.

A presença de *Enterobacter cloacae* foi encontrada em baixa quantidade, apenas uma amostra foi obtida em cada ano de coleta e nenhuma apresentou perfil de multirresistencia. Wisplinghoff (2004) atesta que essa espécie apresenta resistência para ampicilina, amoxicilina e cefalosporinas corroborando com nossos dados, pois as cepas de *Enterobacter cloacae* apresentou resistência aos grupos de antimicrobianos citados, porém não foi detectado resistência a ampicilina em nossos estudo, mas uma cepa apresentou resistência ao cloranfenicol.

Ambientes de água são agentes cruciais para a coexistência e antagonismo de organismos resistentes originados de locais altamente seletivos com bactérias ambientais

desempenhando um papel importante como reservatório de genes de resistência (COUTINHO, 2014). A presença e propagação de antimicrobianos no meio ambiente vêm desencadeando a resistência bacteriana a diversos grupos de antimicrobianos especialmente em águas residuais (CZEKALSKI et al., 2015; EVERAGE et al., 2014).

Como esse tipo de ecossistema é ideal para a transferência de material genético entre bactérias, é possível detectar cepas multirresistentes às diversas famílias de antimicrobianos estudadas. Os genes de resistência a antimicrobianos que conferem característica de resistência são atualmente discutidos como contaminantes ambientais emergentes (BERGERO, 2015; CZEKALSKI, 2015).

Em nossos estudos, todas as 56 cepas isoladas apresentaram resistência a, pelo menos, um dos antimicrobianos testados. Diversos estudos sugerem que a poluição ambiental é capaz de promover a propagação da resistência em ambientes aquáticos. A descarga de águas residuais influencia na diversidade de microrganismos resistentes e de genes de resistência (COUTINHO et al., 2014; CZEKALSKI et al., 2012; TACÃO, CORREIA, HENRIQUES, 2012; TACÃO, CORREIRA, HENRIQUES, 2015).

As cepas isoladas foram identificadas como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter cloacae* e apresentaram resistência principalmente às cefalosporinas de 3ª e 4ª gerações. Segundo Van Hoek (2015), a resistência bacteriana a cefalosporinas de 3ª e 4ª gerações está muitas vezes associada à contaminação fecal, principalmente entre estas espécies bacterianas.

Entre as cepas testadas em 2005 e 2007, todas apresentaram resistência a, pelo menos, seis grupos de antimicrobianos enquanto em 2013, todas apresentaram resistência a sete grupos de antimicrobianos. Além dos níveis elevados de resistência, a maior preocupação foi a presença de 18 cepas resistentes a cefalosporinas de 3ª e 4ª gerações, positivas para a presença de genes de ESBLs associadas com resistência a aminoglicosídeos, trimetoprim/suflametoxazol e tetraciclina. Contudo, entre as cepas analisadas por nós, os níveis de cepas resistentes inclusive à fluorquinolonas não foram consideráveis. Bogaerts (2015), realizou um estudo com 169 cepas de enterobactérias isoladas de ambientes aquáticos, no qual 22 apresentaram resistência a cefalosporinas de 3ª geração. O autor pode associar a presença de ESBLs à resistência a aminoglicosídeos, fluorquinolonas, trimetoprim/sulfametoxazol e tetraciclina principalmente nas cepas de *E. coli* e *K. pneumoniae* assim como em nossos estudos.

Akiba (2015) isolou um total de 209 de *Enterobacteriaceae* encontradas em diferentes de amostras de água onde foi possível detectar resistência a cefazolina acima de 40%,

imipenem e cloranfenicol acima de 54%. Houve também uma resistência a cefalotina de 80% e 50% em relação a tetraciclina, kanamicina e cotrimoxazol. Em nossos estudos, foi possível observar resistência a cefalotina e cefazolina em 75% das cepas estudadas, enquanto 66% das cepas apresentaram resistência a tetraciclina e cotrimoxazol. Porém, imipenem, cloranfenicol e kanamicina apresentaram frequência de resistência menor que 30% nas nossas amostras. A presença de uma alta resistência a cefalosporinas de primeira geração, tetraciclina e cotrimoxazol pode estar relacionada ao uso contínuo desses antimicrobianos em tratamentos infecciosos. Segundo Bouki, Venieri e Diamopoulos (2013) afirmam que a presença de cepas bacterianas resistentes a antimicrobianos é afetada pela origem das águas de esgoto e nem sempre são detectadas altas concentrações de antimicrobianos no ambiente.

A presença de cepas resistentes a tetraciclina se equipara a presença de cepas resistentes a sulfonamidas, nossos dados vão de encontro com os dados encontrados por Czekalski et al.(2015) verificou uma frequência de cepas resistentes a tetraciclina menor, quando comparada com cepas resistentes a sulfonamidas e que, apesar de ter encontrado cepas multirresistentes, a maioria dos lagos estudados permaneceram abaixo do limite de detecção de multirresistência.

Uma das principais preocupações mundiais é a disseminação de resistência, principalmente quando se tratam de *Enterobacteriaceae* exibindo resistência as cefalosporinas de terceira geração. Em nossos estudos foi possível observar que 89% das cepas analisadas apresentaram resistência a cefalosporinas de 3ª e 4ª gerações. De acordo com diversos autores, essa resistência pode ser mediada pela produção de Betalactamases de Espectro Estendido (ESBLs) que muitas vezes se encontra associada a Enterobactérias de origem fecal como *Citrobacter spp*, *Enterobacter spp.*, *Escherichia coli* e *Klebsiella spp.* (VAN HOEK et al., 2015; COQUE, BAQUERO, CANTÓN, 2008; BOGAERTS et al., 2015).

Em nossos estudos, 32,4% (18/56) foram positivas fenotipicamente para a presença de tais genes de resistência apesar das Enterobactérias produtoras de ESBLs serem amplamente detectadas em ambientes aquáticos.

Até o final dos anos de 1990, a maioria das cepas expressando betalactamases de espectro estendido, apresentava os genes de resistência *bla*_{TEM} e *bla*_{SHV}, fato este, que corrobora com nossos estudos que detectaram a presença do gene *bla*_{TEM} em 76% das cepas. Contudo, o gene *bla*_{SHV} não apareceu em nenhuma das cepas analisadas. O gene *bla*_{TEM} é um dos genes de resistência mais frequentemente transmitidos por plasmídeos, que conferem resistência às penicilinas e cefalosporinas de amplo espectro (BAJAJ et al., 2014, BASTOS et al., 2015).

Mais recentemente o gene *bla*_{CTX-M} vem se difundindo rapidamente e tem sido detectado em cepas de diversos países tanto em amostras de origem humana, quanto de origem animal e de meio ambiente (BASTOS et al. , 2015; BOGAERTS et al., 2015). Em nossos estudos, 58,8% das amostras analisadas apresentaram *bla*_{CTX-M}. Diversos autores verificaram que, apesar de se detectar cepas com genes *bla*_{TEM} e *bla*_{SHV}, a presença de *bla*_{CTX-M} vem se tornando cada vez maior e mais frequente. Bajaj et al. (2014) verificou que 15% de suas cepas apresentaram o gene *bla*_{CTX-M} e suas variantes, enquanto apenas 3% apresentaram outros genes de ESBL. No estudo de Bogaerts et al. (2015), com 169 cepas, entre as 10 isoladas e produtoras de ESBL, nove albergavam um gene *bla*_{CTX-M}. De acordo com os nossos dados, há indicações de que apesar da presença de genes *bla*_{CTX-M} quase se equiparar em número, a presença de *bla*_{TEM} ainda continua sendo dominante em ambientes aquáticos.

Das 56 cepas analisadas, nove apresentaram perfis fenotípicos compatíveis com a presença do gene AmpC. A presença do gene AmpC vem sendo relatados no mundo todo tanto em seres humanos quanto em animais e no ambiente pois a resistência causada por estas enzimas podem resultar em falha terapêutica sendo necessária a utilização de agentes antimicrobianos mais eficazes. (BAJAJ et al., 2014; BOGAERTS et al.,2015).

A presença de fenótipos-AmpC foi detectada em 16% de nossas cepas porém, quando submetidos a ensaios de PCR, nenhum gene foi detectado assim como Van Hoek et al. (2015b) detectou a presença de fenótipo-AmpC em 68% de seus isolados, no entanto, nenhum gene foi detectado.

Gharout-sait et al. (2015) associa a presença de AmpC com outros genes de resistência como as quinolonas e outros genes de beta-lactamase. Em nossos estudos, as amostras que apresentaram indicação de gene AmpC também apresentaram indicação para outros genes de ESBL. Porém, das amostras que apresentaram perfis fenotípicos para a presença de AmpC, em nenhuma foi detectada a presença do gene através da técnica de PCR.

Existe um aumento significativo na prevalência de Enterobactérias transportando AmpC adquirida principalmente em ambientes hospitalares porém alguns autores relatam a presença desses genes em ambientes comunitários e aquáticos. Esses ambientes são um dos principais meios para uma eventual transmissão de elementos genéticos moveis portadores desses genes de resistência (GAHOUT-SAIT et al., 2015; BASTOS et al., 2015, VAN HOEK et al., 2015b).

Os carbapenêmicos estão entre os mais poderosos betalactâmicos e uma das últimas opções terapêuticas no tratamento de bactérias multirresistentes. A sua utilização para tratamento de graves infecções causadas por ESBLs e, juntamente com um aumento da

incidência de resistência a fluorquinolonas entre as enterobactérias, levou a um aumento da dependência dos carbapenêmicos na prática clínica. (DIENSTMAN et al., 2010; ARNOLD et al., 2011; HENRIQUES et al., 2012).

Em nossos estudos verificamos a presença de sete cepas com perfil fenotípico compatível para a produção de gene *bla_{KPC}*, sendo assim, foram realizados diversos testes fenotípicos incluindo o teste de Hodge modificado. Entretanto, Hirisch e Tam (2010) afirma que devido a sua difícil interpretação, alguns falso-positivos foram relatados. Esses resultados falso-positivos parecem ser mais comuns em isolados produtores de CTX-M e AmpC. Devido à identificação fenotípica de diversas amostras como produtoras de ESBL e AmpC, em nossos estudos foi realizado o teste com inibidores e potenciador para detecção de carbapenemase da ANVISA.

Apesar da presença de perfis fenotípicos compatíveis com a presença de gene *bla_{KPC}*, não foi possível identificar a presença de tais genes em nossos estudos. Inúmeros autores relatam a presença e propagação do gene *bla_{KPC}* em hospitais muitas vezes associados com a presença de outros genes que conferem resistência a ESBLs e fluorquinolonas (ARNOLD et al., 2011; CURIÃO et al., 2010). Cuzon et al. (2010) relataram a presença de genes de *bla_{KPC}* em diversos países, e todas as cepas analisadas apresentaram genes de resistência associadas, principalmente SHV, CTX-M e TEM.

Diversos estudos vêm apresentando a ocorrência de genes de *bla_{KPC}* em ambientes aquáticos, como por exemplo, em rios localizados na França, Portugal e Brasil além de cepas presentes em esgoto no Brasil e Áustria (WOODFORD et al., 2014; GIRLICH POIREL, NORDMANN, 2010; POIREL, 2012; OLIVEIRA et al., 2013; PICÃO et al., 2013; GALLER et al., 2014). O problema da presença desses genes em ambientes aquáticos é a possibilidade deles fluírem para os oceanos e contaminar a água do mar com bactérias multirresistentes fazendo com que esses vetores possam vir a causar infecções em frequentadores de praia. Montezi (2015) afirma que a presença de genes *bla_{KPC}* em águas costeiras já é uma realidade apesar de não ter sido detectado esse gene em nossos estudos.

Esses dados corroboram com os encontrados em nossos estudos, pois apesar de ter sido detectado sete cepas com perfis fenotípicos positivos para a presença de *bla_{KPC}*, nenhuma apresentou perfil genotípico compatível com o objetivo da análise. Dienstman et al. (2010) analisou 30 cepas, dentre elas, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter spp.*, *Klebsiella azaenae* e *Escherichia coli* encontradas em ambientes aquáticos e o fenótipo de KPC não foi detectado em nenhuma delas. De acordo com ele, o Ertapenem apresenta melhor sensibilidade, seguido

de Meropenem e Imipenem o que valida nossos dados já que Imipenem apresentou 100% de resistência nas amostras testadas, seguido por Meropenem e Ertapenem, que apresentaram resistência de 42,8% e 28,5% respectivamente.

Das sete amostras analisadas fenotipicamente para a presença de KpC, nenhuma apresentou positividade para esse teste e, por consequência, também não exibiu a presença do gene *bla_{KPC}* quando as cepas foram analisadas através da técnica de PCR. Henriques et al. (2012) também encontrou níveis baixos de resistência a carbapenêmicos em cepas estudadas em água potável não tratada. Esses resultados suportam as hipóteses levantadas por diversos autores de que a resistência aos antimicrobianos utilizados como ultimo recurso é pouco frequente nos ecossistemas devido ao uso controlado em hospitais e clinicas (HENRIQUES et al., 2012; WOODFORD et al., 2014).

Assim como os betalactâmicos, as fluorquinolonas também compreendem uma família de agentes antimicrobianos que vem sendo amplamente utilizados devido ao seu amplo espectro de atividade. Em nossos estudos foi possível verificar que 26 das 56 cepas testadas apresentaram resistência a, pelo menos, um dos antimicrobianos da família das fluorquinolonas testadas. Desse total, 21 cepas apresentaram resistência a Ciprofloxacina e Norfloxacina. Diversos autores afirmam que numerosos agentes patogênicos vêm apresentando uma resistência às quinolonas nas últimas décadas principalmente devido à sua larga utilização (ADACHI et al.2013; BROWN et al., 2005; XIONG et al., 2015).

Lopes et al. (1998) afirmam que ao longo dos anos houve um aumento da resistência a Ciprofloxacina e Norfloxacina. O aumento da frequência de resistência a Norfloxacina em *Klebsiella* spp é um dado preocupante. Nesse estudo, Lopes et al. (1998) verificaram que o aumento na resistência da *Klebsiella* spp. foi muito mais acentuado para a Norfloxacina do que para a Ciprofloxacina enquanto em nossos estudos pudemos observar um padrão de igualdade em relação a resistência de ambos os antimicrobianos. Já em relação a *Escherichia coli*, nossos dados demonstram que, das 26 amostras que apresentaram resistência às fluorquinolonas, todas foram resistentes à Norfloxacina, enquanto apenas 21 mostraram resistência a Ciprofloxacina o que vai de encontro com os dados encontrados por Lopes et al. (1998) onde as cepas de *E. coli* estudadas apresentaram uma frequência mais baixa de resistência bacteriana e pequenas modificações na sensibilidade em relação a ambos os antimicrobianos testados ao longo dos anos.

Um estudo realizado no rio Ishikawa na cidade de Osaka constatou a presença de *E. coli* com alto perfil de resistência a fluorquinolonas. Das 57 cepas estudadas, todas apresentaram resistência as fluorquinolonas testadas diferente de nossos estudos onde 50%

das *E. coli* isoladas apresentaram resistentes a esse grupo de antimicrobianos. De acordo com Adachi et al. (2013), esses dados sugerem que a presença de *E. coli* resistente a esses antimicrobianos está relacionada com água de esgoto.

O nível de resistência as quinolonas geralmente depende do número de mutações genéticas acumuladas, principalmente quando relacionadas aos genes *qnrA* e *qnrB*. Sabe-se que a origem de *qnrA* é uma bactéria natural prevalente em ambientes aquáticos. Com isso em mente, não detectar *qnrA* usando a técnica de PCR não significa que ele é necessariamente ausente nos ambientes aquáticos estudados. (CZEKALSKI et al., 2015; ADACHI et al.2013).

Assim como em nossos estudos, Czekalski et al. (2015) também não detectou genes de *qnrA* mesmo que fenotipicamente houvesse indicação de resistência bacteriana para esse grupo de antimicrobianos. Czekalski et al. (2015) justifica a ausência de genes de *qnrA* afirmando que é provável que a quantidade numérica desse gene não seja o suficiente para ser rastreado pela sensibilidade dos métodos de PCR utilizados, ou que a especificidade do iniciador é estreita para capturar a diversidade de *qnrA* presente no meio ambiente.

O mesmo se aplica para o gene *qnrB* que também não foi detectado em ambos os estudos citados. Liao et al. (2015) sugere que o gene *qnrB* é mais comumente encontrado do que outros genes de quinolona mediados por plasmídeos. De acordo com Czekalski et al. (2015), os níveis de *qnrB* são baixos para a detecção de correntes em virtude dos instrumentos moleculares aplicados de modo que, a sua detecção em quantidades significativas iria indicar uma forte contaminação de, por exemplo, esgoto sem tratamento prévio.

Fluorquinolonas são fortemente absorvidas no solo e dissolvidas em ambientes aquáticos, essa é outra indicação para a ausência de genes de resistência a esses antimicrobianos. As concentrações desses antimicrobianos testados são fundamentais para a manutenção e enriquecimento de agentes capazes de causar infecções por isso a presença de microrganismos resistentes a fluorquinolonas são encontrados com uma maior frequência e concentração em amostras de efluentes hospitalar (RODRIGUEZ-MOSAZ et al., 2015; XIONG et al., 2015).

Em contrapartida, as concentrações mais baixas de fluorquinolonas foram encontradas em águas residuais urbanas quando comparados com a resistência em hospitais. Tais valores elevados nos ambientes hospitalares podem estar relacionados com o consumo médico, uma vez que a utilização desses antimicrobianos é frequente no tratamento de infecções (RODRIGUEZ-MOSAZ et al., 2015).

Em nossos estudos, não foi possível detectar a presença desses genes de resistência ligados à transferência plasmidial. Acredita-se que exista uma correlação entre a resistência a quinolonas com a capacidade de transferência plasmidial principalmente em relação ao genes *qnrA*, *qnrB*, *qnrD* e *qnrS* (LI et al., 2012; RODRIGUEZ-MOSAZ et al., 2015).

Apesar de não ter sido possível detectar os genes de resistência a fluorquinolonas testados nas amostras estudadas, diversos estudos vêm chamando atenção para o crescimento lento da resistência principalmente a Ciprofloxacina e Norfloxacin, o que parece estar relacionado ao uso restrito, porém frequente, desses antimicrobianos no ambiente hospitalar (LOPES et al., 1998; ADACHI et al. 2013; XIONG et al., 2015).

Assim como a presença de *Enterobacteriaceae* produzindo ESBLs e carbapenemases vem aumentando, a resistência a outros antimicrobianos como os aminoglicosídeos vem sendo relatada em diversos estudos (JAIMEE, HALAMI, 2016; FAROUK, AZZAZY, NIESSEN, 2015). Os aminoglicosídeos são costumeiramente utilizados em terapêutica de animais para agricultura e alimentação. O aumento global de cepas resistentes a aminoglicosídeos vem sendo observado uma vez que após a administração dos antimicrobianos, uma pressão seletiva é criada no animal que, por sua vez excreta no meio ambiente tais compostos (FAROUK, AZZAZY, NIESSEN, 2015).

Em nossos estudos foi possível verificar que 42,8% das cepas analisadas apresentaram resistência a, pelo menos, dois antimicrobianos da classe dos aminoglicosídeos. A presença de cepas com genes de resistência a aminoglicosídeos no meio ambiente pode ser um risco para a saúde humana uma vez que a presença desses genes torna as bactérias tolerantes a quase todos os antimicrobianos da mesma classe, desafiando a sua eficácia terapêutica.

Em 66% das cepas analisadas, a resistência a gentamicina se mostrou prevalente, seguida de 37,5% de tobramicina, 26,7% de kanamicina e 21,4% de amicacina. Bactérias resistentes a gentamicina são comumente encontradas em ambientes aquáticos. Zowawi et al. (2015) verificou a presença de bactérias resistentes a gentamicina em 18% de suas amostras coletadas em água salgada e 16% em águas residuais. A presença de cepas resistentes a amicacina, que é um antimicrobiano de uso hospitalar, corrobora com dados encontrados por Schneider, Nadvorny e Schmidt (2009) onde se verificou que 10% das cepas analisadas apresentaram resistência a amicacina.

A resistência a antimicrobianos do grupo dos aminoglicosídeos em ambientes comunitários pode ser decorrente de despejo de efluentes domésticos, hospitalares e industriais. A presença de cepas resistentes a dois ou mais antimicrobianos pertencentes ao grupo dos aminoglicosídeos está relacionada com o despejo direto de efluentes hospitalares

sem tratamento em ambientes aquáticos, que são passíveis de desenvolver uma resistência intermediária nesse meio (SCHNEIDER, NADVORNY, SCHMIDT, 2009; MEIRELLES-PEREIRA et al., 2002; KRUMMERER, 2004).

A presença de cepas resistentes a aminoglicosídeos geralmente está relacionada com a capacidade de transferência de genes de resistência, através de plasmídeos. Gonçalves et al (2015) afirma que o gene mais frequentemente detectado em linhagens de enterobactérias é o *acc2*. Em nossos estudos não foi possível realizar os ensaios de PCR para o gene *acc2*, porém, 17 cepas que apresentaram resistência a três ou mais antimicrobianos relacionados ao grupo dos aminoglicosídeos foram submetidas a ensaio de PCR para a identificação do gene de resistência *acc3*. Nenhuma das cepas analisadas foi positiva para a presença desse gene. Estudos futuros podem complementar essa análise, uma vez que existe a possibilidade de que se encontre o gene *acc2* nas cepas estudadas.

Zowawi et al. (2015) identificou inúmeras enterobactérias apresentando resistência a aminoglicosídeos, porém, quando submetidas às técnicas de PCR, as amostras que apresentaram o gene *acc3* foram provenientes de estrume de animais criados para abate. Apenas uma porção pouco significativa dos isolados em ambientes aquáticos apresentou resistência aos aminoglicosídeos. Dessas amostras, nenhuma apresentou gene de resistência compatível com *acc3*.

A partir das avaliações realizadas para os perfis de resistência a antimicrobianos das cepas isoladas em 2005/ 2007 consideramos que a presença de cepas multirresistentes está associada à contaminação provável devido a despejos de esgoto associados a ambientes de alta pressão seletiva como hospitais e clínicas humanas e veterinárias.

A comparação de proporções de cepas multirresistentes entre o canal de Camorim e a lagoa de Marapendi não indicou afastamento de uma situação ecológica sistêmica. Porém, reconhecemos a limitação determinada pela análise uma vez que obtivemos apenas duas amostras para cada um dos corpos hídricos citados. Entretanto, a presença de microrganismos multirresistentes detectados, mesmo com limitada amostragem, não deixa de ser preocupante.

Esses dados estão de acordo com análises colimétricas realizadas no ano de 2013 (dados não mostrados) onde foi possível verificar que quando se trata de coliformes termotolerantes, os três pontos analisados se encontram com um grave problema de balneabilidade e potabilidade devido ao alto grau de contaminação encontrado. O mesmo ocorre quando analisamos os índices de coliformes fecais, pois, de acordo com a portaria 518 – CONAMA, a água para consumo humano tem que estar totalmente ausente de qualquer tipo de coliforme. O número mais provável de coliformes fecais para a lagoa de Marapendi foi,

cerca de, 10 vezes menor do que o NMP encontrado na lagoa de Jacarepaguá e para o canal de Camorim. Essa diferença encontrada nos NMPs corrobora com nossos achados em relação a proporção menor de cepas multirresistentes na lagoa de Marapendi. A presença de coliformes na água indica poluição, com o risco potencial da presença de organismos patogênicos.

Nesse caso, podemos talvez considerar dois aspectos de um caráter sistêmico: os fatores internos do Complexo Lagunar e os determinantes do entorno que influenciam no panorama geral do sistema hídrico. Quando realizamos o estudo do complexo lagunar como um todo, comparando-o com os dois períodos, 2005/2007 e 2013, constatamos uma diminuição significativa nas proporções de cepas multirresistentes. Tal fato pode estar relacionado às intervenções no saneamento local, ocorridas desde 2007 com a inauguração do sistema de esgotamento sanitário da Barra da Tijuca, quando teve início a operação do emissário submarino.

Contudo, a forma de reconhecimento do complexo lagunar para os três ambientes analisados fica comprometida pelo achado de diferenças de proporções de cepas multirresistentes em Marapendi quando comparadas a Jacarepaguá e Camorim. A existência de tal diferença pode ser corroborada pelo fato de, para o mesmo período, não termos encontrado diferença significativa para as proporções de cepas multirresistentes entre Jacarepaguá e Camorim.

A indicação de um estado diferenciado da Lagoa de Marapendi, pode se dar devido a efeitos das intervenções ambientais ocorridas no tempo em questão. De fato, podemos constatar certa desigualdade neste ponto em questão, pois Marapendi apresentou uma menor interface associável a processos de impactação quando comparado com os dados obtidos na lagoa de Jacarepaguá e no canal de Camorim. Esses resultados podem estar associados ao fato de que as partes da lagoa de Marapendi encontram-se inseridas em uma área de proteção ambiental. A urbanização em seu entorno é menor e mais homogênea e, presumivelmente, é mais provável a eficácia de processos de controle com menos número de complexos habitacionais.

Ambientes aquáticos recebem grandes quantidades de águas residuais urbanas, resíduos de animais e dos efluentes hospitalares. Esses ecossistemas são ideais para a transferência de material genético entre as bactérias permitindo a disseminação de genes de resistência. Crescente atenção tem sido dada à disseminação de genes de resistência no ambiente aquático devido as suas implicações para a saúde humana (BAJAJ et al., 2015; XIONG et al., 2015, COUTINHO et al., 2014).

Coutinho et al. (2014) afirma que organismos capazes de partilhar o mesmo genoma e, por consequência, as suas diferenças de tolerância a antimicrobianos, pode estar relacionado à presença de elementos genéticos móveis. Foi possível averiguar a capacidade das cepas estudadas em transferir plasmídeos capazes de conferir resistência a gentamicina. A transferência plasmidial tem um papel central na disseminação de resistência aos antimicrobianos em ambientes aquáticos. A capacidade de transferência genética entre enterobactérias pode ser verificada através de ensaio de conjugação bacteriana, nos quais é possível verificar a transferência plasmidial entre cepas de espécies diferentes. Em nossos estudos, todas as cepas selecionadas apresentaram capacidade de transferência de resistência. Esses mecanismos contribuem para o padrão de resistência aos antimicrobianos por uma seleção direta dos processos genéticos espontâneos que a bactéria sofre para se adaptar as mudanças do ambiente (ALEXANDER, 2015).

Das onze cepas analisadas, todas podiam transferir o gene de resistência a gentamicina por conjugação de outras bactérias. Esses dados ratificam os encontrados por Said (2015) onde mais da metade de suas cepas analisadas apresentaram capacidade de transferência de gene através do processo de conjugação bacteriana.

Ambientes aquáticos que recebem matéria orgânica sem um tratamento prévio podem vir a ser fontes para a transmissão de agentes de infecções, o que é especialmente preocupante quando, a partir dos resultados encontrados, podemos verificar a presença de cepas bacterianas com um perfil de multirresistência compatível com cepas comuns em ambientes hospitalares, tornando mais difíceis a cura e o tratamento de eventuais infecções. O problema se agrava quando, através de análises detalhadas, verificamos a capacidade de algumas dessas cepas transferir genes de resistência, o que é descrito poder acontecer em corpos hídricos configurando, assim, um grave problema a nível de Saúde Pública.

CONCLUSÃO

Identificamos a presença de cepas Gram negativas pertencentes a família Enterobacteriaceae com o enfoque em *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter cloacae* com perfis de resistência compatíveis com cepas de origem hospitalar.

Detectamos cepas com perfis de resistência específicos para ESBLs, EMAs, PMQRs e KpC em amostras de água coletadas em 2005/2007 e 2013, que estão intimamente ligados a disseminação de enterobactérias resistentes a antimicrobianos no meio ambiente. Com base nos resultados obtidos, envolvendo amostras de água, torna-se evidente a relevância da detecção de genes de resistência a partir de bactérias presentes nos ambientes, pois elas podem refletir a origem de mecanismos de resistência observada no ambiente hospitalar.

Quando comparados, os dados encontrados em 2005/2007 e 2013 demonstram certa regularidade na presença de cepas multirresistentes durante os anos, porém observamos um aumento na qualidade da água na lagoa de Marapendi. Podemos considerar que essa melhora pode estar relacionada ao fato da coleta ter sido realizada em uma área de proteção ambiental e ao funcionamento da estação de tratamento da Barra da Tijuca. O canal de Camorim se manteve praticamente inalterado no que investigamos, apresentando proporções de cepas com perfis de multirresistência, não significativamente diferentes, em ambas ocasiões. Devido à escassez de cepas obtidas em 2005/2007, a cepa obtida na lagoa de Jacarepaguá não permitiu a comparação, isoladamente, de Jacarepaguá com os dados obtidos para os corpos hídricos, em 2013.

Consideramos a avaliação da contaminação de corpos hídricos por enterobactérias multirresistentes a antimicrobianos associáveis às pressões seletivas de amplo e intensivo uso de antimicrobianos, veiculados por esgoto de instituições, como um potencial recurso adicional aos disponíveis, para a avaliação de condições de degradação ambiental e monitoramento de ações de saneamento. O uso contínuo de antimicrobianos no ambiente favorece a seleção de clones resistentes e, talvez, este seja um dos motivos pelo qual um grande número de bactérias encontradas no meio ambiente apresente resistência a diversos antimicrobianos, incluindo as principais classes de medicamento utilizadas na prática clínica para o tratamento de infecções. Sendo assim, o uso indiscriminado de antimicrobianos, sem acompanhamento clínico, contribui para o aumento da resistência bacteriana e deve ser evitado pela população.

A capacidade de transferência de plasmídeo em cepas ambientais, capazes de carrear vários genes de resistência, facilita a transmissão de mecanismos de resistência entre as bactérias agravando ainda mais o problema.

O meio ambiente parece estar intimamente relacionado a rápida evolução da resistência aos antimicrobianos devido a transmissão destes genes do ambiente para a clinica, sendo considerado um imenso reservatório de genes de resistência. Assim, a vigilância microbiológica constante, incluindo a avaliação dos perfis de resistência em sistemas hídricos, como a estudada, deve permitir detectar a ocorrência ou não da progressão do processo de degradação por aumento da população e pela descarga ilegal de esgoto.

REFERÊNCIAS

ADACHI, F.; YAMAMOTO, A.; TAKAKURA, K.; KAWAHARA, R. Occurrence of fluoroquinolones and fluoroquinolones-resistance genes in the aquatic environment. **Science of the Total Environment**, Osaka: v. 444, p. 508- 514, jan. 2013.

AGÊNCIA Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Disponível em: < http://www.anvisa.gov.br/servicos/audite/manuais/clsi/clsi_OPASM2-A8.pdf>. Acesso em: 6 jul. 2015.

AGÊNCIA Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. **Nota Técnica nº 01/2013**. Disponível em: < [http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/ea4d4c004f4ec3b98925d9d785749fbd/Microsoft+Word+-+NOTA+T%C3%89CNICA+ENTEROBACTERIAS+17+04+2013\(1\).pdf?MOD=AJPERES](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/ea4d4c004f4ec3b98925d9d785749fbd/Microsoft+Word+-+NOTA+T%C3%89CNICA+ENTEROBACTERIAS+17+04+2013(1).pdf?MOD=AJPERES)>. Acesso em: 10 jul. 2015.

AKIBA, M.; SENBA, H.; OTAGIRI, H.; PRABHASANKAS, V. P.; TANIYASU, S.; YAMASHITA, N.; LEE, K. I.; YAMAMOTO, T.; TSUTSUI, T.; JOSHUA, D. I.; BALAKRISHNA, K.; BAIRY, I.; IWATA, T.; KUSUMOTO, M.; KANNAN, K.; GURUGE, K. S. Impact of wastewater from different sources on the prevalence of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* in sewage treatment plants in South India. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Osaka: v. 115, p. 203- 208, feb. 2015.

ALEXANDER, J.; BOLLMANN, A.; SEITZ, W.; SCHWARTZ, T. Microbiological characterization of aquatic microbes targeting taxonomical marker genes and antibiotic resistance genes of opportunistic bacteria. *Science of the Total Environment*, Langernau: 2015.

ALMEIDA, C. A.; GONZALEZ, S. O.; MALLEA, M.; GONZALES, P. A recreational water quality index using chemical, physical and microbiological parameters. **Environmental Science & Pollution Research**, San Luis: v. 19, n. 8, p. 3400 – 3411, mar. 2012.

ANDERSON, D. I. Persistence of antibiotic resistant bacteria. **Elsevier**, Stockholm: v. 6, p. 452-456. 2013.

ARIAS, A. R. L.; BUSS, D. F.; ALBURQUERQUE, C.; INÁCIO, A. F.; FREIRE, M. M.; EGLER, M.; MUGNAIS, R.; BAPTISTA, D. F. Use of bioindicators for assessing and monitoring pesticides contamination in streams and rivers. **Ciência & Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro: v. 12, n. 1, p. 61-72. 2007.

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 Microbiology letters**, Paris: v. 68, n. 1, p. 19-25, nov. 1991

ARNOLD, R. S.; KERRI, A.; THOM, M. A.; SAARIKA, SHARMA, PHILLIPS, M.; JOHNSON, K. J.; MORGAN, D. J. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC)- producing bacteria. **National Institute of Health**, Baltimore: v. 104, n. 1, p. 40- 45, jan. 2011.

ARVANITIDOU, M.; KATSOUYANNOPOULOS, V.; TSAKRIS, A. Antibiotic resistance patterns of enterococci isolated from coastal bathing waters. **Journal of Medical Microbiology**, Thessaloniki: v. 50. P. 1001-1005, may. 2001

ASH, R. J.; MAUCK, B.; MORGAN, M. Antibiotic resistance of Gram-negative bacteria in rivers, United States. **Emerging Infectious Disease**, Kansas: v. 8, n. 7, p. 713-716, jul. 2002.

BACIAS Hidrográficas e Rios Fluminenses: Síntese Informativa por Macroregião Ambiental - SEMADS, 2001. Cooperação Técnica Brasil Alemanha/Projeto PLANÁGUA, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. Disponível em: < <http://www.ciflorestas.com.br/download.php?tabela=documentos&id=875&leitura=s>> . Acesso em: 25 jan. 2016

BAJAJ, P.; SINGH, N. S.; KANAUIA, P. K.; VIRDI, J. S. Distribution and molecular characterization of genes encoding CTX-M and AmpC β -lactamases in *Escherichia coli* isolated from an Indian urban aquatic environment. **Science of the Total Environment**, New Delhi: p. 350-356, oct. 2014.

BAQUERO, F.; NEGRI, M-C.; MOROSINO, M-I.; BLÁSQUEZ, J. Antibiotic-selective environments. **Clinical Infectious Diseases**, Madrid: v. 27, n. 1, p. S5-S11, jan. 1998.

BAQUERO, F.; MARTÍNEZ, J-L.; CANTÓN, R. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. **Environmental Biotechnology**, Madrid: v. 19, p. 260-265, jun. 2008.

BASTOS, M. S.; MENEGUCCI, T. C.; MOREIRA, R. R. B.; GARCIA, L. B.; CARDOSO, C. L.; TOGNIM, C. B. A rapid and simple method to detect ESBL in *Enterobacter cloacae* based on MIC of cefepime. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Maringá: v. 48, n.2, p. 208-211, apr. 2015.

BENNETT, P. M. Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. **British Journal of Pharmacology**, Bristol: v. 153, p. 347-357, jan. 2008.

BERGERO, S.; BOOPATHY, R.; NATHANIEL, R.; CORBIN, A.; LAFLEUR, G. Presence of antibiotic resistant bacteria and antibiotic resistance genes in raw source water and treated drinking water. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Los Angeles: v. 102, p. 370- 374, may. 2015.

BERTO, J.; ROCHENBANCH, G. C.; BARREIROS, M. A. B.; CORRÊA, A. X. R.; PELUSO-SILVA, S.; RADETSKI, C. M. Physico-chemical, microbiological and ecotoxicological evaluation of a septic tank/Fenton reaction combination for the treatment of hospital wastewaters. Elsevier, Itajaí: v. 72, p. 1076-1081, jan. 2009.

BOGAERTS, P.; HUANG, T. D.; BOUCHAHROUF, W.; BAURAING, C.; BERHIN, C.; GARCH, F. E.; GLUPCZYNSKI, Y. Characterization of ESBL- and AmpC-producing *Enterobacteriaceae* from diseased companion animals in Europe. **Microbial Drug Resistance**, Yvoir: 2015.

BOUKI, C.; VENIERI, D.; DIAMADOPOULOS, E. Detection and fate of antibiotic resistant bacteria in wastewater treatment plants: a review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Athens: v. 91, p. 1- 9, may. 2013.

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 the Rio Grande in New Mexico. **Science of the Total Environment**, Albuquerque: v. 366, p. 772- 783, nov. 2006.

BRUSSOW, H.; CANCHAYA, C.; HARDT, W. D. Phages and the evolution of bacterial pathogens: from the genomic rearrangements to lysogenic conversion. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Zürich: v. 68, n. 3, p. 560-602, sep. 2004.

BUSH, K.; FISHER, J. F. Epidemiological Expansion, Structural Studies, and Clinical Challenges of New β -Lactamases from Gram-Negative Bacteria. **Annual Reviews Microbiology**. Indiana: v. 65, p. 455-478, oct. 2011.

CARATTOLI, A. Resistance plasmid families in *Enterobacteriaceae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Rome: v. 53, n. 3, p. 2227-2238, jun. 2009.

CARVALHO, R. P. Qualidade urbana /ambiental no território carioca: o caso do planejamento da Baixada de Jacarepaguá. **Caderno de Geografia**, Minas Gerais: v. 23, n. 40, pp. 67-88. 2013.

CERQUETTI, M.; GARCIA-FERNANDEZ, A.; GIUFRE, M.; FORTINI, D.; ACCOGLI, M.; GRAZIANI, C.; LUZZI, I.; CAPRIOLI, A.; CARATOLLI, A. First Report of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Determinant *qnrS1* in *Escherichia coli* Strains of Animal Origin in Italy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Rome: v. 53, n. 7, p. 3112-3114, jul. 2009.

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**. Tel Aviv: v. 64, n. 4, p. 718-722, oct. 2009.

CLOWES, R. C.; HAYES, W. **Experiments in Microbial Genetics**. 9 ed. Endinburgh: Blackwell Scientific Publications, 1968.

CLSI- Clinical Laboratories Standards Institute. **Performance Standards for antimicrobial disk susceptibility tests**. Approved Standard CLSI Document M2, 2014. Clinical Laboratories Standards Institute, Waine. PA EUA

COCULESCO, B.I. Antimicrobial resistance induced by genetic changes. **Journal of Medicine and Life**, Romania: v. 2, n. 2, p. 114-123, jun. 2009.

COMITÊ da Baía de Guanabara – 2016. Subcomitê de Jacarepaguá. Disponível em: <<http://www.comitebaiadeguanabara.org.br/>>. Acesso em 10 mar. 2015.

COMPANHIA Estadual de Águas e Esgotos – CEDAE, 2014. Programa de Saneamento da Barra da Tijuca, Recreio dos Bandeirantes e Jacarepaguá – PSBJ. Disponível em: <<http://www.cedae.com.br/>>. Acesso em: 9 nov. 2015.

CONSTANZO, S. D.; MURBY, J.; BATES, J. Ecosystem response to antibiotics entering the aquatic environment. **Science Direct**, Sydney, v. 51, p. 218-223. 2005.

COQUE, T.M.; BAQUERO, F.; CANTON, R. Increasing prevalence of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. **Eurosurveillance**, Madrid: v. 13, n. 47, nov. 2008. Disponível em: <<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19044>>. Acesso em: 20 jan. 16.

CORTÊS, M.B.V.; WASSERMAN, J.C.; BASTOS, O.M.; BARCELLOS, R.G.S.; BARBOSA, A.S. Gestão da Qualidade Bacteriológica dos Rios Macacu, Caceribu, Guapi-Açu e Guapi-Macacu, Rj, Brasil. In: CONGRESSO NACIONAL DE EXCELÊNCIA EM GESTÃO, 6 °, 2010, Rio de Janeiro, **Anais...** Rio de Janeiro: ISSN, ago. 2010.

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, may. 2014

CURIAO, T.; MOROSINI, M. I.; RUIZ-GARBOJOSA, P.; ROBUSTILLO, A.; BAQUERO, F.; COQUE, T. M.; CANTÓN, R. Emergence of *bla_{KPC-3}-Tn4401a* associated with a pKPN3/4-like plasmid within ST384 na ST388 *Klebsiella pneumoniae* clones in Spain. **Antimicrobial chemotherapy**, Madrid: v. 65, p. 1608-1614, apr. 2010.

CUZON, G.; NAAS, T.; NORDMANN, P. Functional characterization of *Tn4401*, a Tn3-Based transposon involved in *bla_{KPC}* gene mobilization. **Antimicrobials agents and chemotherapy**, Paris: v. 55, n. 11, p. 5370-5373, nov. 2011.

CUZON, G.; NAAS, T.; TRUONG, H.; VILLEGAS, M. V.; WISELL, K. T.; CARMELI, Y.; GALES, A. C.; NAVON-VENEZIA, S.; QUINN, J. P.; NORDMANN, P. Worldwide diversity of *Klebsiella pneumoniae* that produces β -lactamase *bla_{KPC-2}* gene. **Emerging Infectious Disease**, São Paulo: v. 16, n. 9, p. 1349- 1357, sep. 2010.

CZEKALSKI, N.; SIGDEL, R.; BIRTEL, J.; MATTHEWS, B.; BÜRGMANN, H. Does human activity impact the natural antibiotic resistance background? Abundance of antibiotic resistance genes in 21 Swiss lakes. **Environmental International**, Kastanienbaum: v. 81, p. 45- 55, apr. 2015.

DAVIES, J.; DAVIES, D. Origins and evolution of antibiotic resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Vancouver: v. 74, n. 3, p. 417-433, sep. 2010.

DENTON, M. Enterobacteriaceae. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Leeds: v. 29, n. 3, p. S9 - S22. 2007.

DERRIEN, M.; JARDÉ, E.; GRUAU, G.; POURCHER, A. M.; GOURMELON, M.; JADAS-HÉCART, A.; PIERSON WICKMANN, A. C. Origin of fecal contamination in waters from contrastes areas: Stanols as Microbial Source Tracking markers. **Water Research**, Rennes: v. 46, n. 13, p. 4009 – 4016, set. 2012.

DIENSTMANN, R.; PICOLI, S. U.; MEYER, G.; SCHENKEL, T.; STEYER, J. Avaliação fenotípica da enzima *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) em *Enterobacteriaceae* de ambiente hospitalar. **O Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Novo Hamburgo: v. 46, n. 1, p. 23- 27, feb. 2010.

ENDIMIANI, A.; CARIAS, L. L.; HUJER, A. M.; BETHEL, C. R.; HUJER, K. M.; PEREZ, F.; HUTTON, R. A.; FOX, W. R.; HALL, G. S.; JACOBS, M. R.; PATERSON, D. L.; RICE, L. B.; JENKINS, S. G.; TENOVER, F. C.; BONOMO, R. A. Presence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Klebsiella pneumoniae* isolates possessing *bla_{KPC}* in the United States. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Ohio: v. 52, n. 7, p. 2680-2682, jul. 2008.

EVERAGE, T. J.; BOOPATHY, R.; NATHANIEL, R.; LAFLEUR, G.; DOUCET, J. A survey of antibiotic-resistant bacteria in a sewage treatment plant in Thibodaux, Louisiana, USA. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Louisiana: jun. 2014.

FALAGAS, M. E.; KARAGEORGOPOULOS, D. E. Extended-spectrum b-lactamase-producing organisms. **Science Direct**, Athens: v. 75, p. 345-354, jul. 2009.

FAROUK, F.; AZZAZY, H. M.; NIESSEN, W. M. Challenges in the determination of aminoglycoside antibiotics, a review. **Analytica Chimica Acta**, Giza: v. 890, p. 21- 43, aug. 2015.

GALLER, H.; FEIERL, G.; PETTERNEL, C.; REINTHALER, F. F.; HAAS, D.; GRISOLD, A. J.; LUXNER, J.; ZARFEL, G. KPC-2 and OXA-48 carbapenemase-harboring *Enterobacteriaceae* detected in an Austrian wastewater treatment plant. **Clinical Microbiology and Infection**, Graz: v. 20, p. O132- O134. 2014.

GHAROUT-SAIT, A.; TOUATI, A.; GUILLARD, T.; BRASME, L.; CHAMPS, C. Molecular characterization and epidemiology of cefoxitin resistance among *Enterobacteriaceae* lacking inducible chromosomal *ampC* genes from hospitalized and non-hospitalized patients in Algeria: description of new sequence type in *Klebsiella pneumoniae* isolates. **The Brazilian Journal of Infectious Disease**, Bejaia: v. 19, n. 2, p. 187- 195. 2015.

GIBSON, J. S.; COBBOLD, R. N.; TROTT, D.J. Characterization of multidrug-resistant *Escherichia coli* isolated from extraintestinal clinical infections in animals. **Journal of Medical Microbiology**, Brisbane: v. 59, p. 592-598, jan. 2010.

GIETRATTIENE, A.; VITKAUSKIENE, A.; NAGINIENE, R.; PAVILLONIS, A. Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria. **Medicina (kaunas)**, Lithuania: v. 47, n. 3, p. 137-146. 2011.

GIRLICH, D.; POIREL, L.; NORDMANN, P. Novel ambler class A carbapenem-Hydrolyzing B-lactamase from a *Pseudomonas fluorescens* isolate from the Seine River, Paris, France. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Paris: v. 54, n. 1, p. 328- 332, jan. 2010.

GONÇALVES, V. D.; LENG RUBER, F. B.; FONSECA, B. O.; PEREIRA, R. M. S.; de MELO, L. D. B.; LOPES, U. G., BELLO, A. R.; PEREIRA, J. A. A. 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.

GOULART, M. D. C.; CALLISTO, M. Bioindicadores de Qualidade da Água como Ferramenta em Estudo de Impacto Ambiental. **Revista da FAPAM**, Minas Gerais: n. 2, v. 1, p. 156-164. 2003.

GROOPMAN, P. Superbugs, the new generation of resistant infections is almost impossible to treat. **The New Yorker**, New York: aug. 2008. Disponível em <<http://www.newyorker.com/magazine/2008/08/11/superbugs>>. Acesso em: 20/11/2015.

HAMMERUM, A. M.; HEUER, O. E. Human Health Hazards from Antimicrobial-Resistance *Escherichia coli* of Animal Origin. **Clinical Infectious Diseases**. Copenhagen: v. 48, n. 1, p. 916-921, apr. 2009.

HARADA, K.; MORIMOTO, E.; KATAOKA, Y.; TAKAHASHI, T. Clonal spread of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* isolates among pups in two kennels. *Acta Veterinaria Scandinavica*, Tokio: v. 53, n. 11, p. 2- 7. 2011.

HAWKEY, P. M.; JONES, A. M. The changing epidemiology of resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Birmingham: v. 64, n. 1, p. 3-10, jan, 2009.

HENRIQUES, I. S.; ARAÚJO, S.; AZEVEDO, J. S. N.; ALVES, M. S.; CHOUCANI, C.; PEREIRA, A.; CORREIA, A. Prevalence and diversity of carbapenem-resistant bacteria in untreated drinking water in Portugal. **Microbial Drug Resistance**, Aveiro: 2012.

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.

HOFFMANN, H.; ROGGENKAMP, A. Population genetics of the nomenclature species *Enterobacter cloacae*. **Applied and Environmental Microbiology**, Munich: v. 69, n. 9, p. 5306-5318, sep. 2003.

HORMAECHE, E.; EDWARDS, P. R. A proposed genus *Enterobacter*. **International Bulletin of Bacteriological Nomenclature and Taxonomy**, Atlanta: v. 10, n. 2, p. 71-74, apr. 1960.

HUDAULT, S.; GUIGNOT, J.; SERVIN, A. L. *Escherichia coli* strains colonizing the gastrointestinal tract protect germfree mice against *Salmonella typhimurium* infection. **Gut Journals**, Paris: v. 49, p. 47-55, dec. 2001.

HUDSON, C. M.; BENT, Z. W.; MEAGHER, R. J.; WILLIAMS, K. P. Resistance determinants and mobile genetic elements of an NDM-1-encoding *Klebsiella pneumoniae* strain. **Plosone**, California: v. 9, n. 6, p. e99209, jun. 2014.

IBEKWE, A. M.; MURINDA, S. E.; GRAVES, A. K. Genetic diversity and antimicrobial resistance for *Escherichia coli* from human and animal sources uncovers multiple resistances from human sources. **Plosone**, Sydney: v. 6, n. 6, p. e20819, jun. 2011.

INSTITUTO Estadual do Ambiente – INEA. Disponível em: <<http://www.who.int/eportuguese/publications/pt/>>. Acesso em: 4 may. 2015.

INSTITUTO Municipal de Urbanismo Pereira Passos - IPP, 2010. Domicílios particulares permanentes por existência de banheiro ou sanitário e esgotamento sanitário, segundo as Áreas de Planejamento, Regiões de Planejamento, Regiões Administrativas e Bairros. . Prefeitura da Cidade do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. Disponível em: <<http://portalgeo.rio.rj.gov.br/amdados800.asp?gtema=15>>. Acesso em: 25 jan. 2016.

ISHIDA, Y.; AHMED, A. M.; MAHFOUZ, N. B.; KIMURA, T.; EL-KHODERY, S. A.; MOAWAD, A. A.; SHIMAMOTO, T. Molecular Analysis of Antimicrobial Resistance in Gram-Negative Bacteria Isolated from Fish Farms in Egypt. **The Journal of Veterinary Medical Science**, Hiroshima: v. 72, n. 6, p. 727-734, feb. 2010.

JAIMEE, G.; HALAMI, P. M. Emerging resistance to aminoglycosides in lactic acid bacteria of food origin-an impending menace. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Mysore: v. 100, n. 3, p. 1137- 1151, feb. 2016.

JIANG, Y.; ZHOU, Z.; QIAN, Y.; WEI, Z.; YU, Y.; HU, S.; LI, L. Plasmid-mediated quinolone resistance determinants *qnr* and *aac(6')-Ib-cr* in extender-spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in China. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. Zhejiang: v. 61, n. 5, p. 1003-1006, may. 2008.

JURE, M. A.; CONDORÍ, S.; LEOTTA, G. A.; CHINEN, I.; MILIWEBSKY, E.; ALLORI, C.; AULET, O.; CASTILLO, M. C. de. Detección, aislamiento y caracterización de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga a partir de carne molida fresca proveniente de carnicerías de Concepción, provincia de Tucumán. **Revista Argentina de Microbiología**, La Plata: v. 42, p. 284-287. 2010.

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.

KJERFVE, B.; RIBEIRO, C. H. A.; DIAS, G. T. M.; FILIPPO, A. M.; QUARESMA, V. S. Oceanographic characteristics of an impacted coastal bay: Baía de Guanabara, Rio de Janeiro, Brazil. **Continental Shelf Research**, Rio de Janeiro: v. 17, n. 13, p. 1609-1643. 1997.

KOLAWOLE, O. M.; AJAYI, K. T.; OLAYEMI, A. B.; OKOH A. I. Assessment of Water Quality in Asa River (Nigeria) and Its Indigenous *Clarias gariepinus* Fish. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, Nigeria: Electronic Publication, v.8, n.11, p. 4332-4352, nov. 2011.

KOLAWOLE, O. M.; AJIBOLA, T. B.; OSUOLALE, O. O. Bacteriological Investigation of a wastewater discharge run-off stream in Ilorin, Nigeria. **Journal of Applied Sciences & Environmental Management**, Ilorin: v.3, n.1, p.33-37, may. 2008

KRUMMERER, K. Resistance in the environment. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Freiburg: v. 54, p. 311-320, jun. 2004.

KRUSE, H.; SORUM, H.; Transfer of multiple drug resistance plasmid between bacteria of diverse origins in natural microenvironments. **American Society for Microbiology**; Oslo: v.60, n. 1, p. 4015-1021, 1994

LAWRENCE, J. G.; OCHMAN, H. Molecular aecheology of the *Escherichia coli* genome. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Pennsylvania: v. 95, p. 9413-9417, aug. 1998.

LEAVITT, A.; CHMELNITSKY, I.; COLODNER, R.; OFEK, I.; CARMELI, Y.; VENEZIAN-NAVON, S. Ertapenem resistance among Extended-Spectrum Beta-Lactamase producing *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Clinical Microbiology**, Tel Aviv: v. 47, n. 4, p. 969-974, apr. 2009.

LI, W.; SHI, Y.; GAO, L.; LIU, J.; CAI, Y. Occurrence of antibiotics in water, sediments, aquatic plants, and animals from Baiyangdian Lake in North China. **Chemosphere**, Beijing: v. 89, p. 1307- 1315, jun. 2012.

LIAO, X. P.; FANG, L. X.; LI, L.; SUN, J.; LI, X. P.; CHEN, M. Y.; DENG, H.; YANG, Q. E.; LI, X.; LIU, Y. H. Characterization of chromosomal *qnrB* and *ampC* alleles in *Citrobacter freundii* isolates from different origins. **Infection, Genetics and Evolution**. 2015. Disponível em < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567134815002737>>. Acesso em: 20/01/2016

LIMBAGO, B. M.; RASHEED, J. K.; ANDERSON, K. F.; ZHU, W.; KITCHEL, B.; WATZ, N.; MUNRO, S.; GANS, H.; BANAEI, N.; KALLEN, A. J. IMP-Producing carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in the United States. **Journal of Clinical Microbiology**, Georgia: v. 49, n. 12, p. 4239-4245, dec. 2011.

LIVERMORE, D. M. β -lactamases in laboratory and clinical resistance. **Clinical Microbiology Reviews**. London: v. 8, n. 4, p. 557-584, oct. 1995.

LOPES, A. A.; SALGADO, K.; MARTINELLI, R.; ROCHA, H. Aumento da frequência de resistência à norfloxacin e ciprofloxacina em bactérias isoladas em uroculturas. **Revista da Associação Médica Brasileira**, Salvador: v. 44, n. 3, p. 196- 200. 1998.

LUPO, A.; COYNE, A.; BERENDONK, T. U. Origin and evolution of antibiotic resistance: the common mechanisms of emergence and spread in water bodies. **Frontiers in Microbiology**, Dresden: v. 3, n. 18, p. 1-13, jan. 2012.

MA, J.; ZENG, Z.; CHEN, Z.; XU, C.; WANG, X.; DENG, Y.; LU, D.; HUANG, L.; ZHANG, Y.; LIU, J.; WANG, M. Prevalence of plasmid-mediated Quinolone resistance determinants *qnr*, *aac(6')-Ib-cr*, and *gcpA* among ceftiofur-resistance *Enterobacteriaceae* isolates from companion and food-producing animals. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. Shanghai: v. 53, n. 2, p. 519-524, feb. 2009.

MAMMERI, H.; GUILLON, H.; EB, F.; NORDMANN, P. Phenotypic and biochemical comparison of the carbapenem-hydrolyzing activities of five plasmid-borne AmpC β lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Paris: v. 54, n. 11, p. 4556-4560, nov. 2010.

MARTINS, V. V.; ZANETTI, M. O. B.; PITONDO-SILVA, A.; STEHLING, E. G. Aquatic environments polluted with antibiotics and heavy metals: a human health hazard. **Environmental Science and Pollution Research**, Berlin: v. 21, p. 5873-5878, jan. 2014.

MARTINEZ, J. L. Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. **Environmental Pollution**, Madrid: v. 157, p. 2893-2902, may. 2009.

MARTINEZ, J. L. The role of natural environments in the evolution of resistance traits in pathogenic bacteria. **Proceedings of the Royal Society**, London: v. 276, n. 1667, p. 2521-2530, jul. 2009b.

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 bacteria of importance to human infections. **Brazilian Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro: v.33, p. 287-293, sep. 2002.

MEZZATESTA, M. L.; GONA, F.; STEFANI, S. Enterobacter cloacae complex: clinical impact and emerging antibiotic resistance. **Future Microbiology**, Catania: v. 7, n. 7, p. 887-902. 2012.

MONTEZZI, L. F.; CAMPANA, E. H.; CORRÊA, L. L.; JUSTO, L. H.; PASCHOAL, R. P.; da SILVA, I. L. V. D.; SOUZA, M. C. M.; DROLSHAGEN, M.; PICÃO, R. C. Occurrence of carbapenemase-producing bacterial in coastal recreational Waters. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Rio de Janeiro: v. 45, p. 174-177, 2015.

MURRAY, R. K.; GRANNER, D. K.; MAYES, P. A. RODWELL, V. W. **Harper: Bioquímica**. 14 ed. São Paulo: 2007.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, Baltimore: v. 11, n. 1, p. 142-201, jan. 1998.

NATHISUWAN, S.; BURGESS, D. S.; LEWIS II, J. S. Extended-spectrum b-lactamases: epidemiology, detection and treatment. **Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy**, Texas: v. 21, n. 8, p. 920-928, jan. 2012.

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

OLIVEIRA, A. J. F. C. de; FRANÇA, P. T. R. de; PINTO, 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. **Environmental Monitoring and Assessment**, São Vicente: Springer Science, v. 169, n. 1-4, p. 375-384, oct. 2009.

OLIVEIRA, A. J. F. C. de; PINHATA, J. M. W. Antimicrobial resistance and species composition of *Enterococcus spp.* Isolated from waters and sands of marine recreational beaches in Southeastern Brazil. **Water Research**, São Paulo: EPUB, v. 42, n. 9, p. 2242-2250, apr. 2008.

OLIVEIRA, S.; MOURA, R. A.; SILVA, K. C.; PAVEZ, M.; MCCULLOCH, J. A.; DROPA, M.; MATTÉ, M. H.; MAMIZUKA, E. M.; SATO, M. I. Z.; de CASTRO, A. F. P.; LINCOPAN, N. Isolation of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains belonging to the high-risk multiresistant clonal complex 11 (ST437 and ST340) in urban rivers. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, São Paulo: oct. 2013.

ORGANIZAÇÃO Mundial da Saúde. Disponível em: <<http://www.who.int/eportuguese/publications/pt/>>. Acesso em: 27 mar. 2015.

PAPP-WALLACE, K. M.; ENDIMIANI, A.; TARACILA, M. A.; BONOMO, R. A. Carbapenems: Past, presente and future. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Cleveland: v. 55, n. 11, p. 4943-4960, nov. 2011.

PICÃO R. C.; CARDOSO, J. P.; CAMPANA, E. H.; NICOLETTI, A. G.; PETROLINI, F. V. B.; ASSIS, DIEGO, M.; JULIANO, L.; GALES, A. C. The route of antimicrobial resistance from the hospital effluente to the environment: focus on the occurrence of KPC-producing *Aeromonas spp.* and *Enterobacteriaceae* in sewage. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, Rio de Janeiro: v. 76, p. 80- 85, mar. 2013.

PIMENTA, L. C.; MARQUES, J. S.; de ARAÚJO, R. E. T. Mudanças ambientais e apropriação das paisagens das lagoas da Baaixada de Jacarepaguá ao espaço urbano carioca. In: ENCONTRO NACIONAL DE ANPUR, X, 2003, Belo Horizonte, **Anais...** Belo Horizonte: ISSN, may. 2003.

PIRES, M. C. da S.; FROTA, K. S.; JUNIOR, P. de O. M.; CORREIA, A. F.; CORTEZ-ESCALANTE, J. J.; SILVEIRA, C. A. Prevalência e suscetibilidades bacterianas das infecções comunitárias do trato urinário, em Hospital Universitário de Brasília, no período de 2001 a 2005. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília: v. 40, n. 6, p. 643-647, nov. 2007.

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.

POIREL, L. Environmental KPC-producing *Escherichia coli* isolates in Portugal. *American Society for Microbiology Journals*, Bicêtre: p. 1662-1663, jan. 2012.

POIREL, L.; LEVIANDIER, C.; NORDMANN, P. Prevalence and genetic analysis of plasmid-mediated quinolone resistance determinants QnrA and QnrS in *Enterobacteriaceae* isolates from a Frenche University Hospital. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Paris: v. 50, n. 12, p. 3992-3997, dec. 2006.

PRAST, A. E.; BENTO, L. F. J. Megacidades, vulnerabilidades e mudanças climáticas: Região Metropolitana do Rio de Janeiro. In: Cap. 4 – Vulnerabilidade das lagoas da região metropolitana do Rio de Janeiro face às mudanças climáticas. Fev. 2011. Disponível em: <https://s3.amazonaws.com/tapajos/Megacidades/11_Lagoas.pdf>. Acesso em: 25 jan. 2016.

RAYAN, K. J.; RAY, C. G. **Sherris Medical Microbiology**. 6 ed. Mc Graw Hill. 2014. Disponível em <<http://accessmedicine.mhmedical.com/book.aspx?bookID=1020>>. Acesso em: 24/01/2016

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.

ROSMAN, P. C., 2012. Aspectos Morfológicos de Rios e Estabilidade de Canais de Maré. Apostila de Aulas – Curso de Engenharia Fluvial e Costeira , AECCO - Área de Engenharia Costeira e Oceanográfica, COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

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.

SAID, L. B.; JOUINI, A.; KLIBI, N.; DZIRI, R.; ALONSO, C. A.; BOUDABOUS, A.; SLAMA, K. B.; TORRES, C. Detection of extended-spectrum betalactamase (ESBL)-producing *Enterobacteriaceae* in vegetables, soil and water of the farm environment in Tunisia. **International Journal of Food Microbiology**, Tunis: v. 203, p. 86- 92, mar. 2015.

SALLOTÔ, G. R. B. **Avaliação metagenômica da microbiota do Complexo Lagunar de Jacarepaguá e seus impactos na saúde pública**. 2012. Pós-Graduação – Fundação Oswaldo Cruz. 2012.

SAMPAIO, G. F. **Cianobactérias como parâmetro de qualidade ambiental: um estudo do Complexo Lagunar de Jacarepaguá**. 2008. Mestrado – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2008.

SAN-MILLAN, A.; RIERA, M. T.; QI, Q.; MACLEAN, R. C. Interactions between horizontally acquired genes create a fitness cost in *Pseudomonas aeruginosa*. **Nature Communications**, Zurich: v. 6, apr. 2015.

SÁNCHEZ, S.; MARTÍNEZ, R.; GARCÍA, A.; BLANCO, J.; BLANCO, J. E.; BLANCO, M.; DAHBI, G.; LÓPEZ, C.; MORA, A.; REY, J.; ALONSO, J. M. Longitudinal study of shiga toxin-producing *Escherichia coli* shedding in sheep feces: persistence of specific clones in sheep flocks. **Applied and Environmental Microbiology**, Lugo: v. 75, n. 6, p. 1769-1773, mar. 2009.

SANDERS JR, W. E.; SANDERS, C. C. *Enterobacter* spp.: Pathogens poised to flourish at the turn of the century. **Clinical Microbiology Reviews**, Omaha: v. 10, n. 2, p. 220-241, apr. 1997

SATO, M. I. Z.; BARI, M. D.; LAMPARELLI, C. C.; TRUZZI, A. C.; COELHO, M. C. L. S.; HACHICH E. M. Sanitary quality of sands from marine recreational beaches of São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo: v. 36, p. 321-326, nov. 2005.

SCHNEIDER, R. N.; NADVORNY, A.; SCHMIDT, V. Perfil de resistência antimicrobiana de isolados de *Escherichia coli* obtidos de águas superficiais e subterrâneas, em área de produção de suínos. **Biotemas**. Porto Alegre: v. 22, n. 3, apr. 2009. Disponível em: <<http://150.162.1.115/index.php/biotemas/article/view/19480/17911>>. Acesso em: 16 set. 2015.

SECRETARIA do Estado do Ambiente – SEA. Disponível em: <<http://www.rj.gov.br/web/sea>>. Acesso em: 7 jul. 2015.

SHIBL, A. M.; AL-AGAMY, M. H.; KHUBNANI, H.; SENOK, A. C.; TAWFIK, A. F.; LIVERMORE, D. M. High prevalence of acquired quinolone-resistance genes among *Enterobacteriaceae* from Saudi Arabia with CTX-M-15 β -lactamase. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, Riyadh: disponível on line em 2012.

STOKES, H. W.; GILLINGS, M. Gene flow, mobile genetic elements and the recruitment of antibiotic resistance genes into Gram-negative pathogens. Federation of European Microbiological Societies, Sydney: v. 35, p. 790-819, may. 2011.

TACÃO, M.; CORREIA, A.; HENRIQUES, I. Resistance to Broad-Spectrum antibiotics in aquatic systems: Anthropogenic activities modulate the dissemination of bla_{CTX-M}-like genes. **Applied and Environmental Microbiology**, Aveiro: v. 78, n. 12, p. 4134- 4140, jun. 2012.

TACÃO, M.; CORREIA, A.; HENRIQUES, I. Low prevalence of Carbapenem-resistant bacteria in river water: resistance is mostly related to intrinsic mechanisms. **Microbial Drug Resistance**, Aveiro: v. 21, n. 5, p. 497- 506. 2015.

TAVARES, W. **Antibióticos e quimioterápicos para o clínico**. 2 ed. São Paulo: Atheneu, 2009.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 8 ed. Porto Alegre: Artmed, 2008.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.. **Microbiologia**. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2008.

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, set. 2004.

VAN DE KLUNDERT, J. A.; VLIEGENTHART, J. S. Nomenclature of aminoglycoside resistance genes: a comment. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Leiden: v. 37, n. 4, p. 927-929, apr. 1993

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.

VAN HOEK, A. H. A. M.; VEENMAN, C.; VAN OVERBEEK, W. M.; LYNCH, G.; HUSMAN, A. M. R.; BLAAK, H. Prevalence and characterization of ESBL- and AmpC-producing *Enterobacteriaceae* on retail vegetables. *International Journal of Food Microbiology*, Utrecht: v. 204, p. 1- 8, mar. 2015.

VON SPERLING, M. **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos**. 4 ed. Belo Horizonte: DESA-UFMG, 2009.

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.

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

XIONG, W.; SUN, Y.; ZHANG, T.; DING, X.; LI, Y.; WANG, M.; ZENG, Z. Antibiotics, antibiotic resistance genes and bacterial community composition in fresh water aquaculture environment in China. **Environmental Microbiology**, Hong Kong: publicado on line: mar. 2015.

YIGIT, H.; QUEENAN, A. M.; ANDERSON, G. J.; DOMENECH-SANCHEZ, A.; BIDDLE, J. W.; STEWARD, C. D.; ALBERTI, S.; BUSH, K.; TENOVER, F. C. Novel carbapenem-hydrolyzing β Lactamase, KPC-1, from a Carbapenem-resistant strain of *klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Georgia: v. 45, n. 4, p. 1151-1161, apr. 2001.

ZHANG, R.; ZHANG, G.; ZHENG, Q.; TANG, J.; CHEN, Y.; XU, W.; ZOU, Y.; CHEN, X. Occurrence and risks of antibiotics in the Laizhou Bay, China: Impacts of river discharge. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Yantai: v. 80, p. 208-215, mar. 2012.

ZHAO, J.; CHEN, Z.; DENG, Y.; LIU, Y.; TIAN, W.; HUANG, X.; WU, C.; SUN, Y.; SUN, Y.; ZENG, Z.; LIU, J. Prevalence and dissemination of *oqxAB* in Escherichia coli isolates from animals, farm workers and the environment. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**: v. 54, n. 10, p. 4219-4224, oct. 2010.

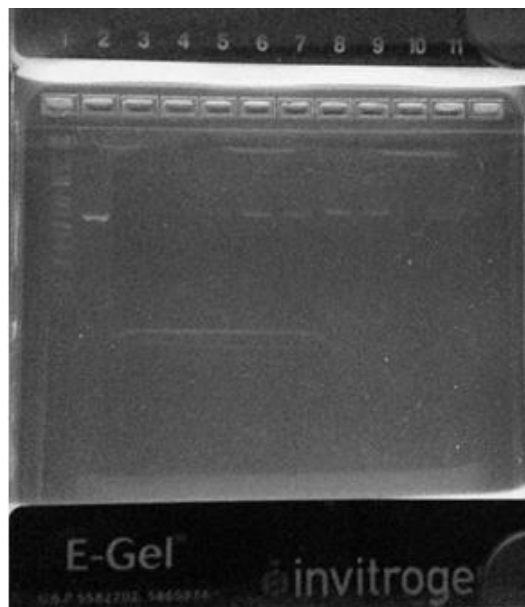
ZHAO, J. Y.; DANG, H. Coastal seawater bacteria harbor a large reservoir os plasmid – mediated quinolone resistance determinants in Jiaozhou Bay, China. **Microbial Ecology**, Changjiang: 2012.

ZOWAWI, H. M.; FORDE, B. M.; ALFARESI, M.; ALZAROUNI, A.; FARAHAT, Y.; CHONG, T. M.; YIN, W. F.; CHAN, K. G.; LI, J.; SCHEMBRI, M. A.; BEATSON, S. A. PATERSON, D. L. Stepwise evolution of pandrug-resistance in *Klebsiella penumoniae*. **Scientific Reports**: oct. 2015.

ANEXO A – Fotos de gel de Betalactamase de Espectro Estendido (ESBL)

Gene *bla_{TEM}*

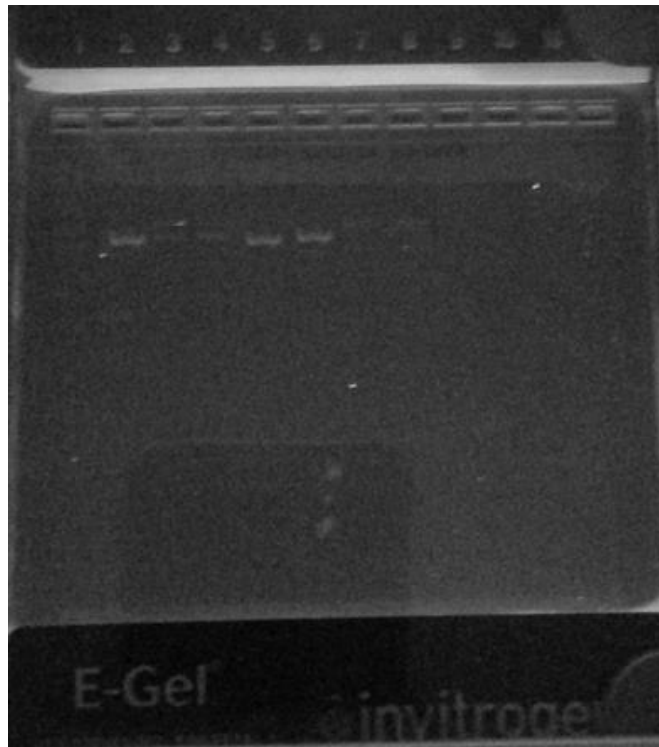
Legenda: Poço 1: ladder; 2: Controle + Kp 700603; 3: Ec 15CFL/13 LJ; 4:Ec16CFL/13 LJ; 5:Ec1/05 LM; 6:Ec2/05 LM; 7:Ec1/07 LM; 8:Ec2/07 LM; 9:Ec3/07 LM; 10: Ec4/07 negativo LM 11: Ec5/07 CC; 12: controle –
 Fonte: A Autora, 2015



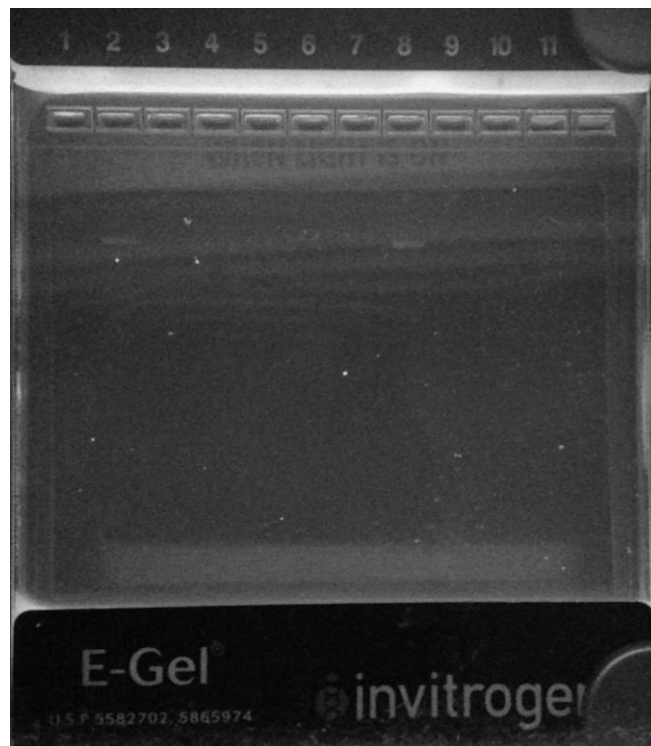
Legenda: Poço 1: ladder; 2: controle + Kp 700603; 3: Controle -; 4: s/a; 5: s/a; 6: Ec6/07 CC; 7:Ec7/07 CC; 8:Ec8/07 CC; 9:Ec8CFL/13 CC; 10 Ec20/07 LM; 11 s/a; 12 s/a; s/a= sem amostra
 Fonte: A Autora, 2015

BlaCTX-M

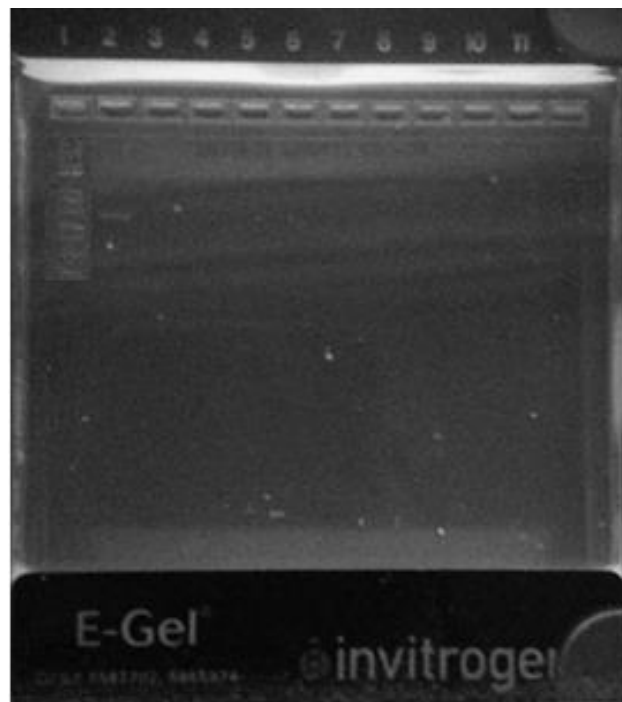
Legenda: 1: ladder; 2: controle +; 3: Ec1/05 LM; 4: Ec2/05 LM; 5: Ec1/07 LM; 6: Ec2/07 LM; 7: Ec3/07 LM; 8: Ec4/07 LM; 9: Ec19/07 LM; 10: Ec20/07 LM; 11: Ec15CFL/13 LJ; 12: Ec16CFL/13 LJ
 Fonte: A Autora, 2015



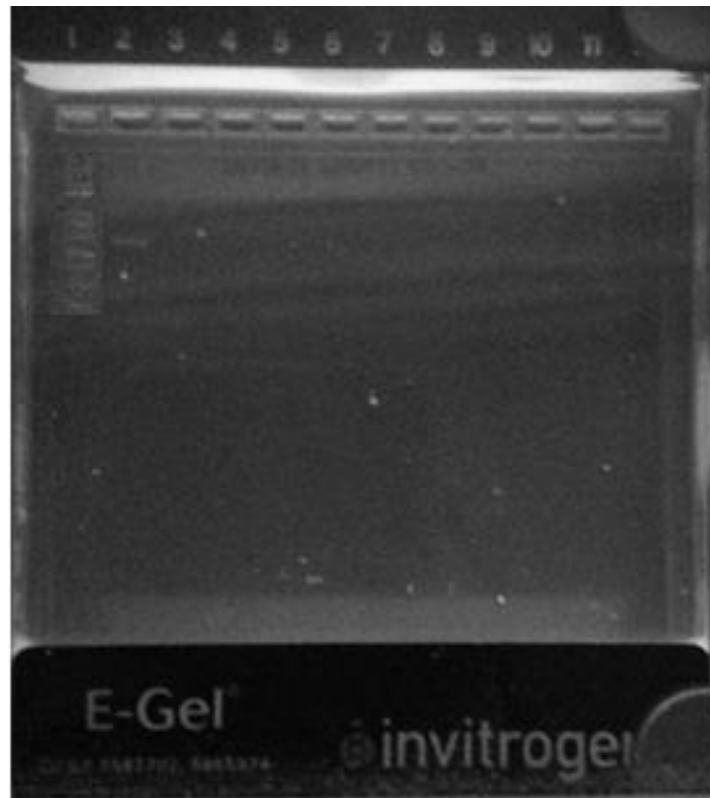
Legenda: 1: ladder; 2: +; 3: Ec5/07 canal de camorim; 4: Ec6/7 CC; 5: Ec7/7 CC; 6: Ec8/7 CC; 7: Ec8CFL/13 neg. canal de camorim; 8 – 12: s/a; S/a= sem amostra.
 Fonte: A Autora, 2015

Blatono

Legenda: 1: ladder; 2: controle +; 3: controle -; 4: Ec1/07 lm; 5: Ec2/07 LM; 6: Ec3/07 LM; 7: Ec4/07 LM; 8: Ec20/07 + LM; 9: Ec19/07 LM; 10: Ec1/05 LM; 11: Ec2/05 LM; 12: s/a; S/a= sem amostra
 Fonte: A Autora, 2015

Blashv

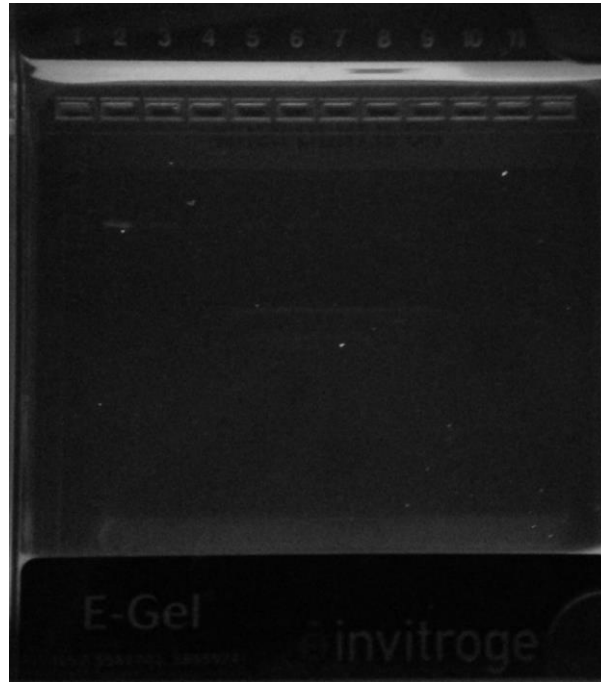
Legenda: 1: ladder; 2: controle +; 3: Ec1/05 LM; 4: Ec2/05 LM; 5: Ec1/07 LM; 6: Ec2:07 LM; 7: Ec3/07 LM; 8: Ec4/07 LM; 9: Ec19/07 LM; 10: Ec20/07 LM; 11: Ec15CFL/13 LJ; 12: Ec16CFL/13 LJ
 Fonte: A Autora, 2015



Legenda: Poço 1: ladder; 2: controle + Kp 700603; 3: Ec6/07 CC; 4:Ec7/07 CC; 5:Ec8/07 CC; 6:Ec8CFL/13 CC; 7: Ec20/07 LM; 8-12: s/a; S/a= sem amostra
Fonte: A Autora, 2015

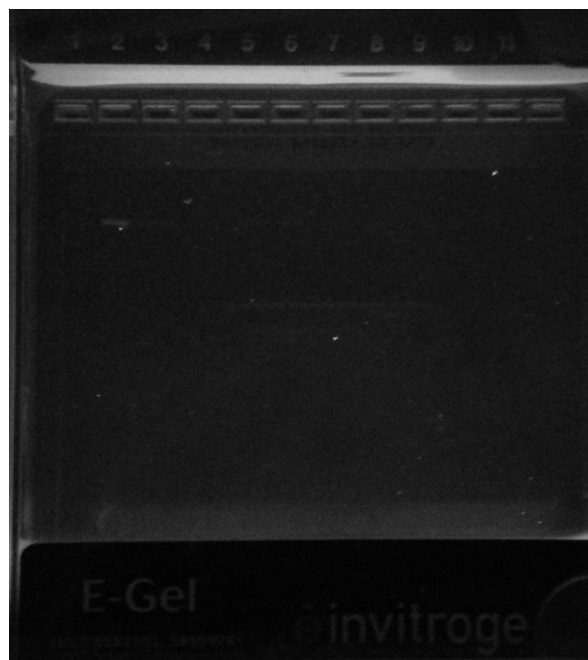
ANEXO B – Fotos de gel de Quinolonas Mediando Plasmídeo de Resistência (PMQR)

qnrA



Legenda: poço 1: ladder; poço 2: Controle positivo; amostras provenientes do Canal de Camorim -poço 3: Ec5/07; poço 4: Ec6/07; poço 5:Ec7/07; poço 6:Ec8/07; poço 7:Ec14/07; poço 8:Ec2G/13; poço 9:Ec8G/13; poço 10: Ec8CFL/13; amostra proveniente da Lagoa de Jacarepaguá - poço 11:Ec12G/13; poço 12: controle negativo.

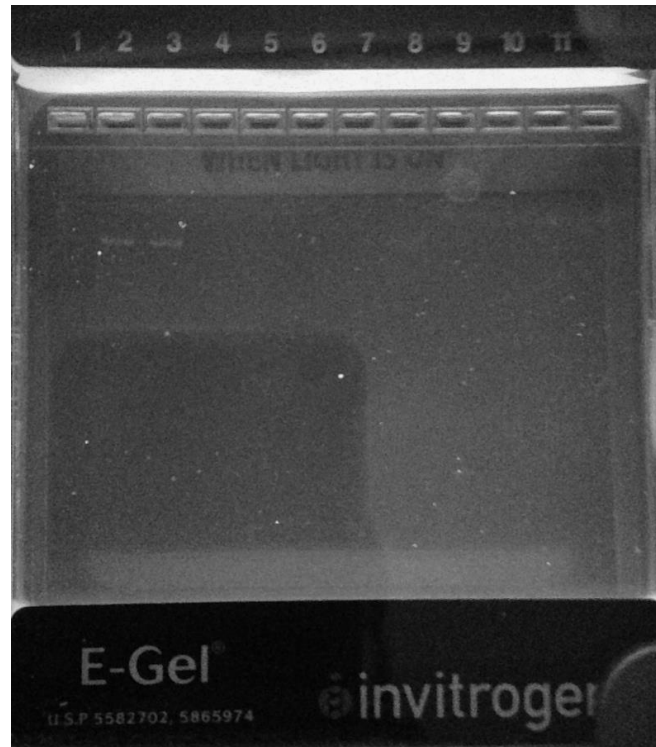
Fonte: A Autora, 2015



Legenda: poço 1: ladder; poço 2: Controle positivo; amostras provenientes da Lagoa de Marapendi - poço 3: Ec1/05; poço 4: Ec2/05; poço 5:Ec1/07; poço 6:Ec2/07; poço 7:Ec3/07; poço 8:Ec4/07; poço 9:Ec19/07; poço 10: Ec20/07; poço 11: controle negativo; poço 12: sem amostra.

Fonte: A Autora, 2015

qnrB



Legenda: poço 1: ladder; poço 2: Controle positivo (1); poço 3: controle + (2); amostras provenientes do Canal de Camorim - poço 4: Ec5/07; poço 5: Ec6/07; poço 6:Ec7/07; poço 7:Ec8/07; poço 8:Ec14/07; poço 9:Ec2G/13; poço 10:Ec8G/13; poço 11: Ec8CFL/13; amostra proveniente da Lagoa de Jacarepaguá - poço 12:Ec12G/13.

Fonte: A Autora, 2015



Legenda: poço 1: ladder; poço 2: Controle positivo (1); poço 3:Controle positivo (2); amostras provenientes da Lagoa de Marapendi - poço 4: Ec1/05; poço 5: Ec2/05; poço 6:Ec1/07; poço 7:Ec2/07; poço 8:Ec3/07; poço 9:Ec4/07; poço 10:Ec19/07; poço 11: Ec20/07; poço 12: controle negativo.

Fonte: A Autora, 2015

ANEXO C – Fotos de gel de Enzimas Modificadoras de Aminoglicosídeos (EMA)*Acc3*

Legenda: poço 1: ladder; poço 2: Controle positivo; amostras provenientes da Lagoa de Jacarepaguá -poço 3: Ec16CFL/13; poço 4: Ec1G/13; poço 5:Ec3G/13; poço 6:Ec5G/13; poço 7:Ec8G/13; poço 8:Ec10G/13; poço 9:Ec11G/13; amostras proveniente do Canal de Camorim- poço 10: Ec8/07; poço 11: Ec8G/13; poço 12: EC8CFL/13.

Fonte: A Autora, 2015

ANEXO D – Fotos de gel de Carbapenemase*bla_{KPC}*

Legenda: poço 1: ladder; poço 2: Controle positivo; amostra proveniente do Canal de Camorim- poço 3: Ec14/07; cepas provenientes da Lagoa de Jacarepaguá- poço 4:Ec7CFL/13; poço 5:Ec8CFL/13; poço 6: Ec12CFL/13; poço 7:Ec15CFL/13; poço 8:Ec16CFL/13; poço 9:Ec12G/13; poço 10: Controle negativo; poços 11 e 12: sem amostras.
Fonte: A Autora, 2015