



FIOCRUZ

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia Aplicada à Saúde e
Medicina Investigativa**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DA ÁGUA E O PERFIL DE RESISTÊNCIA
ANTIMICROBIANA EM ENTEROBACTÉRIAS DE COLEÇÕES HÍDRICAS DE
SALVADOR E ÁREA RURAL DA BAHIA**

VANESSA TIBOLLA MORETTO

**Salvador – Bahia
2018**

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia Aplicada à Saúde e Medicina
Investigativa**

**AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DA ÁGUA E O PERFIL DE RESISTÊNCIA
ANTIMICROBIANA EM ENTEROBACTÉRIAS DE COLEÇÕES HÍDRICAS DE
SALVADOR E ÁREA RURAL DA BAHIA**

VANESSA TIBOLLA MORETTO

Orientador: Lúcio Macedo Barbosa
Co-orientador: Soraia Machado Cordeiro

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa para a obtenção do grau de Mestre.

**Salvador - Bahia
2018**

" AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DA QUALIDADE DA ÁGUA E O PERFIL DE RESISTÊNCIA
ANTIMICROBIANA EM ENTEROBACTÉRIAS DE COLEÇÕES HÍDRICAS DE ÁREA RURAL E
URBANA DA BAHIA."

VANESSA TIBOLLA MORETTO


FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 20 de setembro de 2018


COMISSÃO EXAMINADORA



Dr. Jailton de Azevedo Silva Junior
Professor
UFBA



Dra. Leila Carvalho Campos
Pesquisadora
IGM/FIOCRUZ



Dra. Suzana Ramos Ferrer
Professora Adjunta
EBMSP

FONTES DE FINANCIAMENTO

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001”

Case Western Reserve University (CWRU) – Ohio, EUA

AGRADECIMENTOS

Àquele que sempre me proporcionou inúmeras oportunidades perante a vida e me proporcionou mais essa vitória.

À minha família, por me incentivarem a mergulhar no conhecimento, por terem vivido os meus sonhos e me ajudado a concretizá-los com muita dedicação e esforço, sem vocês nada disso teria sido possível.

Aos meus amigos, por torcerem junto a mim pelas minhas conquistas e pelo estímulo e motivação diários. Vocês são a minha segunda família!

Ao meu orientador, Dr. Lúcio Barbosa, que sempre acreditou em mim e depositou muito de seu amor pela pesquisa em minhas mãos.

À Dra. Soraia Cordeiro, por ter me auxiliado e me ensinado muito mais sobre esse mundo tão belo que é a Microbiologia.

Ao Dr. Ronald Blanton da Case Western Reserve University por ter acreditado e financiado este presente trabalho e por ter me proporcionado inúmeras oportunidades de crescimento profissional e pessoal.

Ao professor Mitermayer Reis e aos meus colegas do LPBM por me apoiarem e por contribuírem de forma valiosa para o meu aprendizado.

À equipe de Microbiologia e o Hospital São Rafael e ao Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal da Bahia (UFBA) pelo apoio e acolhimento.

À Ana Fiscina e Biblioteca da Fiocruz pelo apoio durante as revisões do presente trabalho.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu,
mas pensar o que ainda ninguém pensou sobre
aquilo que todo mundo vê”.

Arthur Schopenhauer

MORETTO, Vanessa Tibolla. Avaliação microbiológica da água e o perfil de resistência antimicrobiana em enterobactérias de coleções hídricas de Salvador e área rural da Bahia. 90 f. il. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e medicina Investigativa) - Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, 2018.

RESUMO

INTRODUÇÃO: As coleções hídricas são importantes cenários na disseminação e seleção de bactérias resistentes. O descarte inapropriado de dejetos e a contaminação fecal possuem fortes impactos ambientais e na comunidade, sendo esta última mais propensa a contrair infecções através destes recursos hídricos contaminados. **OBJETIVO:** O objetivo do trabalho foi avaliar o perfil microbiológico e de resistência antimicrobiana de coleções hídricas de área rural e urbana da Bahia. **MATERIAL E MÉTODOS:** Para esta análise, amostras de coleções hídricas sem proximidades a hospitais ou centros de saúde do distrito de Jenipapo em Ubaíra/BA (zona rural, n=3) e de Salvador/BA, nas comunidades de Dique do Cabrito, Dique do Tororó e Lagoa do Abaeté (zona urbana, n=9) foram avaliadas e coletadas a cada três meses no período de um ano (Out/2016-Ago/2017). A quantificação de coliformes totais foi realizada através do kit Coliscan EasyGel®. A triagem de enterobactérias foi realizada em duas placas de Ágar MacConkey, contendo 2µg/mL de cefotaxima e 1µg/mL de meropenem, individualmente. A identificação foi realizada por espectrometria de massa (MALDI-TOF®) e o perfil de sensibilidade por Vitek®. A presença dos genes de resistência aos betalactâmicos foi analisada por PCR convencional, para os isolados de *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae* e *Klebsiella pneumoniae*. Os *primers* tinham como alvo os genes de resistência associados à produção de beta-lactamases do tipo cefotaximases (*bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}) e carbapenemases (*bla*_{KPC}, *bla*_{VIM}, *bla*_{NDM}, *bla*_{SPM}, *bla*_{OXA-48}). **RESULTADOS:** A contagem média de coliformes totais para Jenipapo foi de 1409 UFC/100 mL. Nos sítios urbanos Dique do Cabrito, Dique do Tororó e Lagoa do Abaeté foram 2885, 601 e 617 UFC/100 mL, respectivamente. Foram identificadas 19 espécies de enterobactérias do total de 196 bactérias selecionadas. As principais enterobactérias identificadas na área rural foram: *E. cloacae* (31%), *Providencia rettgerii* (18%), *E. coli* (9%) e *Morganella morganii* (9%). Na área urbana: *E. cloacae* (38%), *K. pneumoniae* (27%) e *E. coli* (16%). Mais que 35% dos isolados de *E. cloacae* mostraram-se resistentes a ampicilina/sulbactam. Na área urbana foram ainda identificadas cepas de *E. coli* e *K. pneumoniae* multirresistentes, 20% e 7% respectivamente. Todos os isolados de *P. rettgerii* 12/12 (100%) e 4/4 (100%) *M. morganii* também demonstraram ser resistentes a ampicilina/sulbactam. Genes associados à resistência foram identificados tanto nas enterobactérias analisadas na área rural: *bla*_{VIM} (38%), *bla*_{OXA-48} (33%), *bla*_{CTX-M} (19%) e *bla*_{SPN} (9%); quanto na área urbana: *bla*_{OXA-48} (35%), *bla*_{CTX-M} (22%); *bla*_{VIM} (19%); *bla*_{SPN} (19%) e *bla*_{NDM} (2,7%); *bla*_{TEM} (1,3%). **CONCLUSÕES:** Os resultados apresentados neste trabalho evidenciaram a presença de contaminação fecal e de enterobactérias resistentes nas coleções hídricas na Bahia, tanto do ambiente rural quanto urbano, mesmo distante de áreas hospitalares.

Palavras-chaves: Coleções hídricas, Enterobactérias, Genes de resistência, Resistência antimicrobiana

MORETTO, Vanessa Tibolla. Microbiological evaluation of water and the profile of antimicrobial resistance in enterobacteria from water collections of Salvador and rural area of Bahia. 90 fl. II. Thesis (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e medicina Investigativa) - Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Institute Gonçalo Moniz, Salvador, 2018.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Water collections are important scenarios in the dissemination and selection of resistant bacteria. Inadequate waste disposal and fecal contamination have strong environmental and community impacts, the latter being more likely to contract infections through these contaminated water resources. **OBJECTIVE:** The objective of this work was to evaluate the microbiological and antimicrobial resistance profile of water collections in rural and urban areas of Bahia. **MATERIAL AND METHODS:** For this analysis, samples of water collections without proximity to hospitals or health centers of the district of Jenipapo in Ubaíra/BA (rural area, n=3) and of Salvador/BA, in the communities of Dam of Cabrito, Dam of Tororó and Abaeté Lagoon (urban area, n=9) were evaluated and collected every three months in a one-year period (Oct/2016-Aug/2017). Quantification of total coliforms was performed using the Coliscan EasyGel® kit. Enterobacteria screening was performed on two MacConkey agar plates containing 2 µg/mL cefotaxime and 1 µg/mL meropenem, individually. Identification was performed by mass spectrometry (MALDI-TOF®) and the sensitivity profile by Vitek®. The presence of beta-lactam resistance genes was analyzed by conventional PCR for *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae* and *Klebsiella pneumoniae* isolates. The primers targeted resistance genes associated with the production of beta-lactamases of the cefotaxime type (*bla_{CTX-M}*, *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}*) and carbapenemases (*bla_{KPC}*, *bla_{VIM}*, *bla_{NDM}*, *bla_{SPM}*, *bla_{OXA-48}*). **RESULTS:** The mean total coliform count for Jenipapo was 1409 CFU / 100 mL. In the urban sites Dam of Cabrito, Dam of Tororó and Abaeté Lagoon were 2885, 601 and 617 CFU / 100 mL, respectively. A total of 19 species of enterobacteria were identified from a total of 196 selected bacteria. The main enterobacteria identified in the rural area were: *E. cloacae* (31%), *Providencia rettgerii* (18%), *E. coli* (9%) and *Morganella morganii* (9%). In the urban area: *E. cloacae* (38%), *K. pneumoniae* (27%) and *E. coli* (16%). More than 35% of *E. cloacae* isolates were resistant to ampicillin/sulbactam. In the urban area, strains of multiresistant *E. coli* and *K. pneumoniae* were also identified, 20% and 7%, respectively. All isolates from *P. rettgerii* 12/12 (100%) and 4/4 (100%) *M. morganii* have also been shown to be resistant to ampicillin/sulbactam. Genes associated with resistance were identified in both enterobacteria analyzed in the rural area *bla_{VIM}* (38%), *bla_{OXA-48}* (33%), *bla_{CTX-M}* (19%) e *bla_{SPN}* (9%); and in the urban area: *bla_{OXA-48}* (35%), *bla_{CTX-M}* (22%); *bla_{VIM}* (19%); *bla_{SPN}* (19%) e *bla_{NDM}* (2,7%); *bla_{TEM}* (1,3%). **CONCLUSIONS:** The results presented in this study evidenced the presence of fecal contamination and of resistant enterobacteria in the water collections in Bahia, both in rural and urban environments, even distant from hospital area.

Key words: Water collections, Enterobacteria, Resistance genes, Antimicrobial resistance

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Localização geográfica de Jenipapo.....	30
Figura 2: Localização geográfica do Dique do Cabrito.....	31
Figura 3: Localização geográfica do Dique do Tororó.....	32
Figura 4: Localização geográfica da Lagoa do Abaeté.....	33
Figura 5: Contagem dos coliformes totais (colônias rosas) e de <i>E. coli</i> (colônias azuis/roxas) através do Kit Coliscan EasyGel®.....	34
Figura 6: Gel de eletroforese do PCR para os controles positivos aplicados no estudo.....	38

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Avaliação da contaminação fecal sazonal por coliformes totais.....	42
Gráfico 2: Avaliação da contaminação fecal sazonal por <i>E. coli</i>	43
Gráfico 3: Perfil microbiológico das enterobactérias presentes nas coleções hídricas avaliadas.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: <i>Primers</i> alvo dos genes de resistência antimicrobiana aplicados no estudo.....	37
Tabela 2: Quantificação média de coliformes totais (CT) e <i>Escherichia coli</i> (UFC/mL) por local estudado e sazonalidade.....	40
Tabela 3: Perfil microbiológico das enterobactérias presentes nas coleções hídricas avaliadas identificados por MALDI-TOF®	45
Tabela 4: Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos nos isolados de <i>E. cloacae</i> , <i>E. coli</i> e <i>K. pneumoniae</i>	46
Tabela 5: Quantificação da presença dos genes de resistência por localidade....	48
Tabela 6: Genes de resistência e resultados confirmatórios de resistência dos isolados de <i>E. cloacae</i> e <i>K. pneumoniae</i> no em Jenipapo.....	48
Tabela 7: Genes de resistência e resultados confirmatórios de resistência dos isolados de <i>E. cloacae</i> e <i>K. pneumoniae</i> no Dique do Cabrito.....	49
Tabela 8: Genes de resistência e resultados confirmatórios de resistência dos isolados de <i>E. cloacae</i> e <i>K. pneumoniae</i> no Dique do Tororó.....	50
Tabela 9: Genes de resistência e resultados confirmatórios de resistência dos isolados de <i>E. cloacae</i> , <i>E. coli</i> e <i>K. pneumoniae</i> na Lagoa do Abaeté.....	50

LISTA DE APÊNDICE

Apêndice 1: Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos nos isolados identificados no estudo por localidade.....	70
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABS	Ampicilina/Sulbactam
AMI	Amicacina
CAZ	Ceftazidima
CETESB	Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental
CIP	Ciprofloxacino
CLSI	Instituto de padrões clínicos e laboratoriais (do inglês <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>)
COM	Cefepime
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CRO	Ceftriaxona
CRX	Cefuroxima/Axetil
CT	Coliformes totais
CTX	Cefotaxima
CWRU	Case Western Reserve University
CXM	Cefuroxima
ERT	Ertapenem
ESBL	Beta-Lactamase de Espectro Estendido
GEN	Gentamicina
HSR	Hospital São Rafael

IGM	Instituto Gonçalo Moniz
IPM	Imipenem
INEMA	Instituto do Meio Ambiente e Recursos Hídricos
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase
LPBM	Laboratório de Patologia e Biologia molecular
MBL	Metalobetalactamase
MER	Meropenem
OMP	Porina de membrana externa
PPT	Piperacilina/Tazobac
UFBA	Universidade Federal da Bahia
UFC	Unidade Formadora de Colônias
USEPA	Agência de proteção ambiental dos Estados Unidos (do inglês <i>United States Environmental Protection Agency</i>).
TGI	Tigiciclina
TSA	Ágar Triptona de Soja
TSB	Caldo de Soja Tripticaseína
TSI	Triple Sugar Iron

SUMARIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1	POLUIÇÕES DE ÁGUAS SUPERFICIAIS	19
2.2	AMBIENTES AQUÁTICOS E RESISTÊNCIA MICROBIANA	20
2.3	ENTEROBACTÉRIAS PRESENTES NAS ÁGUAS CONTAMINADAS E SUA IMPORTÂNCIA CLÍNICA	21
2.4	RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA EM ENTEROBACTÉRIAS	22
2.4.1	Resistência às quinolonas e aminoglicosídeos	22
2.4.2	Resistência aos Beta-Lactâmicos	23
2.4.2.1	<i>Resistência aos Carbapenêmicos</i>	24
2.4.3	Enterobactérias Resistentes no Brasil	25
2.5	INTEGRAÇÃO EM SAÚDE “ONE HEALTH”	26
3	OBJETIVOS	28
3.1	OBJETIVO GERAL	28
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
4	MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1	LOCAL DE ESTUDO	29
4.1.1	Jenipapo	29
4.1.2	Dique do Cabrito	30
4.1.3	Dique do Tororó	31
4.1.4	Lagoa do Abaeté	32
4.2	ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DA ÁGUA DE COLEÇÕES HÍDRICAS	33
4.2.1	Coleta de água	33
4.3	ANÁLISE MICROBIOLÓGICA PARA COLIFORMES TERMOTOLERANTES E <i>Escherichia coli</i>	34
4.2.3	Análise microbiológica para triagem de isolados resistentes aos antimicrobianos e identificação da espécie	35
4.4	ANÁLISE GENOTÍPICA PARA IDENTIFICAÇÃO DOS GENES DE RESISTÊNCIA	36
4.4.1	Extração de DNA e amplificação	36
4.4.2	Controles positivos	38
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	36
5	RESULTADOS	40

6	DISCUSSÃO	51
7	CONCLUSÕES	58
	REFERÊNCIAS	59

1. INTRODUÇÃO

Um grande problema de Saúde Pública no Brasil é a falta de saneamento básico, que culmina na contaminação de recursos hídricos e deficiência no tratamento adequado dos esgotos. De acordo com a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (*United States Environmental Protection Agency*) - USEPA, a quantificação de coliformes fecais é de grande interesse para Saúde Pública, pois a detecção de altos níveis de patógenos nestes ambientes está frequentemente associada a elevados níveis de infecções nas comunidades (USEPA, 2017). Isso se deve ao fato de que a maioria dos microrganismos patogênicos causadores de doenças transmitidas pela água são predominantemente de origem fecal (PEREIRA, 2016).

Os ambientes hídricos se tornaram meios de seleção e disseminação de bactérias resistentes. O aumento histórico do uso de antimicrobianos, tanto na área médica quanto na pecuária, pode contribuir para a seleção de agentes microbianos resistentes a esses medicamentos (ECONOMOU, 2015; WENDLANDT, 2015). Quando utilizados de forma consciente, os antibióticos se mostram eficazes, conseguindo reduzir as taxas de infecção e, conseqüentemente, sendo capaz de extinguir o microrganismo (WHO, 2012). Contudo, a alta eficiência na cura aliada à falta de regulamentação da venda dos antibióticos, que aconteceu por muito tempo, principalmente no Brasil, gerou uma grande facilidade para a obtenção e utilização deste tipo de medicamento. Diante desse quadro, evidencia-se que o uso indiscriminado de antimicrobianos cria uma pressão seletiva podendo favorecer a seleção de bactérias resistentes (O'NEILL, 2016; WHO, 2017).

A emergência de resistência antimicrobiana tem alarmado as autoridades de Saúde Pública, de modo geral. Dados do Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), nos Estados Unidos, estimam que mais de 2 milhões de infecções são acometidas por bactérias resistentes, com mais de 23.000 mortes por ano (CDC, 2014). Se não forem implementadas medidas de controle eficazes, estima-se que, em 2050, as infecções por bactérias resistentes causarão 10 milhões de mortes anualmente, superando a mortalidade causada pelo câncer. Além disso, estima-se que o impacto no gasto mundial

em saúde será alarmante, podendo alcançar a marca de 100 bilhões de dólares por ano (O'NEILL, 2016).

A vigilância da qualidade microbiológica da água e o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos das enterobactérias contaminantes nos recursos hídricos se fazem necessários para uma melhor compreensão do potencial impacto ambiental e na população, que utiliza esses recursos hídricos para diferentes fins, com risco de contrair doenças transmitidas pela água.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 POLUIÇÕES DE ÁGUAS SUPERFICIAIS

A água é um recurso natural indisponível à vida humana e, por isso, deve estar assegurada forma igualitária a todos (WHO, 2011). No entanto, estima-se que 4,5 bilhões de pessoas em todo o mundo não possuem saneamento básico adequado e mais de 2,2 bilhões de pessoas carecem de acesso a um sistema seguro de gestão de recursos hídricos, fatores estes que influenciam diretamente na qualidade de vida da população. (WHO, 2014). A falta de saneamento concomitante à falta de acesso a água potável são a segunda maior causa de mortalidade infantil, responsáveis por 1,8 milhão de mortes de crianças por diarreia por ano (PNUD, 2008).

Poluição das águas pode ser definida como qualquer alteração em suas características químicas, físicas e biológicas, provocadas por interferências naturais ou humanas (CABRAL, 2010). De acordo com a Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental (CETESB), o controle da poluição está diretamente relacionado com a proteção da saúde, garantia do meio ambiente ecologicamente equilibrado e a melhoria da qualidade de vida, lei fortalecida pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) na portaria de nº 357/05 (CETESB, 2013). De acordo com os padrões de balneabilidade determinados pelo CONAMA, portaria nº 274/00, corpos d'água que excederem 2.500 (UFC/100 mL) de coliformes totais e 2.000 (UFC/100 mL) de *Escherichia coli* são consideradas águas impróprias para utilização.

No Brasil, a poluição dos corpos hídricos envolve com maior frequência o descarte de efluentes orgânicos, os quais estão mais associados a condições precárias de saneamento básico e a densidade populacional (CARVALHO, 2016). Essas condições são facilmente encontradas em algumas zonas rurais, mas principalmente em áreas urbanas onde há um crescimento desordenado e a concentração de habitantes é maior (WU et al, 2011). Indivíduos de áreas próximas a esses ambientes poluídos apresentam maior risco de contrair doenças transmitidas pela água (CARVALHO, 2003; FIA, 2015).

Em ambientes rurais, a exposição ao ambiente aquático é mais frequente, devido à utilização das águas para diferentes propósitos. Por outro lado, a zona urbana apresenta uma maior densidade populacional ao redor desses recursos hídricos, o que aumenta a contaminação destes corpos d'água (WU et al, 2011, FIA, 2015).

Grande parte da dispersão e desenvolvimento de organismos bacterianos resistentes a antibióticos está intimamente relacionada aos ambientes hídricos (ZHOU, 2016; GONÇALVES 2016). Isso acontece devido ao descarte de dejetos orgânicos domésticos introduzindo diretamente bactérias do trato gastrointestinal e resíduos hospitalares sem nenhum tipo de tratamento no ambiente, sendo os corpos d'água os principais receptores desses poluentes (SILVA 2014; CARVALHO 2016). Outras potenciais fontes de contaminação de corpos hídricos podem ser os dejetos de animais de criação, que se acumulam ao longo das margens ou são, eventualmente, levados ao leito destes, contribuindo para a alteração do ecossistema microbiológico local e o próprio uso indiscriminado de antimicrobianos aplicados na medicina veterinária (AAM, 2009; PEREIRA, 2016).

2.2 AMBIENTES AQUÁTICOS E RESISTÊNCIA MICROBIANA

Uma das preocupações ambientais está relacionada à presença de subprodutos e moléculas ativas de antimicrobianos em estações de tratamento de esgoto e, posteriormente, nos rios e efluentes, que levam a uma pressão seletiva de bactérias resistentes. No entanto, os efluentes das indústrias farmacêuticas possuem baixa biodegradação e alta toxicidade, podendo provocar efeitos adversos, causando danos à ecologia aquática (ONESIOS, YU e BOUWER, 2009).

A resistência bacteriana aos antimicrobianos pode se dar por mutações espontâneas, seleção natural ou por transferência horizontal gênica. Esta última possui um papel muito importante na disseminação de genes de resistência, seja interespecie ou intraespecie. A transferência horizontal é um processo fortemente associado a locais

com grande variabilidade da microbiota, assim como os ambientes aquáticos (BENGTSSON, 2015; LI; MANAIA, 2017).

Os antimicrobianos permanecem inalterados e ativos por um longo período de tempo, ou seja, não são degradados nestes ambientes hídricos, podendo ainda exercer pressão seletiva nas bactérias presentes neste ambiente (LI et al, 2012; SU et al, 2018). Dessa forma, essas coleções hídricas tornam-se um dos meios mais potencializadores para a seleção de bactérias com perfis multirresistentes, contribuindo para a disseminação e seleção destes agentes e de elementos genéticos ligados à resistência (LI e al, 2012; BENGTSSON, 2014; RODRIGUEZ, 2015).

2.3 ENTEROBACTÉRIAS PRESENTES NAS ÁGUAS CONTAMINADAS E SUA IMPORTÂNCIA CLÍNICA

O grupo das enterobactérias se caracterizam por serem bactérias bacilos Gram-negativos, aeróbias ou anaeróbias facultativas, capazes de crescer na presença de sais biliares ou outros compostos ativos de superfície e que fermentam a glicose com possível produção de ácidos, aldeídos e gás (WINN et al, 2008). Os coliformes termotolerantes são bactérias capazes de fermentar a lactose com produção de gás a 44°C em 24 horas, sendo a *Escherichia coli* a principal espécie desse grupo (WINN et al., 2008). As principais formas de contrair os coliformes são, geralmente, através da ingestão de água ou alimentos contaminados (WINN et al., 2008). Bactérias dessa família são amplamente distribuídas na natureza, podendo ser encontradas no solo, águas e vegetais e colonizando o trato intestinal de animais homeotérmicos (RILEY 2014).

Enterobactérias como *E. coli* são consideradas indicadores de contaminação fecal recente por fazerem parte do trato gastrointestinal de humanos e animais de sangue quente (PEREIRA, 2016; RILEY, 2014). Contudo, a grande problemática não se atém apenas ao fato da contaminação fecal nos ambientes aquáticos, mas sim a multirresistência em isolados de *Enterobacter cloacae*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* e

outras espécies da família Enterobacteriaceae estarem cada vez mais presentes no meio ambiente.

Nos humanos, essas bactérias são responsáveis por grande parte das infecções presentes nas comunidades e hospitais (BRIONGOS-FIGUERO, 2012; KAHLMETER, 2015). *E. coli* possui destaque em causar infecções no trato urinário, além de infecções gastrointestinais (RILEY, 2014). *K. pneumoniae* e *Enterobacter* spp. estão associadas a infecções intra-abdominais e, principalmente, pneumonia, sendo *Enterobacter* spp responsável por aproximadamente 11% dos casos de pneumonia clínica (BIBERG, 2015; FEIZABADI, 2010; BEGHI, 2018). *K. pneumoniae* pode ser encontrada tanto em fezes humanas quanto na colonização da nasofaringe, sendo este último em menor frequência (BIBERG, 2015). Dessa forma, as principais infecções causadas por esse agente são associadas a infecções respiratórias, do trato urinário e gastrointestinal, podendo apresentar altas taxas de morbi-mortalidade (WINN et al., 2008; KARANIKI, 2016). *Enterobacter* spp é frequentemente associado a infecções comunitárias e com maior destaque em infecções hospitalares, representando cerca 6% de todos os isolados nosocomiais no Brasil (OLIVEIRA, 2013).

2.4 RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA EM ENTEROBACTÉRIAS

2.4.1 Resistência às quinolonas e aminoglicosídeos

Desde sua descoberta, o amplo uso de quinolonas tem contribuído para o crescente aumento de cepas resistentes, colocando em xeque o uso deste antimicrobiano (LASTOURS, 2016). Na família Enterobacteriaceae, a resistência a quinolonas e fluorquinolonas é bastante comum, principalmente em isolados de *E. coli* (KIM, 2015). O uso desta classe de antibióticos é amplamente utilizado no tratamento de infecções em humano, mas principalmente, na medicina veterinária, o que pode contribuir com o a disseminação destes genes do meio ambiente e para a comunidade (ALSHARAPY, 2018).

Outra classe de antimicrobianos que por muitas décadas foram drogas de referência no tratamento de infecções por isolados da família Enterobacteriaceae e em endocardites causadas por Gram-positivos, do gênero estreptococos, enterococos e estafilococos, são os aminoglicosídeos (LEGGETT, 2017). Devido a sua excelente atividade antimicrobiana e o baixo custo, houve um aumento da incidência de cepas bacterianas resistentes à estreptomicina, gentamicina e amicacina (LEGGETT, 2017). *E. coli* é considerada a causa mais comum de infecção do trato urinário (ITU) e ao longo do tempo desenvolveu múltiplas resistências aos betalactâmicos e os aminoglicosídeos, por exemplo (SONG, 2014). A alteração enzimática de aminoglicosídeos por enzimas modificadoras de aminoglicosídeos é o principal mecanismo de resistência a esses antibióticos em *E. coli*, o que pode levar ao insucesso terapêutico quando administrado (SOLEIMANI, 2014).

2.4.2 Resistência aos Beta-Lactâmicos

O aumento do número de infecções causadas por enterobactérias produtoras de beta-lactamase de espectro estendido (ESBL) tem alertado a comunidade científica e atenuado o uso de cefalosporinas de primeira, segunda e terceira geração, devido à emergência desses agentes resistentes. Nos últimos anos, decorreram surtos e disseminação de enterobactérias resistentes em diversos continentes (CHERKAOUI, 2014; COCHARD, 2014). Produção de enzimas tipo CTX-M, SHV, GES e TEM em enterobacterias é de grande relevância clínica, visto que a presença delas está fortemente associada ao insucesso terapêutico. Além disso, a resistência não se restringe apenas a uma classe de antimicrobianos, visto que os genes de resistência são transportados por plasmídeos e, devido a isso, fortemente disseminados (GIRLICH, 2012).

As cefalosporinases do tipo AmpC também são encontradas na família das enterobactérias. Essas enzimas são capazes de hidrolisar as mais variadas classes de antimicrobianos, incluindo os β -lactâmicos (COUDRON, 2000; AL-BAYSSARI et al.

2015). A presença de enzimas derivadas dos genes AmpC cromossomais de micro-organismos Gram-negativos está frequentemente associada à multirresistência e podem estar presentes em um mesmo plasmídeo, facilitando a transferência gênica (CAROFF, 2000; BOTELHO, 2015).

O surgimento das Metalo-beta-lactamases, detectadas também em enterobactérias, possuem forte associação a bactérias multirresistentes (NORDMANN, 2011). Tendo em vista sua disseminação plasmidial, esta enzima já foi encontrada também isolados de *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*. Em pacientes hospitalizados em UTI ou em infecções nosocomiais, esta enzima tem sido relatada como risco devido à sua capacidade de provocar surtos (KARTHIKEYAN, 2010).

Grande parte das infecções causadas por bactérias produtoras de ESBL são provenientes de infecções hospitalares graves, provenientes de pacientes das Unidades de Terapia Intensiva (UTI) e emergências (KAHLMETER, 2015). Essas infecções possuem forte associação ao aumento da morbi-mortalidade, uso de antibióticos de última escolha, tempo de internação e despesas públicas de saúde (BRIONGOS-FIGUERO, 2012; KARANIKA 2016). E ainda, é notória a emergência de bactérias ESBL positivas em ambientes não hospitalares (COCHARD, 2014, PALZKILL, 2018).

2.4.2.1 Resistência aos Carbapenêmicos

Os carbapenêmicos fazem parte do grupo dos antimicrobianos beta-lactâmicos e ao longo dos anos, foram tidos como antibióticos de última escolha para o tratamento de infecções causadas por bactérias Gram-negativas (ARNOLD, 2011; CHERKAOUI, 2014). A resistência a estes antimicrobianos tem como principal mecanismo a produção de enzimas capazes de hidrolisar o anel beta-lactâmico, chamadas de carbapenemases. As carbapenemases são capazes de degradar outros antimicrobianos que não apenas os carbapenêmicos, como cefalosporinas e penicilinas (SHARMA, 2013; SEDIGHI, 2015).

Atualmente, as classes de carbapenemases de importância clínica produzidas por enterobactérias são referentes às metalo-betalactamases, tendo os tipos IMP, VIM e NDM mais frequentes, e as serino-betalactamases, sendo a OXA-like e KPC, as mais frequentes (GIRLICH, 2012 e MEYER, 2011).

2.4.3 Enterobactérias Resistentes no Brasil

Países em desenvolvimento e subdesenvolvidos tem sido potenciais fontes de disseminação de infecções de bactérias resistentes, visto que as baixas condições sociais e de saneamento público possuem forte influência nessa disseminação. Estudos realizados por Carvalho 2003 e Fia 2015 no Brasil mostram que a alteração da hidrodinâmica ambiental, ou seja, contaminação fecal, alteração de pH e aumento de matéria orgânica, possui influência na seleção e disseminação destes agentes (CARVALHO, 2003, FIA, 2015). O Brasil e grande parte da América Latina apresentaram até poucos anos atrás a venda de antimicrobianos de forma indiscriminada, fato este que pode estar relacionado ao alto grau de resistência bacteriana (BONELLI, 2014).

Carbapenemases do tipo KPC, OXA-48 e VIM têm sido descritas em infecções por enterobactérias em ambientes hospitalares (MEYER, 2011; SILVA, 2012). No Brasil, os primeiros relatos de bactérias produtoras de KPC surgiram em 2009, a partir de isolados de *K. pneumoniae*, nas cidades de Recife (MONTEIRO, 2009) e Rio de Janeiro (PEIRANO, 2009). A grande problemática é que os genes codificadores de resistência podem estar localizados em plasmídeos, o que facilita a transferência entre as cepas bacterianas e torna a disseminação de resistência globalizada (FEIZABADI, 2010).

A resistência aos beta-lactâmicos em isolados de *K. pneumoniae* é uma realidade presente nas infecções hospitalares brasileiras (BIBERG, 2015). Atualmente, é possível observar a emergência de bactérias resistentes em infecções de comunidades e presentes no meio ambiente (MANAIA, 2017), ainda que a maioria dos estudos se limite a bactérias no ambiente hospitalar.

A administração dos antimicrobianos também ocorre no setor pecuário brasileiro, os quais são aplicados para diferentes fins, como promotores de crescimento ou para o tratamento de infecções dos animais. Esta administração também tem ocasionado uma pressão seletiva nas bactérias, ocasionando a seleção de agentes resistentes (GONÇALVES, 2016; ECONOMOU, 2015). Um estudo do perfil de susceptibilidade antimicrobiana de cepas de *E. coli* e *Salmonella* spp, isoladas de amostras fecais de bezerros e suínos, demonstrou que 78,7% e 57,1% dos isolados foram classificadas como multirresistentes, sendo todas as cepas multirresistentes isoladas de suínos (92,30%), respectivamente. Demonstrando que existe a presença de cepas multirresistentes de enterobactérias isoladas de animais produtores de alimentos em Minas Gerais, Brasil (SOUTO, 2017).

2.5 INTEGRAÇÃO EM SAÚDE “ONE HEALTH”

O conceito de integração em saúde vai muito além do ambiente hospitalar. É imprescindível que sejam abordados e implementados programas que envolvam o estudo do meio ambiente, do meio hospitalar e do meio comunitário para que possamos compreender melhor o termo de saúde integrada. Segundo o relatório emitido em setembro de 2017, a OMS retrata o conceito de “ONE HEALTH” como uma abordagem que permitir projetar e implementar programas e políticas nos múltiplos setores de modo a trabalharem em conjunto para obter a segurança alimentar, o controle de infecções e combater a resistência a antibióticos (OMS, 2017).

O conceito *One Health* é uma estratégia necessária que tem como objetivo a garantia da Saúde Pública, saúde animal e ambiental, tornado a saúde um objetivo unificado, com medidas para estreitar laços entre os profissionais de saúde e, assim, reduzir os gastos com a saúde pública, implementar medidas sócio-educativas e reduzir o impacto ambiental.

A avaliação microbiológica da água e o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos de bactérias presentes neste recurso hídrico se faz necessária para uma melhor compreensão do impacto ambiental gerado pela contaminação das águas e do potencial impacto na população local que possui contato direto com este recurso hídrico, podendo acarretar em maiores chances de contrair infecções por patógenos resistentes.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a qualidade microbiológica da água de coleções hídricas em áreas urbanas de Salvador e uma área rural no estado da Bahia.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Quantificar a concentração de coliformes totais e *Escherichia coli* em amostras de água dos rios Jiquiriçá e Brejões/Ubaíra, BA e nas coleções hídricas Dique do Cabrito, Dique do Tororó e Lagoa do Abaeté/Salvador, BA;
- Determinar o perfil microbiológico de enterobactérias dessas coleções hídricas no período de um ano;
- Caracterizar o padrão de susceptibilidade aos antimicrobianos das enterobactérias identificadas no período;
- Identificar os genes de resistência nos isolados de *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 LOCAL DE ESTUDO

O trabalho foi realizado em duas coleções hídricas abertas localizadas no povoado de Jenipapo no município de Ubaíra, Bahia, sendo elas: rios Jiquiriça e Brejões; e em coleções hídricas fechadas localizadas em três áreas urbanas da cidade de Salvador, Bahia, sendo elas: Dique do Cabrito, Dique do Tororó e Lagoa do Abaeté. Foram avaliados três pontos integralizando as duas coleções hídricas da área rural e três pontos de cada coleção hídrica das áreas urbanas, de modo a obter uma melhor representatividade destas coleções hídricas analisadas. Os pontos foram escolhidos de acordo com as seguintes variáveis: proximidade com as habitações, local de recreação, presença de saída de esgoto clandestino, possível contato direto com o recurso hídrico pela população.

4.1.1 Jenipapo

A comunidade do povoado de Jenipapo é composta por aproximadamente 500 habitantes. Este povoado se encontra na região centro-sul da Bahia a aproximadamente 270 km da cidade de Salvador. O principal meio de vida é a agricultura, pecuária e comércio local. Os moradores utilizam os rios Brejões e Jiquiriça para diferentes fins: abastecimento de água, irrigação de hortas, fins recreacionais. Estes rios margeiam esse povoado e, de acordo com estudos sobre esquistossomose realizados através de um inquérito epidemiológico nessa área, aproximadamente 50% dos moradores relatam que o rio é a principal rota de despejo para o esgoto doméstico (BARBOSA et al, 2013). Nestas duas coleções hídricas, foram avaliados três pontos: o ponto 1 representa o rio Jiquiriça e se encontra longe das habitações, o ponto 2 representa a junção dos dois rios e situa-se depois das habitações e o ponto 3 representa o rio Brejões e situa-se perto das habitações (Figura 1). Em todos os pontos avaliados foi possível ver o despejo de esgotos clandestinos nestas águas.

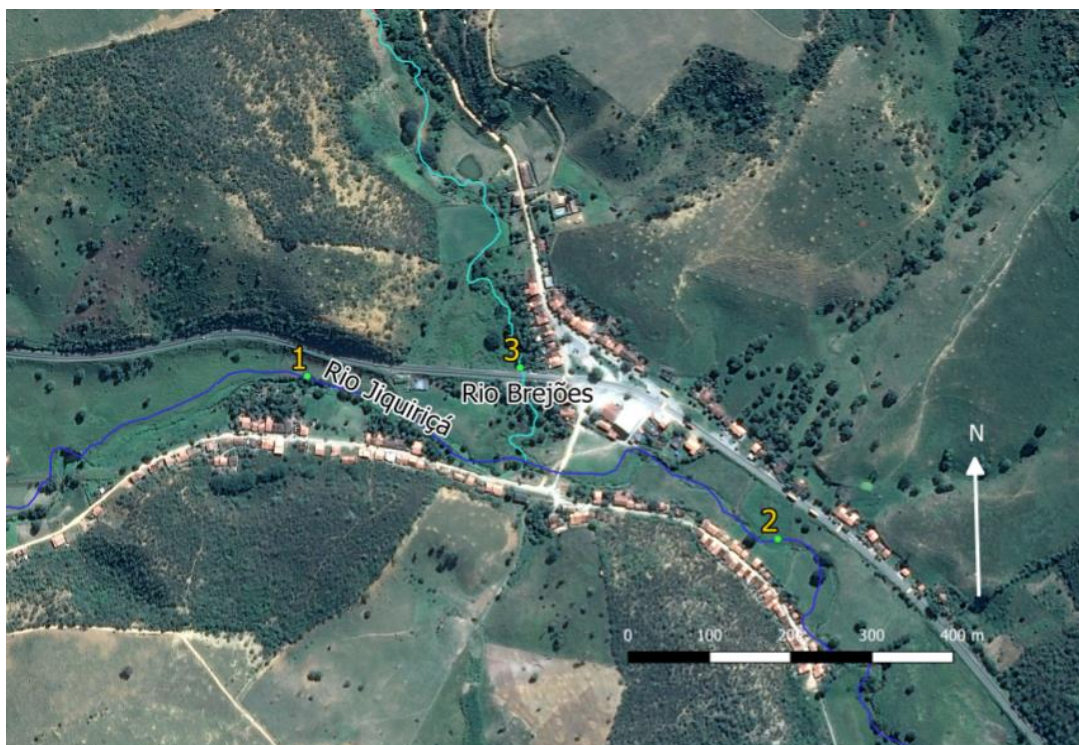


Figura 1: Localização geográfica de Jenipapo (Fonte: Google Earth)

4.1.2 Dique do Cabrito

A área urbana estudada localiza-se no bairro Alto do Cabrito, pertencente à bacia hidrográfica do rio do Cobre. De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE, este bairro possui aproximadamente 4.472 habitantes, e é considerado como um dos mais antigos da cidade. A coleção hídrica foi escolhida pela aparente falta de saneamento do esgoto local e pela proximidade de moradias circundantes à periferia do Dique do Cabrito, o que poderia indicar um alto grau de contaminação fecal e contato humano nessa coleção hídrica. Os pontos escolhidos representam o fluxo natural do dique. Desta maneira, foram avaliados três pontos: o ponto 1 que representa a parte inicial do dique e onde o Rio do Cobre deságua, ponto 2 que apresenta parte média e o ponto 3 que representa a parte final o dique (Figura 2). Nesta coleção hídrica é possível observar o descarte direto de efluentes domésticos.



Figura 2: Localização geográfica do Dique do Cabrito (Fonte: Google Earth)

4.1.3 Dique do Tororó

A coleção hídrica localiza-se no bairro Tororó e possui cerca de 110 mil metros cúbicos de água, margeado pela bacia hidrográfica do rio Lucaia. O Dique é um local bastante utilizado para atividades de exercício físico, fins recreacionais e para pesca, possuindo um fluxo populacional bastante forte nessa região (IBGE, 2012). Não foram observados descarte direto de efluentes nesta coleção hídrica, ainda que existam saídas de esgoto presentes no local. Foram avaliados três pontos com presença de píeres, o que representa possível contato humano com a coleção hídrica, sendo eles o ponto 1, ponto 2 e ponto 3 (Figura 3).



Figura 3: Localização geográfica do Dique do Tororó (Fonte: Google Earth)

4.1.4 Lagoa do Abaeté

Localizada no bairro de Itapuã em Salvador, a lagoa é situada na área de proteção ambiental do Parque Metropolitano Lagoas e Dunas do Abaeté, criado em 3 de setembro de 1993 para conter a ação predatória do local e preservar as belezas naturais da lagoa, localizada na bacia hidrográfica do rio Ipitanga. A Lagoa do Abaeté é bastante frequentada pela população local tanto para fins recreacionais quanto para atividades como pesca (OLIVEIRA, 2010). Foram avaliados três pontos de modo a obter a melhor representação do local, sendo eles: ponto 1, ponto 2 e ponto 3 (Figura 4). Os pontos 1 e 2 foram os que apresentavam maior atividade de pesca dentre os moradores da região. No ponto 3, foram observadas atividades de fins recreacionais.



Figura 4: Localização geográfica da Lagoa do Abaeté (Fonte: Google Earth)

4.2 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DA ÁGUA DE COLEÇÕES HÍDRICAS

4.2.1 Coleta de água

As coletas foram realizadas a cada três meses, no período de outubro de 2016 a agosto de 2017, de forma a contemplar cada estação do ano. Foram selecionados três pontos ao longo dos rios Brejões e Jiquiriça (Jenipapo) e três pontos ao longo do Rio do Cobre (Dique do Cabrito), Rio Lucaia (Dique do Tororó) e Rio Ipitanga (Lagoa do Abaeté), totalizando 12 pontos de coleta.

Em cada ponto foram coletados 400 mL de água, a aproximadamente 30 cm de profundidade do rio, colocados em frascos de vidro de 500 mL estéreis, e mantidas em caixas térmicas em gelo químico a 4° C até o momento das análises microbiológicas, que foram realizadas em até três horas após a coleta. As análises foram realizadas no

Laboratório de Patologia e Biologia Molecular no Instituto e Pesquisa Gonçalo Moniz (FIOCRUZ), no Laboratório de Microbiologia Clínica da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia (UFBA) e no setor de microbiologia do Hospital São Rafael.

4.3 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA PARA COLIFORMES TERMOTOLERANTES E *Escherichia coli*

A identificação de coliformes termotolerantes foi realizada com o kit Coliscan Easygel (Microbiology Laboratories, Goshen, IN, EUA). Seguindo as orientações do fabricante, 1 mL de água de coletada foi misturado ao meio de cultura fornecido pelo kit e homogeneizado por inversão 10 vezes. A solução foi plaqueada e mantida à temperatura ambiente por 48 horas para observação de crescimento bacteriano. A contagem das unidades formadoras de colônia (UFC) foi realizada manualmente. Esse processo foi repetido posteriormente para confirmação do resultado. Colônias com coloração rosa indicam a presença de coliformes totais, enquanto as azuis/roxas indicam presença de *E. coli*. O limite de contagem estabelecido no estudo foi de 1000 UFC/mL (Figura 5).

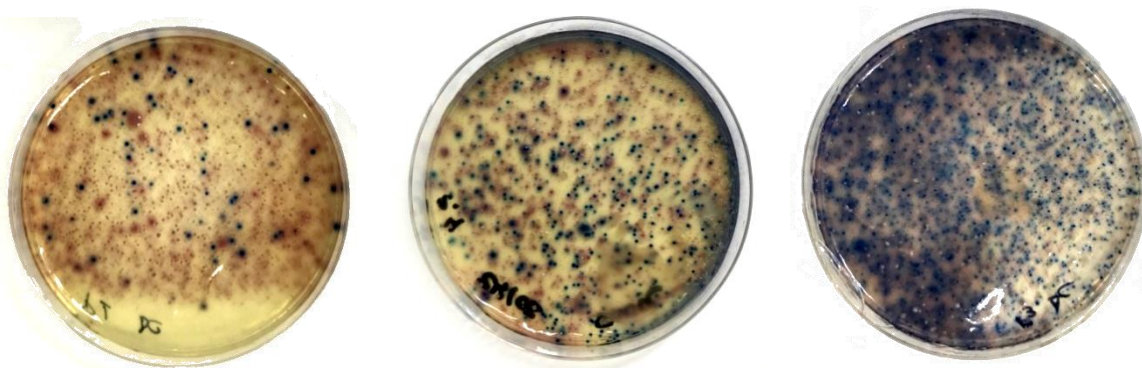


Figura 5: Contagem dos coliformes totais (colônias rosas) e de *E. coli* (colônias azuis/roxas) através do Kit Coliscan EasyGel® (Fonte: Autora).

4.2.3 Análise microbiológica para triagem de isolados resistentes aos antimicrobianos e identificação da espécie

Para triagem de seleção de enterobactérias resistentes, 100 µL de água coletada foi semeada em duas placas de meio Ágar MacConkey (Merck, Darmstadt, Alemanha): para a triagem de resistência aos carbapenêmicos, em uma placa foi adicionado 1 µg/mL de meropenem (ABL® 500mg, Brasil) e para a triagem de resistência as cefalosporinas, em outra placa foi dissolvido 2 µg/mL de cefotaxima (SIGMA® 1g, Estados Unidos), (adaptado por MONTEZZI et al, 2015). Para obtenção de colônias isoladas, as amostras foram semeadas também por diluições seriadas (1:1, 1:10 e 1:100) e incubadas por 24 horas em estufa bacteriológica a 36°C ± 2°C, no Laboratório de Microbiologia Clínica da Universidade Federal da Bahia (UFBA). A partir da observação do crescimento bacteriano, foram selecionadas colônias com características morfológicas sugestivas de enterobactérias para posterior identificação, cujo critério de inclusão foi: colônias mucóides, lactose positivas e negativas, diferença no tamanho das colônias, colônias secas. Após esta seleção, as colônias foram semeadas em meio ágar TSI (Triple Sugar Iron) (Neogen, Lansing, Michigan, EUA) para identificação dos fermentadores. Todas as bactérias fermentadoras de glicose no TSI foram re-isoladas em Ágar TSA (Ágar Triptona de Soja) (Neogen, Lansing, Michigan, EUA).

A identificação da espécie foi realizada por meio do método automatizado, por espectrometria de massa, MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time Of Flight*) (VITEK®-MS, Biomérieux, França). O perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos foi determinado pelo método de microdiluição em caldo através do sistema automatizado VITEK®-2 (Biomérieux, França), seguindo os critérios de padronização do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2017) para enterobactérias. Foram testados os seguintes antibióticos: Ampicilina/Sulbactam; Amicacina; Ceftazidima; Ciprofloxacino; Cefepime; Ceftriaxona; Cefuroxima/Axetil; Cefotaxima; Cefuroxima; Ertapenem; Gentamicina; Imipenem; Meropenem; Piperacilina/Tazobac; Tigeciclina. A avaliação da presença de ESBL e de carbapenemase também foi realizada através dos testes de confirmação seguindo os

critérios do CLSI, Teste Disco Combinado e Teste de Hodge modificado, respectivamente. Posteriormente, as amostras bacterianas foram armazenadas em meio Caldo de Soja Tripticaseína (TSB) acrescido de glicerol (20%) a -80°C . Ambos os métodos foram executados em parceria com o Laboratório de Análises Clínicas do Hospital São Rafael (HSR), Salvador, Bahia.

4.4 ANÁLISE GENOTÍPICA PARA IDENTIFICAÇÃO DOS GENES DE RESISTÊNCIA

4.4.1 Extração de DNA e amplificação

Para a extração de DNA dos isolados de *E. cloacae*, *E. coli* e *K. pneumoniae*, utilizou-se o método de fervura, a partir da seleção de ± 5 colônias bacterianas puras cultivadas em Ágar Triptona de Soja (TSA) por 18 a 24 horas a $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$. As colônias foram ressuspensas em $100\mu\text{L}$ de água MilliQ estéril em tubos de microcentrífuga de $1,5\text{ mL}$, incubados em banho-maria a 95°C por 5 minutos e, posteriormente, centrifugadas a 12.000 rpm por 2 minutos. Transferiu-se o sobrenadante para outro tubo de microcentrífuga e armazenou-se a -20°C até o momento da reação de PCR (ROWLANDS et al, 2006).

A amplificação foi realizada através da reação em cadeia de polimerase (PCR) convencional monoplex, utilizando o TopTaq Master Mix[®] (Qiagen, EUA) seguindo protocolo modificado de JEMIMA (2008); RASHEED, et al (1997); YIGIT (2001); PITOUT (2005); PEIRANO (2011) e POIREL (2011) (Tabela 1), através do Mastercycler[®] Gradient da Eppendorf. Os *primers* utilizados na reação tinham como alvo os genes de resistência associados a produção de beta-lactamases do tipo cefotaximases (*blaCTX-M*, *blaSHV*, *blaTEM*) e de carbapenemases (*blaKPC*, *blaVIM*, *blaNDM*, *blaSPM*, *blaOXA-48*). Foi padronizada a mesma temperatura de anelamento para todos os *primers* utilizados. As condições de temperatura no termociclador foram: 96°C por 1 minuto (desnaturação), 62°C por 1 minuto (anelamento), 72° por 1 minuto (extensão) por 35 ciclos. Para uma reação foi utilizado $51\mu\text{L}$ de H_2O (Qiagen, EUA),

15,5µL de TopTaq Master Mix® (2x) (Qiagen, EUA), 2µL do *primer* alvo, 2,5µL de CoralLoad® (10x) (Qiagen, EUA) e 5µL de DNA, para um volume final de 25µL. Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA) a 2%, foi utilizado 8 µL SYBR® safe (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA).

Tabela 1: Lista dos *primers* utilizados nas reações de PCR para de detecção de genes de resistência

B-lactamases	Genes alvo	Sequencia(5'-3')	tamanho (pb)	Ref.
Cefotaximases	CTX-M Família	F - ATGTGCAGYACCAGTAARGT R - TGGGTRAARTARGTSACCAGA	544	Jemima, 2008
	SHV Família	F - TTAGCGTTGCCAGTGCTC R - GGGTTATTCTTATTTGTCGC	930	Rasheed, <i>et al</i> , 1997
	TEM Família	F - ATGAGTATTCAACATTTCCG R - CTGACAGTTACCAATGCTTA	920	Rasheed, <i>et al</i> , 1997
Carbapenemase	KPC Família	F - TGTCACTGTATCGCCGTC R - CTCAGTGCTCTACAGAAAACC	900	Yigit, 2001
	VIM Família	F - GTTTGGTCGCATATCGCAAC R - AATGCGCAGCACCAGGATAG	389	Pitout, 2005
	NDM Família	F - GCAGCTTGTCGGCCATGCGGGC R - GGTCGCGAAGCTGAGCACCGCAT	782	Peirano, 2011
	SPM Família	F - AAAATCTGGGTACGCAAACG R - ACATTATCCGCTGGAACAGG	271	Poirel, 2011
	OXA-48	F - GCGTGGTTAAGGATGAACAC	438	Poirel, 2011
		R - GCGTGGTTAAGGATGAACAC		

4.4.2 Controles positivos

Foram utilizados DNA de bactérias de referência associadas aos genes de resistência - controles positivos - gentilmente cedidos pela Dra. Joice Neves Reis Pedreira, do Instituto de Pesquisa Gonçalo-Moniz LPBM/IGM, para padronização da reação de PCR para cada gene avaliado no estudo.

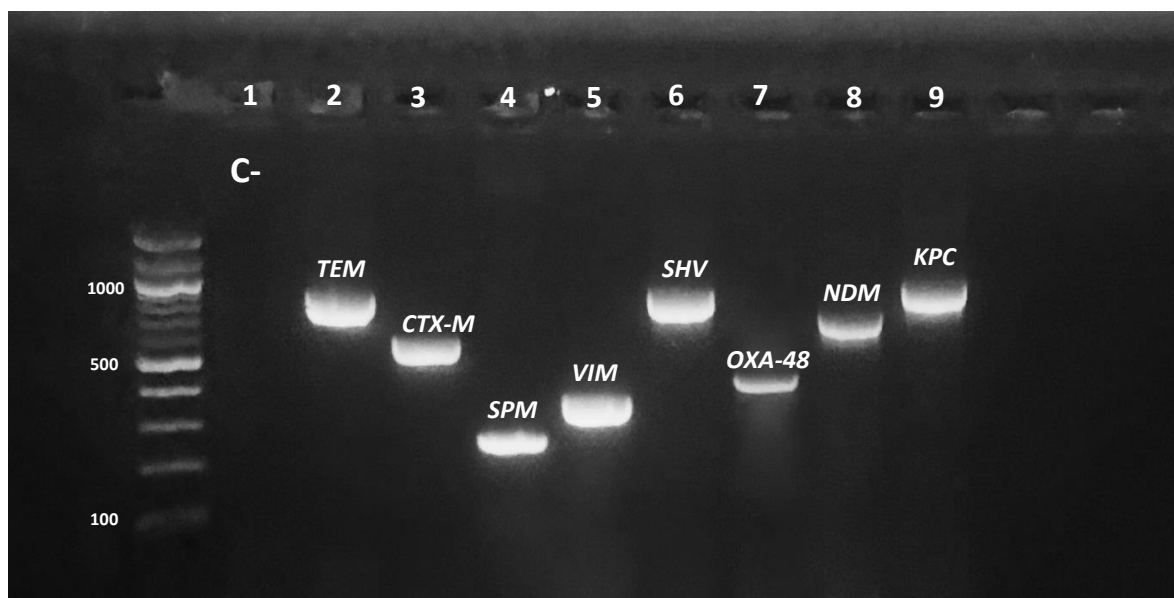


Figura 6: Gel de eletroforese do PCR para os controles positivos aplicados no estudo. **Canaleta 1:** controle negativo. **Canaleta 2:** *E. coli* 300 para o gene *blaTEM*. **Canaleta 3:** *E. coli* 455 para o gene *blaCTX-M*. **Canaleta 4:** *Pseudomonas aeruginosa* para o gene *blaSPM*. **Canaleta 5:** *Pseudomonas fluorescens* CCBH 11805 para o gene *blaVIM*. **Canaleta 6:** Cepa *Klebsiella pneumoniae* ATCC 7000603 para o gene *blaSHV*. **Canaleta 7:** *Raoultella ornithinolytica* para o gene *blaOXA-48*. **Canaleta 8:** *Enterobacter cloacae* CCB 410882 para o gene *blaNDM*. **Canaleta 9:** *K. pneumoniae* kp13 para o gene *blaKPC* (Fonte: Autora).

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas para comparação da contaminação fecal correlacionadas com a sazonalidade, foram realizadas através do GraphPad Prism®, através do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis (KW), sendo considerado significativo $P < 0,05$. Os dados obtidos no presente estudo foram tabulados através do programa Excel, onde foram

realizados testes não paramétricos de média, mediana, desvio padrão. Para a distribuição de frequências, os dados foram avaliados quanto às frequências relativas e absolutas, também realizados através do programa Excel.

5. RESULTADOS

Durante o período de outubro de 2016 a agosto de 2017 foram analisados 12 pontos das coleções hídricas em 4 coletas, totalizando 48 amostras. A contagem de média de coliformes totais para o Jenipapo (Brejões/Jiquiriça) foi de 1409 UFC/mL. Nos sítios urbanos Dique do Cabrito, Dique do Tororó e Lagoa do Abaeté as contagens médias foram 2885, 601 e 617 UFC/mL, respectivamente. A taxa de contaminação média de *E. coli* para Jenipapo (Brejões/Jiquiriça) foi de 657 UFC/mL. Nas coleções hídricas urbanas, Dique do Cabrito, Dique do Tororó e Lagoa do Abaeté foram 1563, 34, 38 UFC/mL, respectivamente (Tabela 2 e Gráfico 1).

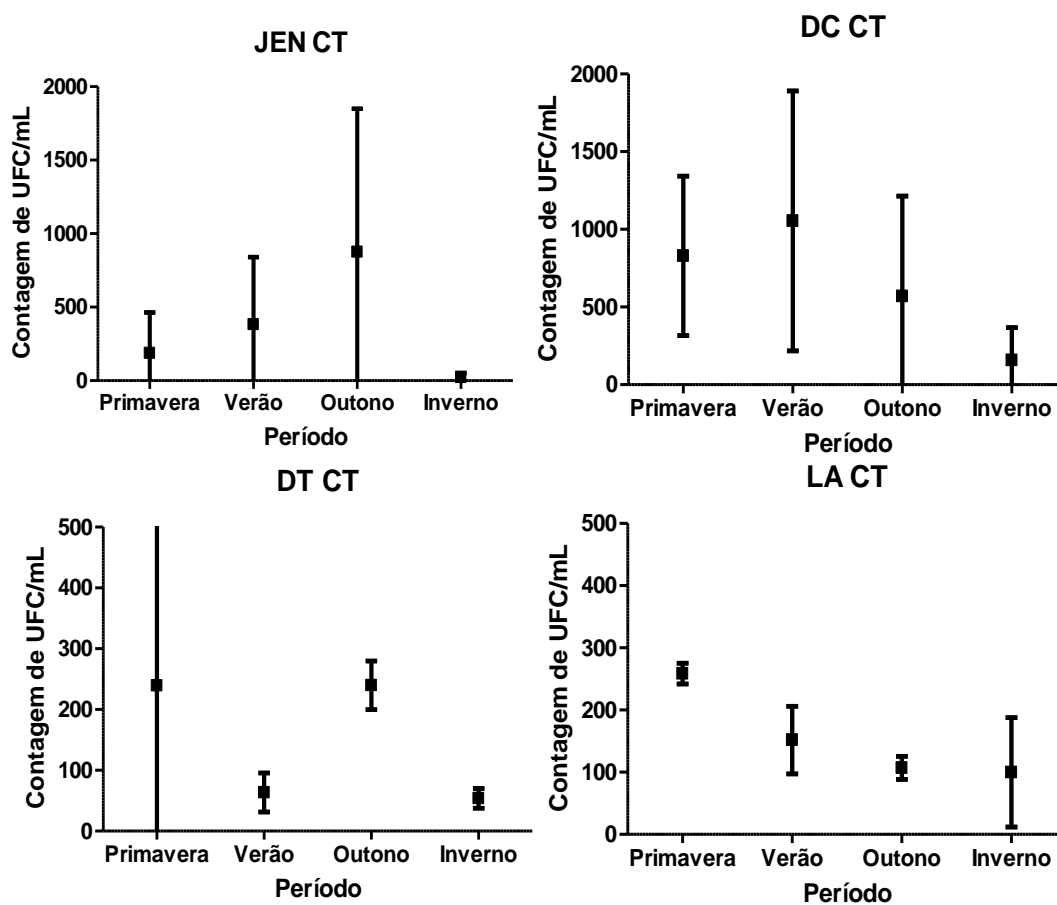
Tabela 2: Quantificação coliformes totais (CT) e *Escherichia coli* (UFC/mL) por local estudado e sazonalidade.

Localidade	Primavera		Verão		Outono		Inverno		Total	
	CT	<i>E. coli</i>	CT	<i>E. coli</i>	CT	<i>E. coli</i>	CT	<i>E. coli</i>	CT	<i>E. coli</i>
Jenipapo	187	138	383	127	817	386	22	6	1409	657
Dique do Tororó	242	8	64	1	240	10	55	15	601	34
Dique do Cabrito	829	544	1054	591	670	396	332	32	2885	1563
Lagoa do Abaeté	259	6	150	24	107	5	101	3	617	38
Total	1517	696	1651	743	1834	797	510	56	5512	2292

A avaliação da contaminação fecal também foi realizada de acordo com a sazonalidade. Em Jenipapo, a estação com maior presença de coliformes totais e *E. coli* foi o outono com 817 e 386 UFC/mL, respectivamente. No Dique do Tororó, a contaminação fecal foi maior na primavera apresentando média de coliformes totais de

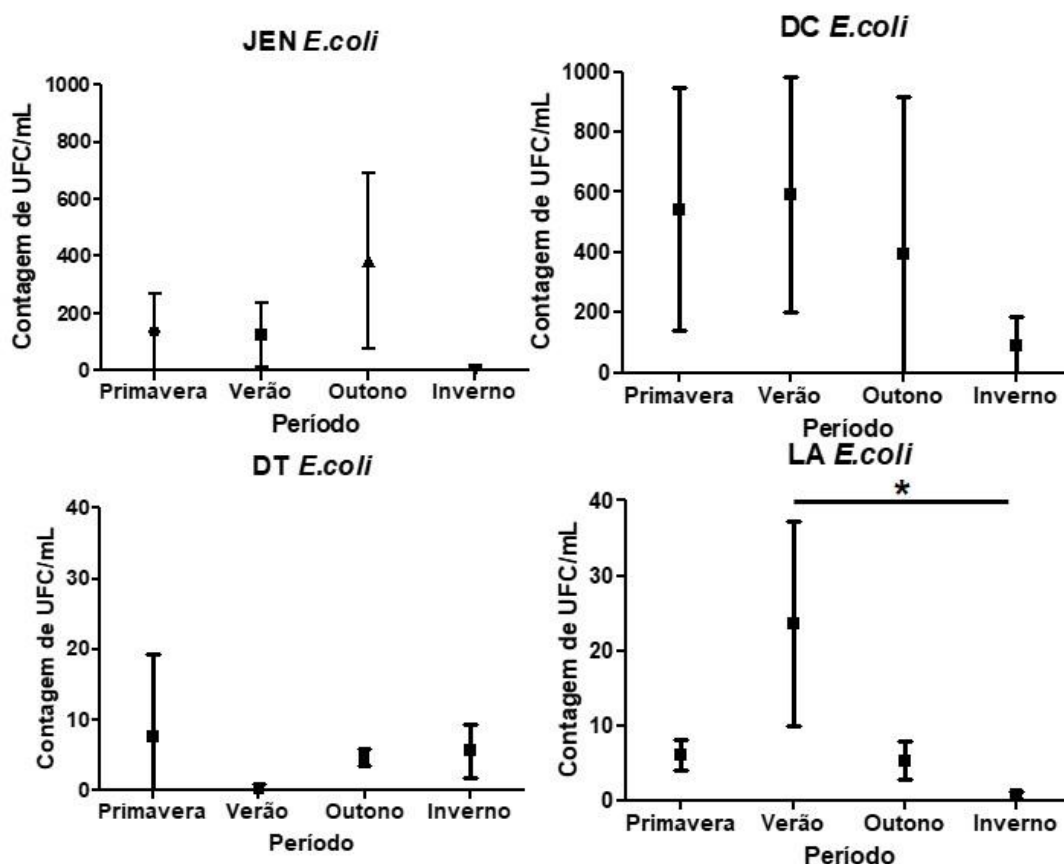
242 UFC/mL e de *E. coli* de 8 UFC/mL. No Dique do Cabrito, o verão apresentou maiores quantidades de coliformes totais e *E. coli*, 1054 e 591 UFC/mL, respectivamente. Na Lagoa do Abaeté, os coliformes totais foram encontrados em maior quantidade na primavera, 259 UFC/mL. Já a quantidade de *E. coli* foi maior no verão, com 24 UFC/mL. A única localidade que apresentou diferença estatisticamente significativa foi na Lagoa do Abaeté, entre o verão e o inverno ($P < 0,05$) (Gráfico 2).

Gráfico 1: Avaliação da contaminação fecal sazonal por coliformes totais (UFC/mL)



Legenda: JEN (Jenipapo), DC (Dique do Cabrito), DT (Dique do Tororó), LA (Lagoa do Abaeté), CT (Coliformes Totais).

Gráfico 2: Avaliação da contaminação fecal sazonal por *E. coli* (UFC/mL)



Legenda: JEN (Jenipapo), DC (Dique do Cabrito), DT (Dique do Tororó), LA (Lagoa do Abaeté), CT (Coliformes Totais).

O perfil microbiológico das enterobactérias presentes nas coleções hídricas estudadas foi avaliado por localidade. Foram encontradas 19 espécies de enterobactérias diferentes em todas as coleções hídricas no total das 196 enterobactérias analisadas. Destas, 55/196 (28%) foram identificadas em Jenipapo; 59/196 (30%) no Dique do Cabrito, 35/196 (18%) Dique do Tororó e 47/196 (24%) na Lagoa do Abaete. A espécie de enterobactéria mais prevalente no estudo foi *E. cloacae* com 65/196 isolados (33%), seguido de *K. pneumoniae* com 44/196 isolados (22%) e *E. coli* com 31/196 isolados (16%) (Gráfico 3).

Analisando a distribuição por localidade, observa-se que em Jenipapo, foram isoladas 11 espécies diferentes. As mais prevalentes foram *E. cloacae* (17/55 - 31%), *Providencia rettgerii* (10/55 - 18%), *E. coli* (5/55 - 9%) e *Morganella morganii* (5/55 - 9%). No Dique do Cabrito, foram encontradas 13 espécies de enterobactérias diferentes. A bactéria de maior prevalência foi *E. coli* (21/59 - 36%), seguido de *K. pneumoniae* (13/59 - 22%) e *E. cloacae* (13/59 - 22%). No Dique do Tororó, a maior prevalência foi de *E. cloacae* representando 74% (26/35) de todos os isolados. Na Lagoa do Abaeté 49% dos isolados (23/47) foram de *K. pneumoniae* e 19% (9/47) de *E. cloacae* (Tabela 3).

Gráfico 3: Perfil microbiológico das enterobactérias presentes nas coleções hídricas (n=196).

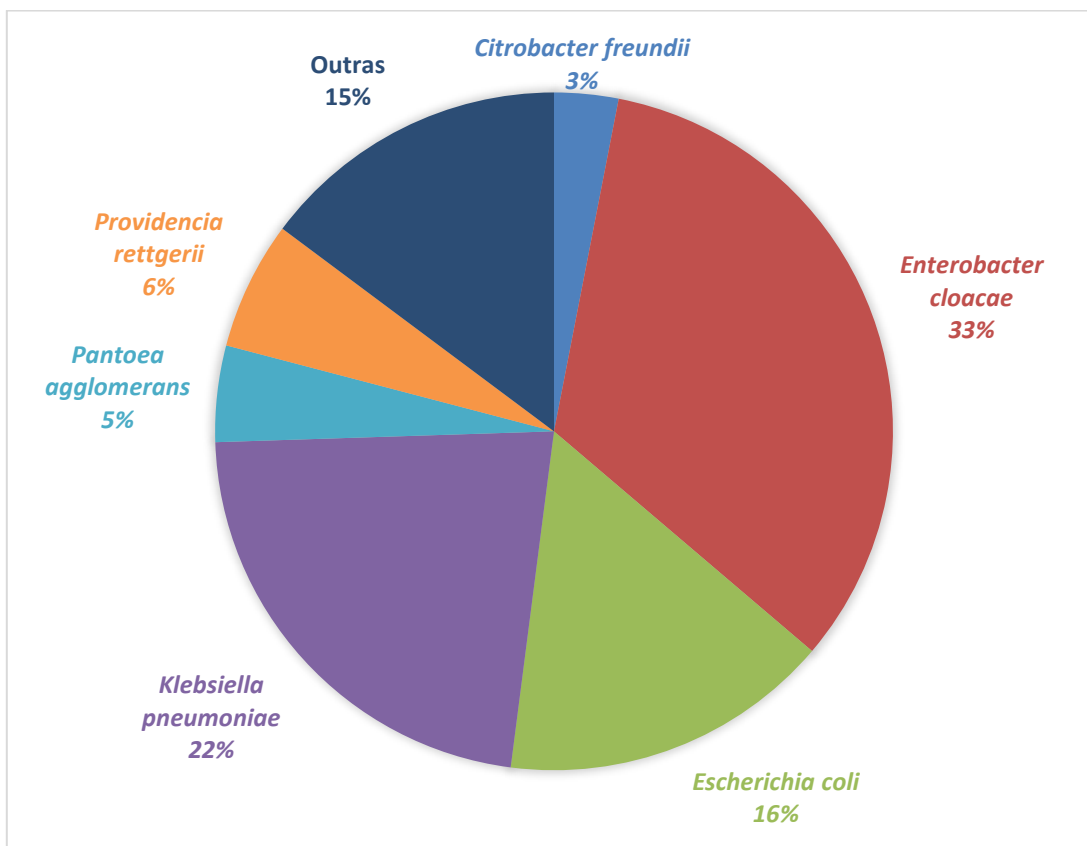


Tabela 3: Perfil microbiológico das enterobactérias presentes nas coleções hídricas avaliadas identificadas por MALDI-TOF®

Perfil microbiológico de enterobactérias	JEN	DC	DT	LA	Total
<i>Citrobacter freundii</i>	3(6%)	2(3%)	-	1(2%)	6 (4%)
<i>Citrobacter werkmanii</i>	-	1(2%)	-	2(4%)	2 (1%)
<i>Cronobacter sakazakii</i>	-	-	-	1(2%)	1 (0.5%)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	-	1(2%)	-	1(2%)	1 (0.5%)
<i>Enterobacter cloacae</i>	17(30%)	13(22%)	26(74%)	9(19%)	65 (33%)
<i>Enterobacter gergoviae</i>	-	1(2%)	-	-	1 (0.5%)
<i>Erwinia billingiae</i>	-	1(2%)	-	-	1 (0.5%)
<i>Escherichia coli</i>	5(9%)	21(35%)	2(6%)	3(6%)	31 (16%)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	3(6%)	-	-	-	3 (2%)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4(7%)	13(22%)	4(11%)	23(50%)	44 (22%)
<i>Kluyvera ascorbata</i>	2(4%)	1(2%)	-	-	3 (2%)
<i>Kluyvera intermedia</i>	-	-	-	1(2%)	1 (0.5%)
<i>Leclercia adecarboxylata</i>	-	-	-	1(2%)	1 (0.5%)
<i>Morganella morganii</i>	5(9%)	-	-	-	5 (3%)
<i>Pantoea agglomerans</i>	3(6%)	2(3%)	3(9%)	1(2%)	9 (5%)
<i>Pectobacterium carotovorum</i>	2(4%)	1(2%)	-	-	3 (2%)
<i>Providencia rettgerii</i>	10(17%)	1(2%)	-	1(2%)	12 (6%)
<i>Serratia marcescens</i>	1(2%)	-	-	2(4%)	3 (2%)
<i>Serratia rubideae</i>	-	1(2%)	-	1(2%)	2 (1%)
Total de isolados	55	59	35	47	196
N. de espécies diferentes	11	13	4	13	19

JEN – Jenipapo; DC – Dique do Cabrito; DT – Dique do Tororó; LA – Lagoa do Abaeté

Tabela 4: Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos dos isolados de *E. cloacae*, *E. coli* e *K. pneumoniae* por localidade

Sensibilidade antimicrobiana	JEN	DC	DT	LA	Total
<i>Enterobacter cloacae</i>	17	13	26	9	65 (46%)
Resistentes (R/I)					
ASB	16 (94%)	13 (100%)	9(34%)	5 (56%)	34 (52%)
ASB, IPM, HODGE +	-	-	2(8%)	-	2 (3%)
ASB, MER, HODGE +	-	-	2(8%)	-	2 (3%)
ASB, ERT, HODGE +	-	-	13 (50%)	-	13 (20%)
GEN	-	-	-	2 (22%)	2 (3%)
Sensíveis	1 (6%)	-	-	2 (22%)	3 (5%)
<i>Escherichia coli</i>	5	21	2	3	31 (22%)
Resistentes (R/I)					
ASB	-	-	-	1 (33%)	1 (3%)
ASB, CPM, CXM, CRX, CAZ, CRO, ESBL+	-	2 (10%)	-	-	2 (6%)
Sensíveis	5 (100%)	19 (90%)	2 (100%)	2 (67%)	28 (20%)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4	13	4	23	44 (31%)
Resistentes (R/I)					
ASB, CPM, CXM, CRX, CAZ, CRO, ESBL+	-	1 (7%)	-	-	1 (2%)
PPT, ERT, IPM, MER	-	1 (7%)	-	-	1 (2%)
Sensíveis	4 (100%)	11 (86%)	4 (100%)	23 (100%)	42 (96%)
Total de isolados	26	47	32	35	140

ABS - Ampicilina/Sulbactam; AMI – Amicacina; CAZ – Ceftazidima; CPM – Cefepime; CRO – Ceftriaxona; CRX - Cefuroxima/Axetil; CXM – CEFUROXIMA; DC – Dique do Cabrito; DT – Dique do Tororó; ERT – Ertapenem; GEN – Gentamicina; I – indeterminado. IPM- Imipenem; JEN – Jenipapo; LA – Lagoa do Abaeté; MER – Meropenem; PPT - Piperacilina/Tazobac; R- resistente; TGI- Tigeciclina.

Em Jenipapo, 16/17 (94%) dos isolados de *E. cloacae* foram Ampicilina/Sulbactam resistentes e os 5/5 (100%) isolados de *E. coli* e 4/4 (100%) isolados *K. pneumoniae* demonstraram sensibilidade a todos os antimicrobianos testados.

Na coleção hídrica do Dique do Cabrito, todos os 13/13 (100%) isolados de *E. cloacae* foram Ampicilina/Sulbactam resistentes. Foram encontrados 2/21 (10%) isolados de *E. coli* e 1 (8%) isolado de *K. pneumoniae* produtores de ESBL e resistentes a todos os carbapenêmicos testados.

No Dique do Tororó, 17/26 (65%) isolados de *E. cloacae* demonstraram ser resistentes a um dos carbapenêmicos testados e HODGE positivos. A Lagoa do Abaeté apresentou 2/9 (22%) isolados de *E. cloacae* resistentes a Gentamicina e 1/3 (33%) isolado de *E. coli* Ampicilina/Sulbactam resistente.

A análise de sensibilidade antimicrobiana das outras espécies de enterobactérias avaliadas no estudo (Apêndice 1) demonstrou 1/6 (17%) isolado de *Citrobacter freundii*; 2/3 (66%) isolados de *Citrobacter werkmanii*, 1/1 (100%) *Cronobacter sakazakii* e 2/2 (100%) isolado de *Enterobacter aerogenes* resistente a Ampicilina/Sulbactam na Lagoa do Abaeté. No Dique do Cabrito, 2/2 (100%) isolado de *Enterobacter aerogenes*, 1/2 (50%) *Serratia rubidaea* e 1/1 (100%) isolado de *Pectobacterium carotovorum* demonstraram ser resistente a Ampicilina/Sulbactam. Todos os isolados de *Providencia rettgeri* 12/12 (100%) demonstraram ser resistentes a Ampicilina/Sulbactam. Em Jenipapo, 4/4 (100%) dos isolados de *Morganella morganii* também demonstraram ser resistente a Ampicilina/Sulbactam.

Todos os isolados de *Enterobacter gergoviae* (1), *Erwinia billingiae* (1), *Klebsiella oxytoca* (3), *Kluyvera ascorbata* (3), *Kluyvera intermedia* (1), *Leclercia adecarboxylata* (1) e *Serratia marcescens* (3) demonstraram ser sensíveis a todos os antimicrobianos testados.

A análise molecular dos isolados de *E. cloacae*, *E. coli* e *K. pneumoniae* demonstrou presença do gene de resistência aos betalactâmicos do tipo cefotaximas de maior prevalência foi o *CTX-M 20/93* (21%) (Tabela 5). Não foi encontrado gene de resistência em isolados sensíveis nos testes fenotípicos. Apenas um isolado apresentou presença do gene *TEM 1/96* (1%). Em relação às carbapenemases, o gene de maior prevalência foi *OXA-48 32/96* (32%), seguido de *VIM 22/93* (24%) e *SPN 16/93* (17%). Apenas dois isolados apresentaram presença do gene *NDM 2/96* (3%). Vale ressaltar que no presente estudo, nenhum isolado avaliado apresentou presença dos genes *KPC* e *SHV* (Tabela 5).

Tabela 5: Identificação da presença dos genes de resistência por localidade

Gene de resistência - n (%)	Jenipapo	Dique do Cabrito	Dique do Tororó	Lagoa do Abaeté	Total
<i>CTX-M</i>	4 (19)	4 (27)	4 (12)	9 (33)	20 (21)
<i>SHV</i>	0	0	0	0	0
<i>TEM</i>	0	1 (7)	0	0	1 (2)
<i>KPC</i>	0	0	0	0	0
<i>SPM</i>	2 (10)	2 (13)	6 (18)	7 (26)	16 (17)
<i>NDM</i>	0	0	1 (3)	1 (4)	2 (3)
<i>OXA-48</i>	7 (33)	3 (20)	12 (36)	9 (33)	32 (33)
<i>VIM</i>	8 (38)	5 (33)	10 (30)	1 (4)	22 (24)
Total	21 (22)	15 (16)	33 (34)	27 (28)	96

A descrição da presença dos genes de resistência por isolado de *E. cloacae*, *E. coli* e *K. pneumoniae* encontra-se nas Tabelas 6, 7, 8 e 9. Em Jenipapo, pode-se observar que foram encontrados 4 (24%) isolados de *E. cloacae* com presença de mais de um gene de resistência. O único isolado de *K. pneumoniae* apresentou presença de *OXA-48* e os 3 (60%) isolados de *E. coli* apresentaram presença de *OXA-48*, *CTX-M* e *VIM*, respectivamente.

Tabela 6: Genes de resistência e resultados confirmatórios de resistência dos isolados de *E. cloacae*, *E. coli* e *K. pneumoniae* em Jenipapo

Enterobactéria	Gene de resistência (n)		
	ESBL	HODGE	
<i>E. cloacae</i>	Negativo	Negativo	SPN1 (2)
	Negativo	Negativo	OXA-48 (2)
	Negativo	Negativo	VIM (3)
	Negativo	Negativo	CTX-M, VIM (1)
	Negativo	Negativo	OXA-48, VIM (1)
	Negativo	Negativo	CTX-M, SPN1 (1)
	Negativo	Negativo	OXA-48, CTX-M, VIM (1)
<i>E. coli</i>	Negativo	Negativo	VIM (2)
	Negativo	Negativo	OXA-48 (1)
	Negativo	Negativo	CTX-M (1)
	Negativo	Negativo	VIM (1)
<i>K. pneumoniae</i>	Negativo	Negativo	OXA-48 (2)

No Dique do Cabrito, pode-se observar que 2 (10%) isolados de *E. coli* que demonstraram ser produtoras de ESBL, também apresentaram genes de resistência. Apenas 1 (8%) isolado de *K. pneumoniae* produtora de ESBL, também demonstrou presença de um gene de resistência. Dois isolados de *E. cloacae* (15%) apresentaram presença de mais de um gene de resistência.

Tabela 7 Genes de resistência e resultados confirmatórios de resistência dos isolados de *E. cloacae*, *E. coli* e *K. pneumoniae* no Dique do Cabrito

Enterobactéria	Gene de resistência		
	ESBL	HODGE	(n)
<i>E. cloacae</i>	Negativo	Negativo	SPN1 (1)
	Negativo	Negativo	CTX-M (1)
	Negativo	Negativo	VIM (1)
	Negativo	Negativo	OXA-48 (1)
	Negativo	Negativo	VIM, TEM (1)
	Negativo	Negativo	VIM, SPN1 (1)
<i>E. coli</i>	Positivo	Negativo	VIM, CTX-M (1)
	Positivo	Negativo	CTX-M (1)
	Negativo	Negativo	VIM (1)
<i>K. pneumoniae</i>	Negativo	Negativo	OXA-48 (2)
	Negativo	Negativo	CTX-M (1)

No Dique do Tororó, os 11 (42%) isolados de *E. cloacae* HODGE positivos também apresentaram genes de resistência, sendo a maioria aos genes de carbapenemase. Os 7 (27%) isolados de *E. cloacae* que se apresentaram sensíveis pelo método VITEK-2 também apresentaram presença de genes de resistência pelo método de PCR. Os 4 (30%) isolados de *K. pneumoniae* apresentaram genes de resistência.

Tabela 8: Genes de resistência e resultados confirmatórios de resistência dos isolados de *E. cloacae*, *E. coli* e *K. pneumoniae* no Dique do Tororó

Enterobactéria	VITEK-2		Gene de resistência (n)
	ESBL	HODGE	
<i>E. cloacae</i>	Negativo	Negativo	CTX-M (1)
	Negativo	Negativo	NDM (1)
	Negativo	Negativo	SPN1 (2)
	Negativo	Positivo	VIM (4)
	Negativo	Positivo	OXA-48 (2)
	Negativo	Negativo	OXA-48 (1)
	Negativo	Positivo	OXA-48, SPN1 (2)
	Negativo	Positivo	OXA-48, CTX-M (1)
	Negativo	Positivo	OXA-48, VIM (4)
	Negativo	Positivo	OXA-48, SPN1, VIM (1)
<i>K. pneumoniae</i>	Negativo	Negativo	OXA-48 (1)
	Negativo	Negativo	OXA-48, VIM (1)
	Negativo	Negativo	SPN1 (1)
	Negativo	Negativo	CTX-M (1)

Na Lagoa do Abaeté, quatro isolados (44%) de *E. cloacae* apresentaram um gene de resistência e um (11%) isolado de mesma espécie apresentou mais de um gene de resistência aos carbapenêmicos. Três (23%) isolados de *K. pneumoniae* apresentaram multirresistência. Dois isolados (50%) de *E. coli* demonstraram presença dos genes CTX-M e SPN avaliados no estudo.

Tabela 9: Genes de resistência e resultados confirmatórios de resistência dos isolados de *E. cloacae*, *E. coli* e *K. pneumoniae* na Lagoa do Abaeté

Enterobactéria	VITEK-2		Gene de resistência (n)
	ESBL	HODGE	
<i>E. cloacae</i>	Negativo	Negativo	CTX-M (1)
	Negativo	Negativo	NDM (1)
	Negativo	Negativo	SPN1 (1)
	Negativo	Negativo	OXA-48 (2)
	Negativo	Negativo	OXA-48, SPN1 (1)
<i>E. coli</i>	Negativo	Negativo	CTX-M (1)
	Negativo	Negativo	SPN1 (1)
<i>K. pneumoniae</i>	Negativo	Negativo	CTX-M (3)
	Negativo	Negativo	SPN1 (3)
	Negativo	Negativo	OXA-48 (4)
	Negativo	Negativo	CTX-M, VIM (1)
	Negativo	Negativo	CTX-M, SPN1 (1)
	Negativo	Negativo	OXA-48, CTX-M (2)

6. DISCUSSÃO

Estima-se que as doenças oriundas a partir da ingestão de água de má qualidade que encontram-se associadas à falta de saneamento básico sejam responsáveis por 4% de todas as mortes do mundo, anualmente (PRUSS, 2002; TROEGER, 2017). Os resultados deste estudo indicaram que todos os locais avaliados demonstraram estar contaminados por coliformes totais e *E. coli*. Acredita-se que a taxa elevada de coliformes termotolerantes decorre, principalmente, da excreção de fezes humanas dos esgotos domésticos nos corpos d'água, visto que essas enterobactérias habitam principalmente o cólon de animais homeotérmicos (GEORGE, 2001; RILEY, 2014; COCHARD, 2014).

A literatura descreve que taxas de urbanização ao redor dos recursos hídricos e utilização destes como rota de esgoto está relacionada a uma maior contaminação fecal e poluição em geral (CARVALHO, 2003; RODRIGUEZ, 2015; CARVALHO, 2016). Isso pôde ser observado nos dados aqui relatados. As duas localidades com maior densidade populacional e proximidade dos residentes no entorno dos corpos hídricos, Jenipapo e Dique do Cabrito, foram as que apresentaram maiores taxas de contaminação fecal. A descrição da presença de algum tipo de saneamento básico em apenas 50% das residências de Jenipapo foi realizada por nosso grupo (BARBOSA et. al 2013). Dados similares não foram obtidos no Dique do Cabrito, mas é possível observar evidentes saídas de esgoto ao longo do corpo d'água avaliado. Os outros dois sítios avaliados apresentaram taxas menores de contaminação. O Dique do Tororó fez parte do Programa de Saneamento Ambiental da Bahia intitulado "Bahia Azul" que foi concluído em 2004. Este programa visou reduzir o despejo de esgoto em recursos hídricos, o que pode ter contribuído para a diminuição da contaminação fecal. A Lagoa do Abaeté é uma área de proteção ambiental, logo, não existem residências regulares ao seu entorno, conseqüentemente, o despejo de dejetos domésticos no local é minimizado. A contaminação fecal pode se dar devido às fezes de animais presentes na região e/ou banhistas que utilizam as águas avaliadas. De acordo com a resolução 357 do CONAMA, todas as coleções hídricas avaliadas não estão aptas ao uso em recreação de contato secundário, na irrigação e em atividades de pesca, pois apresentaram contaminação por

E. coli e coliformes totais acima do limite de 2000 UFC/100mL e 2.500 UFC/100mL, respectivamente, que corresponde a 20 UFC/mL e 25 UFC/mL (CONAMA, 2015).

A avaliação nas diferentes estações do ano demonstrou não interferir de forma significativa no nível de contaminação fecal nos locais avaliados, exceto na Lagoa do Abaeté, no comparativo entre a estação verão em relação ao inverno ($P < 0,05$). Como descrito anteriormente, trata-se de uma área de lazer onde a presença de banhistas aumenta nos meses mais quentes (dezembro e janeiro). O aumento da densidade populacional, junto com determinados hábitos, pode explicar esse aumento bacteriano nas contagens de coliformes. É importante ressaltar que apenas uma coleta em um único momento de uma estação dificilmente representará os dados de toda uma estação. Desta maneira, os resultados encontrados devem ser avaliados com certa cautela. Nas outras localidades, as tendências observadas, mesmo sem significância estatística, podem ter possíveis explicações. Em Jenipapo, foi observado um aumento na taxa de contaminação no outono, o que pode estar relacionado a uma forte estiagem que ocorreu na região naquele ano. O discreto aumento da contaminação fecal do Dique do Tororó no inverno pode estar associado à maior precipitação pluviométrica de média mensal, que de acordo com os dados do Instituto do Meio Ambiente e Recursos Hídricos (INEMA) demonstrou ser maior nos meses de abril, julho e agosto, podendo ocasionar o escoamento de lixo para dentro desta coleção hídrica (INEMA, 2017). Durante o período de chuva, o escoamento de margens sem vegetação natural por gramíneas em áreas antropizadas, como diques, por exemplo, pode contribuir para o aumento da contaminação e poluição destes recursos hídricos (FARAGE et al., 2010).

Em relação à análise do perfil microbiológico das enterobactérias das coleções hídricas avaliadas, foram identificadas 19 espécies diferentes de enterobactérias. As espécies isoladas podem ser encontradas naturalmente em águas naturais, solo e plantas, além de esgotos domésticos (BETTEGA, 2006). A enterobactéria mais prevalente foi *E. cloacae* (65%), seguido de *K. pneumoniae* (44%), *E. coli* (30%), *Providencia rettgerii* (12%), *Citrobacter freundii* (6%) e *Morganella morganii* (5%), demonstrando uma grande variabilidade de bactérias potencialmente patogênicas nestes recursos hídricos. *E. cloacae* possui grande importância clínica, visto que é capaz de

colonizar diversos instrumentos hospitalares, podendo gerar infecções oportunistas. Desempenha também um papel importante em infecções relacionadas à assistência a saúde do trato respiratório inferior, infecções intra-abdominais, endocardites e infecções cutâneas e de tecidos moles (WANG, 2010). *K. pneumoniae* possui grande relevância em infecções do trato respiratório, principalmente em pneumonias e choques sépticos e é tida também como uma das espécies mais comum em infecções hospitalares com perfil de multirresistência, presente na família Enterobacteriaceae (BIBERG, 2015). *E. coli*, possui grande relevância clínica em relação às infecções do trato urinário, sendo a maior responsável pelas infecções do trato urinário adquiridas na comunidade (VAN DER BIJ e BRIONGOS-FIGUERO, 2012).

Nas coleções hídricas de Jenipapo, as enterobactérias mais encontradas foram *E. cloacae* (31%) e *Providencia rettgeri* (18%), que são comumente descritas em águas superficiais, no solo e em esgotos (LI et al., 2015). Nas comunidades urbanas, podemos observar que, no Dique do Cabrito, *E. coli* (36%) foi a enterobactéria mais prevalente, podendo indicar contaminação fecal recente nesta coleção hídrica (GEORGE, 2001; RILEY, 2014). No Dique do Tororó e Lagoa do Abaeté, a prevalência foi de isolados de *E. cloacae* (74%) e *K. pneumoniae* (19%) e de isolados de *K. pneumoniae* (49%) de *E. cloacae* (19%), respectivamente. Acredita-se que grande parte das enterobactérias encontradas nas comunidades rurais e urbanas chegue às localidades por não existir um saneamento básico correto, e isso pode ser indicado pela alta quantidade de bactérias identificadas que são descritas em dejetos domésticos contendo fezes (CARVALHO, 2016). Além disso, é importante destacar que esses corpos d'água encontram-se contaminados por enterobactérias patogênicas de grande importância médica (TROEGER, 2017).

A resistência antimicrobiana é um dos grandes desafios da medicina moderna. As previsões futuras são alarmantes e estima-se que em 2050, as infecções geradas por bactérias resistentes causarão uma mortalidade maior que o câncer, com uma estimativa de 10 milhões de mortes anualmente (O'NEILL, 2016). A contaminação fecal e a dispersão de resistência antimicrobiana parecem estar intimamente relacionadas com a densidade populacional e o descarte inapropriado de dejetos nas proximidades de corpos

d'água (RODRIGUEZ, 2015). As coleções hídricas se tornaram fontes potencializadoras de transferência gênica de multirresistência. O meio ambiente também tem se demonstrado como cenário propício a essa disseminação, pois, mesmo onde não existe descarte direto de dejetos hospitalares, existe a presença de bactérias resistentes nestes ambientes (WU, 2011).

A análise do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos testados indicou que 16 (94%) isolados de *E. cloacae* em Jenipapo, 13 (100%) no Dique do Cabrito, 26 (100%) no Dique do Tororó e 5 (55%) na Lagoa do Abaeté eram resistentes à Ampicilina/Sulbactam, algo esperado, visto que existe uma tendência à resistência à Penicilina por parte deste microrganismo (DUARTE et al, 2008). De acordo com um estudo realizado por Pires e colaboradores em 2007, cerca de 62% dos isolados de *E. cloacae* avaliados eram resistentes à Ampicilina e eles creditaram este fato ao uso indiscriminado histórico deste fármaco para infecções do trato urinário na medicina clínica (PIRES et al, 2007; DUARTE et al, 2008).

No Dique do Cabrito, foram observados dois isolados de *E. coli* (10%) e um isolado de *K. pneumoniae* (7%) produtores de ESBL. Essa resistência aos beta-lactâmicos pode ser ocasionada pelas enzimas da classe A de Ambler, que é o exemplo das cefotaximases (CTX-M), as quais possuem alta atividade hidrolítica, principalmente em relação à cefotaxima e ceftriaxona, tendo sido a primeira enzima relatada capaz de hidrolisar cefalosporinas de espectro estendido em níveis clínicos significativos (FEIZABADI, 2010; VAN DER BIJ, 2012). Nas enterobactérias, a resistência pode ocorrer devido à possível expressão de beta-lactamases e da hiperprodução da enzima codificada cromossomicamente, a AmpC, que é frequentemente associada à resistência a cefalosporinas de terceira geração e ao possível mecanismo de resistência ligadas às alterações da DNAGirase, provocadas por mutações cromossômicas e/ou em genes que regulam a expressão de bombas de efluxo, gerando resistência às cefalosporinas (MEYER, 2011). As infecções por bactérias produtoras de ESBL são de grande importância para a Saúde Pública, pois são enzimas capazes de hidrolisar e, conseqüentemente, inibir uma gama de antibióticos beta-lactâmicos (SHARMA, 2013).

Foi observado um isolado de *K. pneumoniae* (7%) no Dique do Cabrito e 15 isolados de *E. cloacae* (57%) no Dique do Tororó resistentes ao meropenem, imipenem e ertapenem. Existem duas classes de enzimas relacionadas à resistência aos carbapenêmicos de grande importância descritas, principalmente em enterobactérias que são as metalo-betalactamases (IMP, VIM e NDM) e as serinocarbapenemases (KPC e as OXA-carbapenemases) (CHERKAOUI, 2014). Além do aspecto clínico de prognóstico potencialmente fatal para o indivíduo infectado, um dos principais alardes frente a este tipo de resistência é devido à transferência gênica por plasmídeos inter e intra espécies (CHERKAOUI, 2014; KARANIKI, 2016).

Tendo em vista que a família Enterobacteriaceae possui uma vasta variabilidade de espécies, nosso estudo se ateve a descrição dos genes de resistência e os perfis de susceptibilidade a três de grande importância clínica e potencialmente patogênicas, sendo elas: *E. coli*, *E. cloacae* e *K. pneumoniae* (BETTEGA, 2006). A análise por PCR demonstrou que a maior frequência de resistência aos beta-lactâmicos foi pelo gene *blaCTX-M* (22%), que pode estar relacionado às cefotaximases. Isto reforça os dados da literatura que admitem que a produção de cefotaximases é um dos mecanismos mais comuns de resistência às cefalosporinas de terceira geração (DEHSHIRI et al, 2018). Esse grupo de enzimas cefotaximases tem sido frequentemente relatado na epidemiologia de resistência aos beta-lactâmicos, muito provavelmente devido ao fato da fácil disseminação, considerando que está localizado em sequências móveis, como os plasmídeos (FEIZABADI, 2010; VAN DER BIJ, 2012). Os outros genes avaliados que possuem enzimas que pertencem a classe A de Ambler e estão distribuídas no grupo 2 de Bush, que correspondem aos genes *blaSHV* e *blaTEM*, não demonstraram grande prevalência no estudo. Apenas uma enterobactéria demonstrou ter o gene *blaTEM* (1%) e nenhuma demonstrou presença do gene *blaSHV* (PALZKILL, 2018; DEHSHIRI et al, 2018).

A resistência aos carbapenêmicos por perda ou diminuição da expressão de porinas também tem sido relatada em diversas espécies da família Enterobacteriaceae. Estudos *in vivo* sugerem que as bactérias com esse tipo de mutação são originárias de espécies capazes de produzir AmpC ou ESBL que foram anteriormente expostas aos

carbapenêmicos (PRAJAPATI, 2018; YAFEI et al., 2018). Nas últimas décadas, a produção de enzimas de AmpC também possui alta relevância e contribuição com as altas taxas de resistência aos beta-lactâmicos e carbapenêmicos (CHAUDHARY, 2018).

Em relação às enterobactérias, *E. coli*, *K. pneumoniae* e *E. cloacae*, são relatadas como bactérias portadoras de AmpC, principalmente em infecções nosocomiais (PAVEZ et al, 2008; CHAUDHARY, 2018). Entre as carbapenemases, *OXA-48* foi o gene de carbapenemase mais prevalente no presente estudo, em 33% dos isolados, e pertence à classe D de Ambler e ao grupo 2D de Bush. Essas enzimas estão associadas à resistência a todas as classes de cefalosporinas, carbapenêmicos e penicilinas. Esta ocorrência pode estar relacionada à sua fácil disseminação plasmidial (ARGENTE et al, 2018).

O gene *blaVIM* (24%) foi o segundo mais prevalente no estudo, seguido de *blaSPM* (17%), que correspondem às metalobetalactamases (ROSCHANSKI, 2018; KHODADADIAN, 2018). As metalobetalactamases (MBLs) pertencentes à classe B em Ambler e classe 3 de Bush, possuem a capacidade de hidrolisar todos os beta-lactâmicos, com exceção dos monobactâmicos, como o Aztreonam (SEDIGHI, 2015). Possuem um mecanismo de resistência dependente de íons de zinco divalentes no sítio ativo da enzima (SEDIGHI, 2015).

O gene *blaNDM* foi encontrado exclusivamente em dois *E. cloacae* no presente estudo. Estudos descritos na literatura apontam que isolados resistentes de bactérias Gram-negativas com produção de carbapenemases também podem estar correlacionadas com a indução de uma resposta ao uso do imipenem e cefalosporinas de terceira geração (JIA; MULLER, 2018). Apesar da sua vasta disseminação e prevalência em *K. pneumoniae* e outros isolados de enterobactérias, nenhum isolado demonstrou ter presença do gene *blaKPC* avaliado no estudo, o que está relacionado com a presença de outros mecanismos que não este na influência da resistência aos carbapenêmicos (MULLER, 2018).

Nas áreas avaliadas, rural e urbana, é importante destacar que mesmo sem existir nenhum indício de dejetos hospitalares nos rios estudados, ainda foram encontradas

enterobactérias com mais de uma resistência. Em Jenipapo, por existir animais de criação e pecuária na região, acredita-se que o uso indiscriminado de antibióticos na pecuária também pode contribuir na seleção de agentes resistentes (CHANG; ECONOMOU, 2015). Um estudo realizado por Furlan em 2018 demonstrou que foram detectados genes *blaSHV* e *blaCTX-M-Gp1* em amostras de solo, água e fezes de porcos em uma criação de suínos no Brasil, indicando a disseminação de bactérias resistentes a beta-lactâmicos entre os porcos da fazenda e o ambiente ao seu redor (FURLAN, 2018). Outros indícios que apoiam este fato é a proximidade do leito do rio com criações de animais e despejo direto de esgotos domésticos (SOUTO et al, 2017).

Nas áreas urbanas, a densidade populacional e a falta de saneamento básico possuem influência na contaminação fecal em ambientes hídricos e, conseqüentemente, na disseminação e seleção de resistência antimicrobiana. Todavia, independente da forma de surgimento desta resistência, a possibilidade de transferência horizontal plasmidial resulta na troca de informação genética entre esses micro-organismos, gerando uma resistência adquirida (ZHOU, 2016). Uma grande relevância deste trabalho é que foram observadas bactérias resistentes mesmo fora do ambiente hospitalar fato este que reforça que, mesmo em ambientes hídricos que não possuem interferência direta de resíduos hospitalares nas proximidades, é possível encontrar enterobactérias resistentes (SU et al., 2018).

7. CONCLUSÕES

Todos os locais avaliados no presente estudo apresentaram contaminação fecal por *E. coli* e coliformes totais. As coleções hídricas encontram-se não aptas ao uso de balneabilidade, de acordo com a RDC 357/05 instituída pelo CONAMA, 2015. Acredita-se que a densidade populacional e falta de saneamento básico adequado possuem influência na taxa de contaminação.

A análise do perfil microbiológico nas coleções hídricas evidenciou que a enterobactéria mais prevalente foi *E. cloacae*, seguido de *K. pneumoniae* e *E. coli*.

Dentre as enterobactérias avaliadas, a maior resistência foi ao antimicrobiano ampicilina/sulbactam. Em Jenipapo, *E. coli* e *E. cloacae* foram sensíveis a todos os antimicrobianos testados. No Dique do Cabrito, dois isolados de *E. coli* e um isolado de *K. pneumoniae* foram ESBL positivos. No Dique do Tororó os isolados de *E. cloacae* foram HODGE positivos e ampicilina/sulbactam resistentes. A Lagoa do Abaeté demonstrou isolados de *E. cloacae* resistentes a gentamicina e ampicilina/sulbactam.

Foram encontradas enterobactérias resistentes em todas as coleções hídricas avaliadas. Os genes de resistência mais encontrados foram relacionados às cefotaximases, *blaCTX-M* e aos carbapenêmicos *blaOXA-48*, *blaVIM* e *blaSPM*.

O meio ambiente parece estar associado à disseminação e seleção de bactérias resistentes, fato evidenciado pela presença de resistência bacteriana sem o descarte direto de dejetos hospitalares, demonstrando que as infecções comunitárias podem ser contraídas através destes ambientes contaminados.

REFERÊNCIAS

- AL-BAYSSARI C. *et al.* Detection of expanded-spectrum β -lactamases in Gram-negative bacteria in the 21st century. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 13, p. 1139-1158, jul. 2015.
- ALSHARAPY, S. A. *et al.* Prevalence of ST131 clone producing both ESBL CTX-M-15 and aac(6')Ib-cr among ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* isolates from yemen. **Microbial Drug Resistance**, 2018.
- AMERICAN ACADEMY OF MICROBIOLOGY. Antibiotic resistance: An ecological perspective on an old problem. Disponível em: <http://academy.asm.org/images/stories/documents/antibioticresistance.pdf>, 2009.
- ARGENTE, M. *et al.* Molecular characterization of OXA-48 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains after a carbapenem resistance increase in Catalonia. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, 2018.
- ARNOLD, R. S. *et al.* Emergence of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. **South Medical Journal**, v. 104, p. 40-45, 2011.
- BARBOSA, L. M. Avaliação da estrutura populacional do *Schistosoma mansoni* em duas comunidades rurais e em uma localidade urbana. 115 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia em Saúde) - Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2013.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 2914 de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. **Diário Oficial da República Federativa [do] Brasil**, 2011.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. **Aprova Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos e seus anexos I e II**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. ANVISA, 2001.
- BEGHI, G. *et al.* Monitoring of hospital acquired pneumonia in patients with severe brain injury on first access to intensive neurological rehabilitation: First year of observation. **Monaldi Archives for Chest Disease**, v. 88, p. 888, 2018.

BENGTSSON-PALME e LARSSON. Genes of antibiotic resistance in the environment: prioritizing risks. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, p. 396, abr. 2015.

BENGTSSON-PALME. *et al.* Shotgun metagenomics reveals a wide array of antibiotic resistance genes and mobile elements in a polluted lake in India. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 648, 2014.

BIBERG, C. A. *et al.* KPC2-producing *Klebsiella pneumoniae* in a hospital in the Midwest region of Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 501-504, 2015.

BONELLI, R. R.; MOREIRA, B. M.; PICÃO, R. C. Antimicrobial resistance among Enterobacteriaceae in South America: history, current dissemination status and associated social economic factors. **Drug Resistance Updates**, v.17, n.1-2, p.24-36, abr. 2014.

BOTELHO L. A. *et al.* Widespread distribution of CTX-M and plasmid-mediated AmpC β -lactamases in *Escherichia coli* from Brazilian chicken meat. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 110, p. 249-254, abr. 2015

BRIONGOS-FIGUERO, L. *et al.* Epidemiology, risk factors and comorbidity for urinary tract infections caused by extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)- producing enterobacteria. **International Journal of Clinical Practice**, v. 66, n.9, p. 891-896, ago. 2012.

CABRAL, J. S. Water Microbiology: Bacterial Pathogens and Water. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v.7, n. 10, p. 3657-3703, out. 2010.

CAROFF, N. *et al.* Analysis of the effects of -42 and -32 ampC promoter mutations in clinical isolates of *Escherichia coli* hyperproducing AmpC. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 45, n. 6, p. 783-788, jun. 2000.

CARVALHO, L. F.; ALBUQUERQUE, F. G. **Influência da ocupação urbana na hidrodinâmica do lago Paranoá-DF**. Texto Didático. Série Planejamento e Gestão Ambiental, Brasília, v. 1, n.1, p. 1-19, 2005.

CARVALHO, A. P. *et al.* Avaliação da poluição em rios utilizando índices de qualidade da água: um estudo de caso no Ribeirão São João em Porto Nacional–TO. **Revista de Geociências**, São Paulo, v. 35, n. 3, p. 472-484, 2016.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Antibiotic resistance threats in the United States, Atlanta, 2014. Disponível em:

<https://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/index.html>, 2014. Acesso em 29 mai. 2018

CHANG, Q. *et al.* Antibiotics in agriculture and the risk to human health: how worried should we be? **Evolutionary Applications**, v. 8, n. 3, p. 240-247, mar. 2015.

CHERKAOUI, A. *et al.* ESBL and carbapenemases in Enterobacteriaceae. **Revue Medicale Suisse**, v. 10, n. 450, p. 2142-2148, nov. 2014.

CHAUDHARY, U.; AGARWAL, S.; RAGHURAMAN, K. Identification of extended spectrum beta lactamases, AmpC and carbapenemase production among isolates of *Escherichia coli* in North Indian tertiary care centre. **Avicenna Journal of Medicine**, v. 8, n. 2, p. 46-50, abr. 2018.

COCHARD, H. *et al.* Extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in French nursing homes: an association between high carriage rate among residents, environmental contamination, poor conformity with good hygiene practice, and putative resident-to-resident transmission. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 35, p. 384-389, abr. 2014.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. CETESB. **Relatório de qualidade das águas litorâneas no Estado de São Paulo: balneabilidade das praias**. São Paulo, 2013. Disponível em:

<http://www.cetesb.sp.gov.br/userfiles/file/agua/praias/relatorios/relatorio_balneabilidade_e_2013.pdf>. Acesso em: 29 jan. 2018.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. CONAMA. Resolução 430 de 13 de maio de 2011. Dispõe sobre condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. Brasília, 16 de maio de 2011. Disponível em: < <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=646>>. Acesso em: 29 abr. 2018.

CONSTANZO, S. D.; MURBY, J.; BATES, J. Ecosystem response to antibiotics entering the aquatic environmental. **Marine Pollution Bulletin**, v. 51, p. 218-223, nov. 2005.

COUDRON, P. E, MOLAND, E. S, THOMSON, K. S. Occurrence and detection of AmpC beta-lactamases among *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis* isolates at a veterans medical center. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 5, p. 1791-1796, mai. 2000.

DEHSHIRI, M. *et al.* The frequency of *Klebsiella pneumoniae* encoding genes for CTX-M, TEM-1 and SHV-1 extended-spectrum beta lactamases enzymes isolated from urinary tract infection. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 17, n. 1, p. 4, fev. 2018.

DE LASTOURS, V. *et al.* Quinolone-resistant *Escherichia coli* from the faecal microbiota of healthy volunteers after ciprofloxacin exposure are highly adapted to a commensal lifestyle. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, n. 3, p. 761-768, mar. 2014.

DUARTE, G.; MARCOLIN, A. C.; QUINTANA, S. M.; CAVALLI, R. C. Infecção urinária na gravidez. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, Rio de Janeiro, v. 30, n. 2, p. 93-100, mar. 2008.

ECONOMOU, V.; GOUSIA, P. Agriculture and food animals as a source of antimicrobial-resistant bacteria. **Infection and Drug Resistance**, v. 1, n. 8, p. 49-61, abr. 2015.

FEIZABADI, M. M. *et al.* Distribution of bla (TEM), bla (SHV), bla (CTX-M) genes among clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* at Labbafinejad Hospital, Tehran, Iran. **Microbial Drug Resistance**, v. 1, n. 1, p. 49-53, mar. 2010.

FIA, R. *et al.* Qualidade da água de um ecossistema lótico urbano. **Revista Brasileira de Recursos Hídricos**, Porto Alegre, v.20, n.1, p. 267–275, jan-mar. 2015.

FURLAN, J. P. R.; STELING, E. G. Detection of β -lactamase encoding genes in feces, soil and water from a Brazilian pig farm. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 190, p. 76, jan. 2018.

GEORGE, I.; CROP, P.; SERVAIS, P. Use of β -D-Galactosidase and β -D-Glucuronidase Activities for Quantitative Detection of Total and Faecal Coliforms in Wastewater. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 670–675, ago. 2001.

GIRLICH, D.; POIREL, L.; NORDMANN, P. Value of the modified Hodge test for detection of emerging carbapenemases in Enterobacteriaceae. **Journal of Clinical Microbiology**, v.50, n.2, p.477-479, fev. 2012.

GISKE, C.G; et al. Clinical Economic Impact Common Multidrug-Resistant Gram Negative Bacilli. **Antimicrobial Agents Chemother**, v. 52, n. 3, p. 813-821, mar. 2008.

GONÇALVES, D. R. P.; ROCHA, C. H. Indicadores de qualidade da água e padrões de uso da terra em bacias hidrográficas no Estado do Paraná. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 51, n. 9, p. 1172-1183, set. 2016.

HAO, M. *et al.* Porin Deficiency in Carbapenem-Resistant *Enterobacter aerogenes* Strains. **Microbial Drug Resistance**, v. 24, n. 9, p. 1277-1283, nov. 2018.

HASSAN, H.; ABDALHAMID, B. Molecular characterization of extended-spectrum beta-lactamase producing Enterobacteriaceae in a Saudi Arabian tertiary hospital. **Journal of Infection and Developing Countries**, v. 8, n. 3, p. 282-288, mar. 2014.

JIA, X. *et al.* Carbapenem-Resistant *E. cloacae* in Southwest China: Molecular Analysis of Resistance and Risk Factors for Infections Caused by NDM-1-Producers. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 658, abr. 2018.

KARTHIKEYAN, K.; THIRUNARAYAN, M. A.; KRISHNAN, P. Coexistence of blaOXA-23 with blaNDM-1 and armA in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from India. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n. 10, p. 2253-2254, out. 2010.

KAHLMETER, G.; AHMAN, J.; MATUSCHEK, E. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* causing uncomplicated urinary tract infections: a European update for 2014 and comparison with 2000 and 2008. **Infectious Diseases and Therapy**, v. 5, n. 4, p. 417-423, dez. 2015.

KARANIK, S. *et al.* Fecal colonization with extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae and risk factors among healthy individuals: a systematic review and metaanalysis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 63, n. 3, p. 310-318, ago. 2016.

KHODADADIAN, R. *et al.* Detection of VIM-1 and IMP-1 genes in *Klebsiella pneumoniae* and relationship with biofilm formation. **Clinical Infectious Diseases**, v. 63, p. 310-318, fev. 2016.

KIM, J. Y. *et al.* Resistance to fluoroquinolone by a combination of efflux and target site mutations in Enterococcal *Escherichia coli* isolated in Korea. **Osong Public Health Research Perspectives**, v. 3, n. 4, p. 239-244, dez. 2012.

KÜMMERER, A. Antibiotics in the aquatic environment – a review – part I. **Chemosphere**, v. 75, p. 417-434, abr. 2009.

LAGO, A.; FUENTEFRIA, S. R.; FUENTEFRIA, D. B. Enterobactérias produtoras de ESBL em Passo Fundo, Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Minas Gerais, v. 43, p. 430-434, jul-ago. 2010.

LEGGETT, J. E. Aminoglycosides. **Infectious Diseases**, Amsterdam, ed. 4, v. 2, p. 1233-1238, 2017.

LI, B. *et al.* Metagenomic and network analysis reveal wide distribution and co-occurrence of environmental antibiotic resistance genes. **ISME Journal**, v. 9, n. 11, p. 2490–2502, nov. 2015.

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

MANAIA, C. M. Assessing the Risk of Antibiotic Resistance Transmission from the Environment to Humans: Non-Direct Proportionality between Abundance and Risk. **Trends in Microbiology**, v. 23, n. 3, p. 173-181, mar. 2017.

MEYER, G.; PICOLI, S. U. Fenótipos de betalactamases em *Klebsiella pneumoniae* de hospital de emergência de Porto Alegre. **Jornal Brasileiro Patologia Medica Laboratorial**, Rio Grande do Sul, v. 47, n.1, fev. 2011.

MONTEIRO, J.; FERNANDES, A. First Report of KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae* Strains in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 1, p. 333-334, jan. 2009.

MONTEZZI, L. F. *et al.* Occurrence of carbapenemase-producing bacteria in coastal recreational waters. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 45, n. 2, p. 174-177, fev. 2015.

MÜLLER H.; *et al.* Dissemination of multi-resistant Gram-negative bacteria into German wastewater and surface waters. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 94, n. 5, mai. 2018.

NORDMANN, P.; CUZON, G.; NAAS, T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. **Lancet Infectious Diseases**, v. 9, n. 4, pag. 228-236, abr. 2009.

NORDMANN, P. *et al.* The emerging NDM carbapenemases. **Trends in Microbiology**, v. 19, n. 12, pag. 588-595, dez. 2011.

O conceito "one health" no contexto da crise (PDF Download Available).

Disponível em:

https://www.researchgate.net/publication/258219771_O_conceito_one_health_no_conte_xto_da_crise. Acesso em: 08 jan. 2018.

OLIVEIRA, I. Infecção nosocomial em unidades de terapia intensiva neonatal.

Faculdade de Ceilândia, Universidade de Brasília. Brasília, 2013. Disponível em:

http://bdm.unb.br/bitstream/10483/5929/1/2013_Isabela%20Fernanda%20Barreto%20de%20Oliveira.pdf. Acesso em: 15 fev. 2018.

OLIVEIRA, O. Ambiente, cultura e turismo: o caso da Lagoa do Abaeté. *In:*

ENCONTRO NACIONAL DA ANPPAS, 5., 2010, Florianópolis, 2010. Disponível em:

<http://anppas.org.br/encontro5/cd/artigos/GT1-804-895-20100903205053.pdf>. Acesso em: 22 dez. 2017.

OMS. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Relatório de Resistência Bacteriana - 14 de maio 2014**. Disponível em:<<http://ameci.org.br/noticias/39/organizacao-mundial-da-saude-oms-divulga-relatorio-de-resistencia-bacteriana.html>>. Acesso em 24 de janeiro de 2017.

ONESIOS, K. M.; YU, J. T.; BOUWER, E. J., Biodegradation and removal of pharmaceuticals and personal care products in treatment systems: a review.

Biodegradation, v. 20, p. 441-466, jul. 2009.

O'NEILL, J. Tackling drug-resistant infections globally: final report and

recommendations, The review on antimicrobial resistance. **AMR**, maio, 2016.

PAGÉS, J.; JAMES, C.; WINTERHALTER, M. The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. **Nature Reviews Microbiology**, v.6, n. 12, p. 893-903, dez. 2008.

PAVEZ, M. *et al.* Emergence of carbapenem-resistant *E. coli* producing CMY-2-TYPE AmpC beta-lactamase in Brazil. **Journal of Medical Microbiology**, v. 57, n. 12, p. 1590-1592, 2008.

PAVEZ, M.; MAMIZUKA, E.; LINCOPAN, N. Produção de carbapenemase em enterobactérias isoladas em hospitais de São Paulo: emergência da variante KPC-2 no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmaceuticas**, São Paulo, v. 44, p. 90, 2008. Supl. 1.

PEREIRA, B. W. *et al.* Uso da terra e degradação na qualidade da água na bacia hidrográfica do rio Peixe-Boi, PA, Brasil. **Revista Ambiente & Água**, São Paulo, v. 11, n. 2, p. 472, 2016.

PIRES, M. C. S. *et al.* Prevalência e susceptibilidade 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**, Minas Gerais, v. 40, n. 6, p. 643-647, nov-dez. 2007.

POIREL, L.; PITOUT, J.; NORDMANN, P. Carbapenemases: molecular diversity and clinical consequences. **Future Microbiology**, v. 2, n. 5, p. 501-512, out. 2011.

PRAJAPATI, J. D. *et al.* Enrofloxacin Permeation Pathways across the Porin OmpC. **Journal of Physical Chemistry**, v. 22, n. 4, p. 1417-1426, jan. 2018.

PRUSS, A. *et al.* Estimating the burden of disease from water, sanitation, and hygiene at a global level. **Environmental Health Perspectives**, v. 115, n. 5, p. 537-542, mai. 2002.

ROSCHANSKI, N. *et al.* Retrospective Analysis of bacterial cultures sampled in german chicken-fattening farms during the years 2011–2012 revealed additional vim-1 carbapenemase-producing *Escherichia coli* and a serologically rough *Salmonella enterica* Serovar Infantis. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 538, mar. 2018.

RODRIGUEZ, M. *et al.* Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in hospital and urban wastewaters and their impact on the receiving river. **Water Research**, v. 1, n. 69, p. 234-242, fev. 2015.

ROWLANDS, G. *et al.* Resistência térmica de *Salmonella* Enteritidis, S. Panama e S. Infantis em fórmula láctea infantil reconstituída. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 65, n. 1, p.36-39, 2006.

RILEY, L. W. Pandemic lineages of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, n. 5, p. 380-390, mai. 2014.

SEDIGHI, M. *et al.* Molecular detection of metallo- β -lactamase gene blaVIM-1 in imipenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from hospitalized patients in the hospitals of Isfahan. **Advanced Biomedical Research.**, v. 4, p. 57, fev. 2015.

SILVA, G. S. *et al.* Avaliação integrada da qualidade de águas superficiais: grau de trofia e proteção da vida aquática nos rios Anil e Bacanga, São Luís (MA). **Engenharia Sanitária Ambiental**, Rio de Janeiro, v. 19, n. 3, p. 245-251, 2014.

SILVA, K. C., LINCOPAN, N. Epidemiologia das betalactamases de espectro estendido no Brasil: impacto clínico e implicações para o agronegócio. **Journal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 48, p. 91-99, abr. 2012.

SOLEIMANI, N. *et al.* Frequency distribution of genes encoding aminoglycoside modifying enzymes in uropathogenic *E. coli* isolated from Iranian hospital. **BMC Research Notes**, v. 7, p. 842, nov. 2014.

SONG, W. *et al.* Antibiotic stress-induced modulation of the endoribonucleolytic activity of RNase III and RNase G confers resistance to aminoglycoside antibiotics in *Escherichia coli*. **Nucleic Acids Research**, v.7, p. 4669-4681, abr. 2014.

SOUTO, M. S. *et al.* Antimicrobial susceptibility and phylotyping profile of pathogenic *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* isolates from calves and pigs in Minas Gerais, Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, v. 49, n. 1, p. 13-23, jan. 2017.

SHARMA, M.; PATHAK, S.; SRIVASTAVA, P. Prevalence and antibiogram of Extended Spectrum β -Lactamase (B-lactamase) producing Gram negative bacilli and further molecular characterization of B-lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 7, n. 10, p.2173-2177, out. 2013.

SU, H.; LIU, Y.; PAN, C.; CHEN, J. Persistence of antibiotic resistance genes and bacterial community changes in drinking water treatment system: From drinking water source to tap water. **Science of the Total Environment**, v. 616-617, p. 453–461, mar. 2018.

PALZKILL, T. Structural and mechanistic basis for extended-spectrum drug-resistance mutations in altering the specificity of TEM, CTX-M, and KPC β -lactamases. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 5, p. 16, fev. 2018.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. USEPA. **Ambient water quality criteria for bacteria**. Environmental Protection Agency, Washington, D.C, 2017.

TROEGER C. *et al.* Estimates of global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of diarrhoeal diseases: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. **Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 9, p. 909-948, jun. 2017.

VAN BOECKEL. *et al.* Global trends in antimicrobial use in food animals. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.112, n. 18, p. 5649–5654, mar. 2015.

VAN DER BIJ, A. K. *et al.* The presence of genes encoding for different virulence factors in clonally related *Escherichia coli* that produce CTX-Ms. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 73, n. 4, p. 297-302, abr. 2012.

WANG, G. F. *et al.* Identification and characterization of the Enterobacter complex causing mulberry (*Morus alba*) wilt disease in China. **European Journal of Plant Pathology**, v. 126, p. 465-478, abr. 2010.

WENDLANDT, A. E.; STAHL, S. S. Quinone-Catalyzed Selective Oxidation of Organic Molecules. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 54, n. 49, p.14638-14658, nov. 2015

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO. **The evolving threat of antimicrobial resistance: options for action, 2012**. Disponível em: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44812/1/9789241503181_eng.pdf. Acesso em: 25 fev. 2018.

WIN, J. R. W. *et al.* **Diagnóstico microbiológico-texto e atlas colorido**. 6.ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

WU J.; LONG S. C.; DORNER, S. M. Are microbial indicators and pathogens correlated? A statistical analysis of 40 years of research. **Journal of Water and Health**, v. 9, n. 2, p.265-278, jun. 2011.

YIGIT, H. *et al.* Novel carbapenem hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from carbapenem-resistant strain of *K. pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 4, p. 1151-1116, abr. 2008.

YAFEI, Y. *et al.* Mechanism for carbapenem resistance of clinical Enterobacteriaceae isolates. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 15, n. 1, p. 1143-1149, jan. 2018.

ZHOU, P. *et al.* New insight into the correlations between land use and water quality in a coastal watershed of China: Does point source pollution weaken it? **Science of the Total Environment**, v. 543, p. 591–600, fev. 2016.

10. APÊNDICE

Apêndice 1: Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos nos isolados identificados no estudo por localidade

Sensibilidade antimicrobinana	JEN	DC	DT	LA
<i>Enterobacter cloacae</i>	17	13	26	9
Não sensíveis				
ASB	16 (94%)	13 (100%)	9(34%)	5 (56%)
ASB, IPM, HODGE +	-	-	2(8%)	-
ASB, MER, HODGE +	-	-	2(8%)	-
ASB, ERT, HODGE +	-	-	13 (50%)	-
GEN	-	-	-	2 (22%)
Sensíveis	1 (6%)	-	-	2 (22%)
<i>Escherichia coli</i>	5	21	2	3
Não sensíveis				
ASB	-	-	-	1 (33%)
ASB, CPM, CXM, CRX, CAZ, CRO, ESBL+	-	2 (10%)	-	-
Sensíveis	5 (100%)	19 (90%)	2 (100%)	2 (67%)
<i>Klebsiella pneumonia</i>	4	13	4	23
Não sensíveis				
ASB, CPM, CXM, CRX, CAZ, CRO, ESBL+	-	1 (7%)	-	-
PPT, ERT, IPM, MER	-	1 (7%)	-	-
Sensíveis	4 (100%)	11 (86%)	4 (100%)	23 (100%)
<i>Citrobacter freundii</i>	3	2	-	1
Não sensíveis				
ASB	-	-	-	1 (100%)
Sensíveis	3 (100%)	2 (100%)	-	-
<i>Citrobacter werkmanii</i>	-	1	-	2
Não sensíveis				
ASB	-	1 (100%)	-	2 (100%)
Sensíveis	-	-	-	-
<i>Cronobacter sakazakii</i>	-	-	-	1
Sensíveis	-	-	-	1 (100%)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	-	1	-	1
Não sensíveis				
ASB	-	1 (100%)	-	1(100%)
Sensíveis	-	-	-	-
<i>Enterobacter gergoviae</i>	-	1 (100%)	-	-
Sensíveis	-	1 (100%)	-	-

<i>Erwinia billingiae</i>				
Sensíveis	-	1 (100%)	-	-
<i>Klebsiella oxytoca</i>				
Sensíveis	2 (100%)	-	-	-
<i>Kluyvera ascorbata</i>				
Sensíveis	2 (100%)	1(100%)	-	-
<i>Kluyvera intermedia</i>				
Sensíveis	-	-	-	1(100%)
<i>Leclercia adecarboxylata</i>				
Sensíveis	-	-	-	1(100%)
<i>Morganella morganii</i>				
Não sensíveis				
ASB	4 (100%)	-	-	-
Sensíveis	-	-	-	-
<i>Pantoea aglomerans</i>				
Não sensíveis				
ASB	-	-	-	1 (50%)
Sensíveis	2 (100%)	2 (100%)	2 (100%)	1 (50%)
<i>Pectobacterium carotovorum</i>				
Não sensíveis				
ASB	-	1 (100%)	-	-
Sensíveis	2 (100%)	-	-	-
<i>Providencia rettgeri</i>				
Não sensíveis				
ASB	10 (100%)	1 (100%)	-	1 (100%)
Sensíveis	-	-	-	-
<i>Serratia marcescens</i>				
Sensíveis	1 (100%)	-	-	2 (100%)
<i>Serratia rubidaea</i>				
Não sensíveis				
ASB	-	1 (100%)	-	-
Sensíveis	-	-	-	1 (100%)
Total de isolados	55	59	35	47

ABS - Ampicilina/Sulbactam; AMI – Amicacina; CAZ – Ceftazidima; CIP – Ciprofloxacino; CPM – Cefepime; CRO – Ceftriaxona; CRX - Cefuroxima/Axetil; CTX – Cefotaxima; CXM – CEFUROXIMA; ERT – Ertapenem; GEN – Gentamicina; IPM- Imipenem; MER – Meropenem; PPT - Piperacilina/Tazobac; TGI- Tigiciclina.