

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Tamara Lobo Oliveira de Albuquerque

**CARACTERIZAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE DE ISOLADOS
BACTERIANOS DE ORIGEM AMBIENTAL E COMUNITÁRIA FRENTE A
DESINFETANTE À BASE DE COMPOSTOS QUATERNÁRIOS DE AMÔNIO E A
ANTIMICROBIANOS**

Rio de Janeiro
2016

Tamara Lobo Oliveira de Albuquerque

**CARACTERIZAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE DE ISOLADOS
BACTERIANOS DE ORIGEM AMBIENTAL E COMUNITÁRIA FRENTE A
DESINFETANTE À BASE DE COMPOSTOS QUATERNÁRIOS DE AMÔNIO E A
ANTIMICROBIANOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito para obtenção do título de Mestre em Vigilância Sanitária

Orientadora: Célia Maria Carvalho Pereira Araujo
Romão

Rio de Janeiro
2016

Catálogo na fonte
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Biblioteca

Albuquerque, Tamara Lobo Oliveira de

Caracterização da susceptibilidade de isolados bacterianos de origem ambiental e comunitária frente a desinfetante à base de compostos quaternários de amônio e a antimicrobianos./ Tamara Lobo Oliveira de Albuquerque – Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2016.

104 f.: il., tab.

Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) – Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional em Controle de Qualidade em Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. 2016.

Orientadores: Célia Maria Carvalho Pereira Araujo Romão

1. Escherichia coli. 2. Klebsiella pneumoniae. 3. Resistência Microbiana a Medicamentos. 4. Esgotos Domésticos. 5. Desinfetantes. 6. Compostos de Amônio Quaternário. I. Título

Characterization of the susceptibility of environmental and community bacterial isolates to a quaternary ammonium disinfectant and antimicrobials

Tamara Lobo Oliveira de Albuquerque

**CARACTERIZAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE DE ISOLADOS
BACTERIANOS DE ORIGEM AMBIENTAL E COMUNITÁRIA FRENTE A
DESINFETANTE À BASE DE COMPOSTOS QUATERNÁRIOS DE AMÔNIO E A
ANTIMICROBIANOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito para obtenção do título de Mestre em Vigilância Sanitária

Aprovado em ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Maria Helena Simões Villas Bôas (Doutor)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde - Fiocruz

Damião Carlos Moraes dos Santos (Doutor)
Universidade Estácio de Sá

Maysa Beatriz Mandetta Clementino (Doutor)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde - Fiocruz

Célia Maria Carvalho Pereira Araujo Romão (Doutor) - Orientadora
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde - FIOCRUZ

Ao meu amado avô Lino Rosa Oliveira
in memoriam, saudades eternas.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por estar sempre presente na minha vida, me dando forças e me direcionando nos caminhos a serem seguidos me mostrando o tão grandioso que é.

Aos meus pais Tâmara e Durval por sempre fazerem o possível e o impossível para me ver feliz me apoiando sempre em todas as decisões tomadas na minha vida e me mostrando sempre qual caminho é o melhor.

Aos meus Avós Lino (*in memoriam*) e Raimunda por tudo que me ensinaram e acredito que no mundo não existam pessoas que eu admire mais.

Ao meu irmão Mateus que sempre me apoiou e deu forças em todas as minhas decisões e atitudes.

Aos meus tios Lilian e Vitor pelo tanto que me ensinaram nessa árdua jornada no Rio de Janeiro, devo muito a vocês pelos ensinamentos dados.

Aos meus primos, Juliana, Mariana, Remi, Sofia, Igor, João Vitor e Lino Henrique, pois com vocês eu aprendi que irmão nem sempre nasce do mesmo pai e da mesma mãe, desde sempre e para sempre meus melhores amigos.

Aos meus tios Polyana e Max, pois sem vocês nem eu nem meus primos saberíamos o sentido de irmandade.

Ao meu amigo Bruno, meu fiel companheiro que esteve presente ao meu lado durante toda essa jornada, me dando força e apoio em todos os momentos.

A minha orientadora Dra. Célia Romão por todos os ensinamentos, todos os valores, por tudo que me ensinou nesse tempo sendo sua aluna, sem dúvidas não existe melhor orientadora.

As minhas amigas que o mestrado me deu a oportunidade de conhecer Daniella, Gabrielle e Maria Luiza, agora nessa nova fase de nossas vidas, estaremos mais fortes e unidas, e agora como colegas de profissão.

Aos meus companheiros de laboratório Maria Helena, Bruna, Karyne, Christiane, Gessy, Priscila, Felipe e Luiza por terem feito todo o possível para me ajudar quando precisei e por terem me mostrado que é possível trabalhar em equipe.

Agradeço a todos os laboratórios do Departamento de Microbiologia do INCQS, em especial aos setores de Meio de Cultura e Esterilização pois sem vocês nada nesse trabalho poderia ter sido realizado

Ao servidor Sergio Alves da Silva pela imensa ajuda com as análises estáticas do presente trabalho.

A todos os meus mestres e professores que me ensinaram tudo que sei.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz e a CAPES pela oportunidade que me foi dada em realizar o Curso.

Obrigada a todos, que me ajudaram, direta ou indiretamente estando ao meu lado, mesmo perto ou longe, mas presentes na minha vida durante esta jornada.

RESUMO

Um dos maiores problemas de saúde pública tem sido o aumento da resistência aos antimicrobianos entre os microrganismos que causam infecções hospitalares e comunitárias. A questão da resistência é ampla e abrange não apenas cepas isoladas a partir de indivíduos, mas também aquelas presentes no meio ambiente. Entre as medidas empregadas para controlar e prevenir a disseminação de microrganismos está o uso de biocidas. A maioria das pesquisas tem como foco o estudo da resistência aos antibióticos no âmbito hospitalar, sendo escassos os estudos com amostras provenientes de indivíduos sadios da comunidade e de efluentes domésticos, considerando não só os antibióticos, mas também uma possível resistência aos biocidas. O objetivo do presente estudo foi avaliar a susceptibilidade de isolados de *Escherichia coli* e *Klebsiella sp* de origem ambiental e comunitária frente a um desinfetante de uso geral à base de compostos quaternários de amônio e a antimicrobianos, incluindo a pesquisa do gene envolvido na diminuição da susceptibilidade bacteriana a biocidas (*qacEΔ1*). As amostras comunitárias foram obtidas a partir de fezes de indivíduos voluntários adultos e sadios, já as cepas de origem ambiental foram obtidas a partir de amostras de esgotos domésticos, de rios, valões, mangue impactados por esgotos e de uma estação de tratamento de esgoto. Foram identificados 35 isolados de origem ambiental (*E. coli*, 22; *K. pneumoniae*, 12 e *K. oxytoca*, 1) e 35 isolados de origem comunitária (*E. coli*, 20 e *K. pneumoniae*, 15), pelo método bioquímico convencional. O perfil de susceptibilidade aos antibióticos foi determinado pelo Método de Difusão de Discos. Entre as cepas de origem comunitária, os maiores percentuais de resistência foram evidenciados em *E. coli* (35% para cefazolina e ampicilina). As cepas ambientais de *E. coli* apresentaram altos percentuais de resistência frente à cefazolina (45%) e imipenem (32%), e as de *K. pneumoniae* frente à ampicilina+sulbactam, cefazolina e imipenem (33% para cada uma das drogas). Quarenta e cinco por cento dos isolados ambientais de *K. pneumoniae* mostraram-se multi-droga resistentes. Foi avaliada a susceptibilidade dos isolados a compostos quaternários de amônio (QAC), através da determinação da Concentração Inibitória Mínima utilizando-se soluções de cloreto de benzalcônio (CBA). Para todos os isolados a CIM variou de 7,82 µg/mL a 62,5 µg/mL, sendo de 31,25 µg/mL para 73% dos isolados. Além disto, 19 isolados foram submetidos ao Método da Diluição de Uso empregando-se um desinfetante de uso geral à base de QAC e todos mostraram-se suscetíveis. O gene *qacEΔ1* foi pesquisado pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase, porém este gene não foi detectado em nenhum dos isolados. Foi evidenciada, nesse estudo, a presença de isolados bacterianos resistentes e multirresistentes aos antibióticos, além de indícios de uma diminuição da susceptibilidade a um composto à base de QAC, em ambientes impactados por esgoto doméstico, porém não foi observada correlação significativa entre a diminuição da susceptibilidade ao biocida e a resistência cruzada aos antibióticos. Os dados mostram que deve existir uma maior preocupação por parte dos órgãos de vigilância em saúde, em especial quanto à vigilância sanitária e ambiental, visando controlar e prevenir a disseminação de microrganismos resistentes aos agentes antimicrobianos que podem pôr em risco a saúde da população.

Palavras-chaves: *Escherichia coli*. *Klebsiella pneumoniae*. Resistência aos antibióticos. Esgoto doméstico. Biocida. Desinfetante. Compostos quaternários de amônio. Vigilância Sanitária.

ABSTRACT

One of the biggest health public problems has been the high level of resistance to antimicrobial drugs among microorganisms that causes hospital and community infections. The issue of resistance is broad and covers not only isolated strains from individuals but also those in the environment. One of the ways to control and prevent dissemination of microorganisms is using biocides. Most of the research has focus on studying of resistance to antibiotics in hospitals. Studies with samples from healthy individuals from community and domestic effluents are scarce considering not only antibiotics, but also a possible resistance to biocides. The objective of this study was to evaluate the susceptibility of *Escherichia coli* and *Klebsiella sp* isolates of environment and community origins to commonly used quaternary ammonium compounds based disinfectant and antibiotics, including the research of the gene involved in decreased bacterial susceptibility to biocides (*qacEΔ1*). Community samples were obtained from feces of healthy adult volunteers, and the environmental strains were obtained from samples of domestic sewage and rivers, wallons, mangrove impacted by sewage. Thirty-five environmental isolates were identified (*E.coli*, 22; *K. pneumoniae*, 12 and *K. oxytoca*, 1), and also 35 community isolates (*E.coli*, 20 and *K. pneumoniae*, 15), by the biochemical conventional method. The antibiotics susceptibility profile was determined by the Disk Diffusion Method. Among the strains of community origin, the highest percentages of resistance was found in *E.coli* (35% to cefazolin e ampicillin). The environmental strains of *E. coli* showed high percentages of resistance to cefazolin (45%) e imipenem (32%) and *K. pneumoniae* to ampicillin + sulbactam, cefazolin and imipenem (33% to each one of the drugs). Forty-five percent of the *K. pneumoniae* environmental isolates were multi-drug resistant. The susceptibility of the isolates to the quaternary ammonium compounds (QAC), was determined by Minimum Inhibitory Concentration using benzalkonium chloride solution (CBA). For all isolates the MIC varied of 7,82 µg/mL to 62,5 µg/mL, being of 31,25 µg/mL to 73% of isolated. Besides, 19 isolated were subjected to the Use Dilution Method with a commonly used QAC based disinfectant, and all of them were susceptible. *qacEΔ1* gene was searched by Polymerase Chain Reaction, but this gene was not detected in none of the isolates. In this study, the presence of resistant and multi-drug resistant bacterial isolates to antibiotics was detected, as well as evidence of a decrease in susceptibility to a QAC based compound, in domestic sewage impacted environment, but there was no significant correlation between decreased susceptibility to biocide and cross-resistance to antibiotics. The data show that there must be a greater concern on the part of health surveillance agencies, in particular as regards sanitary and environmental surveillance in order to control and prevent the spread of resistant microorganisms to antimicrobial agents that can cause risks to population health.

Key-words: *Escherichia coli*. *Klebsiella pneumoniae*. Resistance to antibiotics. Domestic sewage. Biocide. Desinfectant. Quaternary ammonium compounds. Sanitary Surveillance.

LISTA DE FIGURAS E QUADROS

Figura 1 Mecanismos de ação dos antibioticos	26
Figura 2 Representação esquemática de integron de classe 1.....	38
Figura 3 Colônias sugestivas de <i>E. coli</i> (A) e <i>Klebsiella sp.</i> (B) em meios EMB e MacConkey, respectivamente.....	44
Figura 4 Placa de Petri com duas folhas de papel filtro contendo 12 cilindros de aço inoxidável	49
Figura 5 Esquema resumido do Método da Diluição de Uso.....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Mecanismo de ação das principais classes de antibióticos	27
Tabela 2	Exemplos de princípios ativos de produtos desinfetantes	33
Tabela 3	Locais de coleta das amostras ambientais	55
Tabela 4	Amostras comunitárias	56
Tabela 5	Perfis de resistência dos isolados de <i>E. coli</i> ambientais	65
Tabela 6	Perfis de resistência dos isolados de <i>K. pneumoniae</i> ambientais.....	66
Tabela 7	Perfis de resistência dos isolados de <i>E.coli</i> de origem comunitária....	67
Tabela 8	Perfis de resistência dos isolados de <i>K. pneumoniae</i> de origem comunitária	67
.....		
Tabela 9	Concentrações mínimas inibitórias do cloreto de alquil dimetil benzil amônio para os isolados bacterianos multirresistentes aos antibióticos.....	70
Tabela 10	Quantidade de UFC/cilindro nos ensaios para avaliação da susceptibilidade dos isolados de origem ambiental e comunitária frente ao desinfetante de uso geral	71

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Identificação dos isolados bacterianos de origem ambiental e comunitária.....	57
Gráfico 2	Resistência aos antibióticos em isolados de <i>E. coli</i> em amostras ambientais.....	58
Gráfico 3	Resistência aos antibióticos em isolados de <i>K. pneumoniae</i> em amostras ambientais	59
Gráfico 4	Resistência aos antibióticos em isolados de <i>E. coli</i> em amostras comunitárias	60
Gráfico 5	Resistência aos antibióticos em isolados de <i>K. pneumoniae</i> em amostras comunitárias.....	61
Gráfico 6	Avaliação conjunta dos perfis de resistência aos antibióticos em isolados de <i>K. pneumoniae</i> em amostras ambientais e comunitárias.....	62
Gráfico 7	Avaliação conjunta dos perfis resistência aos antibióticos em isolados de <i>E. coli</i> em amostras ambientais e comunitárias.....	63
Gráfico 8	Classificação dos isolados de origem ambiental e comunitária de acordo com a susceptibilidade aos antimicrobianos	64
Gráfico 9	Concentração inibitória mínima do cloreto de alquil dimetil benzil amônio frente aos isolados bacterianos de origem ambiental e comunitária ...	68
Gráfico 10	Concentração inibitória mínima do cloreto de alquil dimetil benzil amônio para isolados de origem comunitária.....	69
Gráfico 11	Concentração inibitória mínima do cloreto de alquil dimetil benzil amônio nos isolados de origem ambiental	69

LISTA DE SIGLAS, ABREVIações E SÍMBOLOS

Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	Association of Official Analytical Chemists (EUA)
ATCC	American Type Culture Collection (EUA)
CBA	Cloreto de alquil dimetil benzil amônio
CEDAE	Companhia de Água e Esgoto do Estado
CEN	Comitê Europeu de Normatização
CLSI	Clinical and Laboratory Standard Institute
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CMRVS	Coleção de Microrganismos de Referência em Vigilância Sanitária
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EEC	Enteroagregativa
EHEC	Enterohemorrágica
EIEC	Enteroinvasora
EMB	Eosina azul de metileno
EN	European Standards (EUA)
EPEC	Enteropatogênica
ESBL	Beta-lactamases de espectro estendido
ETE	Estação de tratamento de esgoto
ETEC	Enterotoxigênica
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
LPS	Lipossacarídeo
mL	Mililitro
NMEC	Meningite neonatal
Pb	Pares de base
PBP	Proteínas ligadoras de peptídeos
PCR	Reação da Cadeia em Polimerase
PDBG	Programa de Despoluição da Baía de Guanabara
QAC	Compostos quaternários de amônio
SCENIHR	Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks
SMR	Small multidrug regulator (EUA)

TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGI	Trato gastrointestinal
TSA	Ágar soja caseína
TSB	Caldo soja tríptica
TSI	Tríplice açúcar ferro
UFC	Unidade Formadora de Colônia
ITUs	Infecções no trato urinário
UPEC	Uropatogênica
°C	Graus Celsius
µg	Micrograma

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 RESISTÊNCIA BACTERIANA A AGENTES ANTIMICROBIANOS.....	16
1.2 MICRORGANISMOS RESISTENTES NO MEIO AMBIENTE	17
1.3 EFLUENTES DOMÉSTICOS	19
1.4 TRATO GASTROINTESTINAL HUMANO.....	21
1.5 ENTEROBACTÉRIAS	21
1.5.2 <i>Klebsiella</i> sp	24
1.6 ANTIBIÓTICOS	25
1.6.1 Classificação e principais mecanismos de ação dos antibióticos.....	25
1.6.2 Mecanismos de resistência bacteriana aos antibióticos	27
1.7 BIOCIDAS	28
1.7.1 Breve histórico sobre a utilização de biocidas.....	29
1.8 DESINFETANTES.....	30
1.8.1 Legislação sobre desinfetantes	31
1.8.2 Avaliação da qualidade dos desinfetantes	32
1.8.3 Avaliação microbiológica	32
1.9 AGENTES QUÍMICOS UTILIZADOS COMO DESINFETANTES	33
1.10 COMPOSTOS QUATERNÁRIOS DE AMÔNIO	34
1.11 MICRORGANISMOS E SUSCEPTIBILIDADE DIMINUÍDA A BIOCIDAS	36
1.12 JUSTIFICATIVA	39
2 OBJETIVO GERAL	41
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
3 METODOLOGIA	42
3.1 ISOLADOS BACTERIANOS	42
3.1.1 Obtenção dos isolados bacterianos ambientais	42
3.1.2 Obtenção das amostras de origem comunitárias	43
3.1.3 Cepas usadas como controle	43
3.1.4 Ética	44
3.2 IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA.....	44
3.2.1 Preservação dos isolados de origem ambiental e comunitária e dos microrganismos de referência	45
3.2.2 Controle dos microrganismos.....	45
3.3 SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIBIÓTICOS	46
3.4 AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE DOS ISOLADOS AMBIENTAIS E DE ORIGEM COMUNITÁRIA A BIOCIDAS	47

3.4.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima.....	47
3.4.2 Avaliação da susceptibilidade dos isolados bacterianos frente ao desinfetante de uso geral.....	48
3.5 PESQUISA DO GENE <i>qacEΔ1</i>	52
3.5.1 Extração do DNA genômico	52
3.5.2 Reação em cadeia da polimerase	52
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	53
4 RESULTADOS.....	54
4.1 AMOSTRAS AMBIENTAIS.....	54
4.2 AMOSTRAS COMUNITÁRIAS	54
4.3 IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA DOS ISOLADOS DE ORIGEM AMBIENTAL E COMUNITÁRIA	54
4.4 TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS.....	57
4.5 AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE DOS ISOLADOS BACTERIANOS FRENTE A BIOCIDAS	67
4.5.1 Concentração Mínima Inibitória.....	67
4.5.2 Avaliação da susceptibilidade dos isolados bacterianos ao desinfetante de uso geral à base de compostos quaternários de amônio.....	70
4.6 PESQUISA DO GENE <i>qacEΔ1</i>	71
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS.....	72
5 DISCUSSÃO	73
6 CONCLUSÕES	87
REFERÊNCIAS.....	89
ANEXO A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE) ...	103

1 INTRODUÇÃO

1.1 RESISTÊNCIA BACTERIANA A AGENTES ANTIMICROBIANOS

A saúde pública, atualmente, vem sofrendo com diversos problemas, sendo um dos maiores o crescente aumento da resistência aos antimicrobianos, presente nos microrganismos que causam infecções hospitalares e comunitárias. Destacam-se os casos de resistência à oxacilina em *Staphylococcus*, à penicilina em *Streptococcus*, à vancomicina em *Enterococcus*, a cefalosporinas e fluoroquinolonas em *Enterobacteriaceae* e resistência aos carbapenêmicos em *P. aeruginosa* (VILLAR et al, 2013). A resistência aos carbapenêmicos em espécies da família *Enterobacteriaceae* tem se tornado um grande desafio para o tratamento de infecções (ROSSI et al, 2015).

O aumento da resistência aos antibióticos tem sido observado não somente no âmbito hospitalar, mas também em amostras microbianas provenientes da comunidade (RICE, 2009). Villar et al (2013), recentemente detectaram isolados bacterianos da família *Enterobacteriaceae* produtores de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL), resistentes aos antibióticos carbapenêmicos em indivíduos com queixas gastrointestinais, sendo que nenhum deles tinha sido hospitalizado nos dois meses anteriores ao estudo. Esses autores sugerem que a vigilância microbiológica, através de estudos com indivíduos saudáveis, é útil para avaliar e monitorar a disseminação de espécies da família *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBL na comunidade.

Os fatores envolvidos na disseminação de resistência em organismos estão presentes em diferentes setores como medicina humana, na comunidade e nos hospitais, na produção animal e agrícola e no meio ambiente. Esses fatores estão também conectados entre si através do uso inadequado de antibióticos nos seres humanos, nos animais e na agricultura. Esse é considerado o principal responsável pela presença de bactérias resistentes no ambiente, sendo um fenômeno global (PRESTINACI et al, 2015).

A disseminação de bactérias resistentes e de genes de resistência depende de diferentes fatores, principalmente, da pressão seletiva devido ao uso de antimicrobianos e à transferência horizontal, na qual há transferência de genes de

resistência entre bactérias por meio de mecanismos como conjugação, transformação e transdução (JERNBERG et al, 2010).

Os genes de resistência podem estar localizados no cromossomo ou em elementos genéticos móveis como plasmídios e transposons. Associados a estes podem estar os integrons, elementos capazes de capturar e expressar cassetes gênicos. Os integrons abrigam inúmeros genes de resistência, permitindo a transferência da resistência entre as bactérias, inclusive entre bactérias comensais (LEVERSTEIN-VAN HALL, 2002, ROE et al, 2003).

A transferência horizontal de genes é um processo amplamente disseminado entre as bactérias e pode ocorrer entre linhagens de uma mesma espécie ou entre diferentes espécies ou gêneros bacterianos. Esse processo é fundamental para aquisição de material genético exógeno e permite uma rápida adaptação do microrganismo a ambientes onde estejam presentes agentes antimicrobianos (LAWRENCE, 1999; CAUMO, 2010).

É válido ressaltar que alguns microrganismos são produtores naturais de antimicrobianos e que a maioria dos antimicrobianos utilizados para tratar infecções é produzida por eles no ambiente, o que significa que os genes de resistência a antimicrobianos não surgem apenas em habitats clínicos (GUIMARÃES et al, 2010).

O impacto clínico da resistência microbiana varia de acordo com o nível de resistência, o local da infecção e a disponibilidade de alternativas terapêuticas eficazes, não tóxicas (RICE, 2009). Atualmente, o foco principal das investigações está voltado para a resistência microbiana em isolados de origem hospitalar (OTEO et al, 2005, VASQUES et al, 2011), entretanto, há necessidade de atenção também com os indivíduos saudáveis, e ainda com os microrganismos presentes nos diversos ambientes, em especial os impactados pela atividade antropogênica.

1.2 MICRORGANISMOS RESISTENTES NO MEIO AMBIENTE

A questão da resistência microbiana aos antibióticos é ampla e abrange não apenas cepas isoladas a partir de indivíduos, mas também microrganismos presentes no meio ambiente. Pesquisas têm demonstrado que o próprio meio ambiente funciona como um grande reservatório de genes de resistência a antimicrobianos. Esta resistência tem sido observada em vários ambientes aquáticos como rios e áreas

costeiras, esgoto hospitalar, sedimentos, águas superficiais, lagos, oceanos e água potável, bem como em solos (BAQUERO et al, 2008, SERVAIS; PASSERAT, 2009). Estudos de Martinez (2003) com isolados bacterianos originados da água do mar mostraram que mais de 90% dos isolados avaliados foram resistentes a pelo menos um antibiótico e 20% eram resistentes a pelo menos cinco drogas. Investigações, no Brasil e na Argentina, evidenciaram a presença de bactérias resistentes em efluentes hospitalares (NUÑEZ; MORETTON, 2007, PRADO et al, 2008, CHAGAS et al, 2011). Amos et al (2014) identificaram em sedimento de um rio no Reino Unido, enterobactérias altamente resistentes, de onde foi detectado o gene *bla*_{CTX-M-15}, que confere resistência a antibióticos beta-lactâmicos, os autores alertam que a situação representa uma ameaça à saúde humana e animal.

A preocupação com o tema vem emergindo também no âmbito doméstico, existindo, porém, atualmente, poucos estudos em relação aos isolados bacterianos provenientes de efluentes de origem domiciliar. A constante introdução de agentes antimicrobianos, detergentes, desinfetantes e resíduos de poluição industrial, como metais pesados, no ambiente, contribuem para a evolução e disseminação de organismos resistentes e/ou multirresistentes (CAUMO, 2010). Existem indícios que o desenvolvimento de resistência antimicrobiana seja favorecido por baixas concentrações de antibióticos dispostos no meio ambiente (SOMENSI, 2013). Segundo Allen et al (2010), a resistência a antibióticos e outros agentes antimicrobianos são de extrema relevância para a saúde humana, mas reservatórios ambientais de determinantes de resistência são pouco compreendidos.

Estudo de Miranda e Castillo (1998) já apontava para resistência bacteriana no ambiente. Esses pesquisadores investigaram a incidência de resistência microbiana em uma espécie de *Aeromonas* isolada de ambientes aquáticos, observando que ocorreu resistência a vários antibióticos testados. Investigação sobre *Escherichia coli* resistente a antibióticos em estações de tratamento de esgoto na Áustria evidenciou resistência a 16 das 24 drogas empregadas (REINTHALER et al, 2003). Em outro estudo, isolados de *Aeromonas* e *Pseudomonas aeruginosa* encontrados em reservatórios de água apresentaram resistência a múltiplos antibióticos (BLASCO; ESTEVE; ALCAIDE, 2008).

Assim sendo, a partir da atividade humana, cepas bacterianas resistentes ou multirresistentes aos antibióticos, descartadas nos esgotos não coletados e não

tratados e até mesmo nos tratados de forma insuficiente, podem trazer risco à saúde pública (MEIRELLES-PEREIRA et al, 2007).

1.3 EFLUENTES DOMÉSTICOS

Um levantamento realizado no ano de 2015, em 111 rios, córregos e lagos de cinco estados brasileiros e do Distrito Federal, utilizando um kit desenvolvido pela Fundação SOS Mata Atlântica, que avalia a qualidade da água dos rios a partir de 16 parâmetros, que incluem níveis de oxigênio, fósforo, pH e aspecto visual, classificou a qualidade das águas em cinco níveis: péssimo, ruim, regular, bom e ótimo. O trabalho revelou que 23,3% destes apresentaram qualidade ruim ou péssima. Os dados foram coletados no período de março de 2014 a fevereiro de 2015, em 301 pontos de coleta distribuídos em 45 municípios. Dos 301 pontos coletados, 186 (61,8%) apresentaram qualidade da água considerada regular, 65 (21,6%) foram classificados como ruins e cinco (1,7%) apresentaram situação péssima. Apenas 45 (15%) pontos de coleta dos rios e mananciais mostraram boa qualidade, todos localizados em áreas protegidas e que contam com matas ciliares preservadas. Nenhum dos pontos analisados foi avaliado como ótimo. No Estado de São Paulo, apenas 4,3% registraram qualidade de água boa, 52,1% foram avaliados com qualidade regular, enquanto que 46 (39,3%) estavam em situação ruim e 4,3% péssima. Já nos municípios do Estado do Rio de Janeiro, 22,3% apresentaram água com boa qualidade, 68,6% estavam em situação regular e 9,1% foram classificadas como ruins. Na Cidade do Rio de Janeiro, os indicadores aferidos revelaram uma piora na qualidade da água. Na área urbana, 33,3% dos pontos coletados apresentaram qualidade regular e os outros 66,7% registraram qualidade ruim. Neste mesmo levantamento realizado em 2014, 60% dos pontos coletados tinham qualidade regular e 40% ruim. Nenhum dos pontos analisados na Cidade do Rio de Janeiro apresentou qualidade boa ou ótima (FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA, 2015).

Cabe ressaltar que em relação ao tratamento dos efluentes domésticos no Brasil, menos de 50% do esgoto é tratado antes de ser disposto no ambiente, representando risco potencial à disseminação de microrganismos, inclusive daqueles apresentando resistência aos antibióticos. Segundo a Secretaria Nacional de

Saneamento Ambiental em um relatório divulgado com base em dados do Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento (SNIS), em relação ao índice de esgoto tratado referido à água consumida, a média do país para o tratamento dos esgotos gerados chegou a 39% e dos esgotos coletados a 69,4% em 2013. De acordo com este mesmo relatório, foi observado que em alguns estados das regiões Norte e Nordeste menos de 10% do esgoto é tratado como por exemplo nos estados do Maranhão (5,85%), Piauí (8,3%), Pará (2,72%), Amazonas (5,63%) (BRASIL, 2014). Esses dados revelam um grande problema no Brasil em relação à coleta e tratamento de esgoto.

No ano de 2013, a quantidade de esgoto coletado no Estado de São Paulo foi de 87%, sendo que apenas 53% desse esgoto eram tratados, ou seja, 34% do esgoto coletado no estado foram despejados sem tratamento algum em rios, córregos e lagos (INSTITUTO TRATA BRASIL, 2013).

No Município do Rio de Janeiro, segundo a Companhia de Água e Esgoto do Estado (CEDAE), a capacidade da rede coletora foi ampliada para 2.500 litros de esgotos por segundo, o que permitiu o aumento da quantidade de esgotos tratados do município de 40% para 60%, sendo esta a maior e mais importante obra do Programa de Despoluição da Baía de Guanabara (PDBG). Desta forma, 40% do esgoto ainda chegam à Baía de Guanabara sem tratamento (ESTADO DO RIO DE JANEIRO, 2014).

A composição do esgoto inclui materiais orgânicos biodegradáveis; outras substâncias químicas como detergentes, agrotóxicos, óleos, gorduras e graxa; solventes; nutrientes como nitrogênio, fósforo e amônia; metais pesados (mercúrio, chumbo, cobre, níquel); outros materiais inorgânicos e microrganismos como vírus, bactérias, protozoários e helmintos. As concentrações de *E. coli* no esgoto doméstico podem atingir 5×10^8 microrganismos/100 mL e de coliformes, 10^{13} microrganismos/100 mL (HENZE; COMEAU, 2008).

Portanto, um importante indicador de contaminação em ambientes e efluentes aquáticos é a presença dos microrganismos pertencentes à família das *Enterobacteriaceae* nestes locais, denotando contaminação de origem fecal. Dentre as enterobactérias, a *E. coli* e as bactérias do gênero *Klebsiella* destacam-se como agentes etiológicos não só de infecções hospitalares como também de infecções comunitárias (DROPA et al, 2010).

1.4 TRATO GASTROINTESTINAL HUMANO

O trato gastrointestinal (TGI) humano é povoado por microrganismos comensais e simbióticos, na maioria por bactérias, mas também fungos, arquea e vírus, abrigando dez vezes mais bactérias que o número de células que formam nosso organismo (MORAES et al, 2014).

Calcula-se que existam aproximadamente cerca de mil espécies, distribuídas em mais de 50 filos diferentes na microbiota intestinal. Estudos de metagenômica mostram que na microbiota humana há cerca de 3,3 milhões de genes diferentes, 150 vezes mais que o genoma humano (QIN et al, 2010).

Na maioria dos indivíduos, cerca de 90% dos filos encontrados no intestino são Firmicutes e Bacteroidetes, sendo o restante composto por Actinobacterias (família *Bifidobacteriaceae*) e Proteobacterias (família *Enterobacteriaceae*). Cada indivíduo apresenta uma composição bacteriana distinta, sendo em parte definidas geneticamente e em outra por características individuais e ambientais (idade, hábitos alimentares e modo de nascimento) o que resulta numa grande variabilidade (QIN et al, 2010, ARUMUGAM et al, 2011, HUTTENHOWER et al, 2012, DE FILIPPO et al, 2010).

1.5 ENTEROBACTÉRIAS

A família *Enterobacteriaceae* é constituída por um grande grupo de bastonetes Gram-negativos, medindo em geral 0,3-1,8 µm, não esporulados, com motilidade variável, fermentadores de glicose com ou sem a formação de gás. Estes microrganismos podem ser imóveis ou móveis (flagelos peritríquios), crescem na presença ou ausência de oxigênio, em sua maioria são catalase positiva e reduzem o nitrato a nitrito. A maioria das espécies se desenvolve bem à temperatura de 37°C, entretanto existem algumas exceções onde algumas espécies têm temperatura ótima de cultivo entre 25 e 30°C. São frequentemente encontradas no solo, água, frutas, vegetais, animais e nos seres humanos (SCHEUTZ; STROCKBINE, 2005, MURRAY et al, 2009).

As espécies que fazem parte desta família são potencialmente patogênicas para os seres humanos, animais e insetos. Inúmeras espécies causam doenças diarreicas incluindo febre tifoide e disenteria bacilar, porém muitas espécies não estão associadas a doenças, mas são frequentemente referenciadas como patógenos oportunistas. As enterobactérias são agentes etiológicos de uma variedade de infecções extra intestinais incluindo bacteremia, meningite, feridas e infecções do trato respiratório e urinário, sendo as mais frequentemente encontradas na prática médica como causadoras de infecções *E. coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus* e *Serratia* (MURRAY et al, 2009).

1.5.1 *Escherichia coli*

O gênero *Escherichia* abrange seis espécies (*Escherichia albertii*, *Escherichia blattae*, *Escherichia coli*, *Escherichia fergusonii*, *Escherichia hermannii* e *Escherichia vulneris*). Dessas seis espécies, *E. coli* é a mais frequentemente isolada em espécimes humanos. *E. coli* é habitante normal do intestino humano e é uma das espécies bacterianas mais conhecidas e mais frequentemente isoladas a partir de amostras clínicas. Pertence à microbiota entérica de mamíferos e aves, crescendo em temperaturas de 18 a 44°C, sendo 37°C a temperatura ideal de cultivo (NATARO et al, 2011).

É um organismo bem caracterizado fenotipicamente por suas propriedades bioquímicas, sendo positiva para reação para indol, lisina, motilidade e reação de vermelho metila e negativa para testes de produção de urease e utilização do citrato como única fonte de carbono. Além disso, algumas cepas podem produzir H₂S. A grande maioria das estirpes é capaz de fermentar lactose. Suas colônias apresentam cerca de 1 a 3 mm de diâmetro tanto com aspecto rugoso quanto liso, no entanto podem existir colônias intermediárias e mucóides. Colônias rugosas têm aspecto grosseiro e contornos irregulares, já as colônias lisas são convexas, brilhantes e com bordos regulares (QUINN et al, 2005, SCHEUTZ; STROCKBINE, 2005, NATARO et al, 2011).

Grande parte das cepas de *E. coli* são comensais, porém, mesmo cepas comensais podem conter um ou mais fatores de virulência com potencial de causar doenças principalmente em indivíduos imunodeprimidos. Algumas linhagens de *E. coli* podem ser patogênicas específicas, recebendo, nesses casos, a denominação genérica de *E. coli* enterovirulenta. De acordo com a natureza da infecção e da sua patogenicidade podem ser: 1) *E. coli* invasora (EIEC) - microrganismos dessa estirpe são, em geral, inócuos em seu habitat mas podem causar problemas se alcançarem outros sítios do hospedeiro, estando associados a infecções intestinais moderadas; 2) *E. coli* enteropatogênica (EPEC) - microrganismo dessa estirpe podem provocar lesões na mucosa do trato intestinal, causando gastroenterites agudas, principalmente em recém-nascidos e em crianças de até dois anos de idade; 3) *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) – embora essa estirpe não tenha capacidade de invadir a mucosa intestinal, pode produzir enterotoxinas que atuam na membrana das células epiteliais causando diarreia aquosa abundante (semelhante à provocada pela cólera); 4) *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) - essa estirpe está associada à enterocolite hemorrágica em indivíduos de todas as idades, porém o mecanismo de patogenicidade ainda não está bem esclarecido. Existem ainda as estirpes *E. coli* enteroagregativa (EAEC), associada a quadros diarreicos em viajantes e diarreias epidêmicas; a estirpe *E. coli* uropatogênica (UPEC), ligadas a infecções do trato urinário, e as causadoras de meningite neonatal (NMEC) (MURRAY et al, 2009, NATARO et al, 2011

E. coli é o agente etiológico mais comum de bacteremias que afetam principalmente indivíduos idosos, além de ser um dos causadores mais frequentes em casos de meningite em recém-nascidos. A maioria das infecções no trato urinário (ITUs) em jovens e mulheres saudáveis são causadas por esse microrganismo. A morbidade global e as taxas de mortalidade devido a infecções causadas por *E. coli* é substancial e crescente (POOLMAN; WACKER, 2015).

1.5.2 *Klebsiella* sp

O gênero *Klebsiella* abrange doze espécies: *Klebsiella granulomatis*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae subsp. ozaenae*, *Klebsiella pneumoniae subsp. rhinoscleromatis*, *Klebsiella michiganensis*, *Klebsiella mobilis*, *Klebsiella quasipneumoniae*, *Klebsiella quasipneumoniae subsp. quasipneumoniae*, *Klebsiella quasipneumoniae subsp. similipneumoniae*, *Klebsiella singaporensis*, e *Klebsiella variicola* (LPNS, 2015).

As bactérias desse gênero estão presentes na água, esgoto e solo e em mucosas dos seres humanos e animais. Nos humanos são encontradas nos tratos gastrintestinal, respiratório e geniturinário. São bactérias imóveis possuindo uma proeminente capsula de polissacarídeos. As propriedades bioquímicas incluem reação de oxidase negativa, fermentação da glicose, redução nitrato, lisina positiva, não produzem indol, não descarboxilam a ornitina, metabolizam a lactose, utilizam o citrato como fonte de carbono e também hidrolisam a ureia (MURRAY et al, 2009).

As infecções causadas por *Klebsiella* sp. costumam atingir principalmente indivíduos imunodeprimidos. Dentre as infecções clínicas mais frequentes causadas por microrganismos desse gênero podemos destacar a pneumonia, infecções do trato urinário e de feridas, bacteremia, rinite crônica atrófica, artrites, enterites, meningites em crianças e sepse (SANTOS, 2007).

Sua virulência está associada à um grande número de fatores incluindo adesinas fimbriais, sideróforos, antígenos O e K ou capsulares. A presença de cápsula polissacarídica é considerada o principal fator de virulência, sendo reportados pelo menos 77 distintos tipos capsulares polissacarídicos que contribuem para a patogênese através da resistência à fagocitose e à ação de fatores bactericidas no soro. A cápsula atua também na proteção contra dessecação e aderência, além de ser responsável pelo fenótipo mucoide da colônia e pelo sistema de captação de ferro (SCHEMBRI et al. 2005; ROSEN et al. 2008; SCARPATE; COSSATIS, 2009).

A espécie *K. pneumoniae*, é uma das mais importantes causas de infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) e infecções comunitárias. O número de surtos hospitalares causados por *K. pneumoniae* é cada vez maior devido à mudança no padrão de sensibilidade aos antimicrobianos (MARRA, 2002, SCARPATE;

COSSATIS, 2009). Estudos recentes em cepas envolvidas em infecções hospitalares revelaram altos percentuais de resistência (CHANG et al, 2015, PHU et al, 2016).

Atualmente, a maior preocupação, porém, está nas estirpes de *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemases pois essas enzimas são responsáveis pela resistência a todos os antibióticos β -lactâmicos disponíveis. Uma das principais enzimas encontradas é a KPC carbapenemase que tem sido detectada também em outras enterobactérias (BLAIR, 2015).

1.6 ANTIBIÓTICOS

Os antibióticos são compostos que podem ser produzidos a partir do metabolismo de alguns microrganismos ou serem sintetizados total ou parcialmente em laboratórios. Eles podem ser classificados como bactericidas, quando causam a morte da bactéria, ou bacteriostáticos, quando promovem a inibição do crescimento microbiano (WALSH, 2003, GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

Cada antibiótico está associado a um espectro particular de ação. Esse espectro de atividade está relacionado ao número de diferentes espécies de microrganismos que são sensíveis a esse fármaco. Os antibióticos de amplo espectro são aqueles ativos para muitas espécies de bactérias enquanto os de baixo espectro são ativos para poucas espécies de bactérias (KESTER, 2008).

1.6.1 Classificação e principais mecanismos de ação dos antibióticos

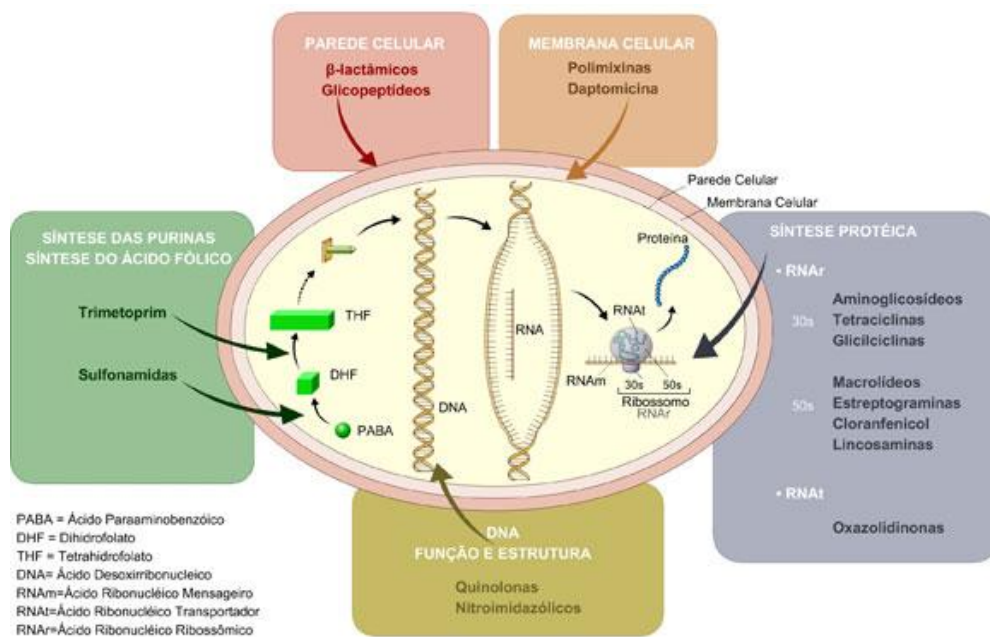
A classificação dos antibióticos, mais comum, é feita com base em seu mecanismo de ação, sendo os principais (BRASIL, 2007b, KOHANSKI; DWYER; COLLINS, 2010) (**Figura 1**):

- Inibição da síntese da parede celular bacteriana;
- Interferência na membrana citoplasmática;
- Inibição da síntese de proteína;
- Bloqueio da síntese de DNA bacteriano, inibindo a DNA girase.

Os antibióticos são divididos em diversas classes como: beta-lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas, carbapeninas, oxapeninas e monobactams), quinolonas, glicopeptídeos, oxazolidinonas, aminoglicosídeos, macrolídeos, tetraciclina, lincosamidas, nitroimidazólicos, cloranfenicol, estreptograminas, sulfonamidas, lipopeptídeos, glicilciclina, polimixinas, gemifloxacina (**Tabela 1**) (BRASIL, 2007b; GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

Os antibióticos beta-lactâmicos ocasionam alterações na morfologia celular que são associadas à interação da droga com as proteínas ligadoras de peptídeos (PBP). Geralmente, os inibidores de PBP1 causam alongamento e são potentes causadores de lise celular. Já os inibidores de PBP2 alteram a morfologia celular, mas não causam lise (KOHANSKI; DWYER; COLLINS, 2010).

Figura 1 – Mecanismos de ação dos antibióticos



Fonte: BRASIL, 2007b.

Tabela 1 – Mecanismo de ação das principais classes de antibióticos

Classes de Antibióticos	Mecanismo de ação
Beta-lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas, carbapeninas, monobactamas)	Inibição da formação de ligação cruzada entre cadeias de peptidoglicano, impedindo a formação correta da parede celular bacteriana.
Oxapeninas, sulfoxapeninas	Inibição da enzima de resistência bacteriana, que degrada antibióticos beta-lactâmicos.
Macrolídeos, lincosamidas, estreptograminas cloranfenicol, oxazolidinonas	Inibição da síntese proteica bacteriana.
Aminoglicosídeos, tetraciclina	Inibição da síntese proteica bacteriana.
Glicopeptídeos	Inibição da síntese do peptidoglicano, alterando a permeabilidade da membrana citoplasmática e interferindo na síntese de RNA citoplasmático; inibe a síntese da parede celular bacteriana.
Lipopeptídeos	Afetam a permeabilidade da membrana bacteriana e bloqueiam a síntese de ácido lipoteicoico, componente da membrana externa de bactérias Gram-positivas
Polimixina	Afetam a permeabilidade da membrana bacteriana por facilitarem o movimento descontrolado de íons através da membrana.
Quinolonas	Bloqueio da replicação e reparo do DNA.
Sulfonamidas	Bloqueio da formação de cofatores do ácido fólico, importantes para síntese de ácidos nucleicos.

Fonte: adaptado de: GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010, BRASIL, 2007b, WALSH 2003.

1.6.2 Mecanismos de resistência bacteriana aos antibióticos

A resistência bacteriana aos agentes antimicrobianos pode ser intrínseca ou adquirida. A resistência intrínseca ocorre quando todas as cepas bacterianas da mesma espécie são inerentemente resistentes a alguma ou algumas classes de

antibióticos, o que permite que essas bactérias levem vantagem e sobrevivam caso entrem em contato com algum antibiótico destas classes, ou seja, é uma característica natural do microrganismo, fazendo parte da sua herança genética (DEL FIOLE; MATTOS FILHO; GROppo, 2000, BLAIR et al, 2015).

Já no caso da resistência adquirida, esta ocorre quando há o aparecimento de resistência em uma espécie microbiana, que era anteriormente sensível ao antibiótico em questão. É uma característica antes não expressada na espécie microbiana e que que não fazia parte da sua herança genética. O aparecimento dessa nova característica é resultado de alterações estruturais e/ou bioquímicas da célula bacteriana, determinada por mutações cromossômicas ou extra cromossômicas (plasmídeos), permitindo não só a transmissão vertical hereditária, mas também a disseminação horizontal a outras espécies bacterianas. Assim, uma espécie bacteriana pode adquirir resistência a um ou mais antibióticos, sem ao menos ter entrado em contato com os mesmos (BLAIR et al, 2015).

Como já referido, o uso excessivo de antibióticos nas mais diversas áreas, como medicina humana, veterinária e agricultura, pode levar a seleção de células microbianas alteradas devido à pressão seletiva pelo uso exagerado e inadequado de antibióticos (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010, CARNEIRO et al, 2011).

Os microrganismos desenvolvem mecanismos de resistência que impedem os antibióticos de exercerem sua ação através de mecanismos que incluem: produção de enzimas com propriedades de clivar, de quebrar ou ainda de promover alterações estruturais na molécula da droga tornando-a inativa contra aquele microrganismo; modificações nas porinas da parede celular que impedem a entrada de certos antibióticos; alteração da proteína alvo modificando sua função ou produzindo enzimas diferentes; aumento da expressão de bombas de efluxo, ocasionando o bombeamento da droga para o exterior da célula (DRAWZ; BONOMO, 2010).

1.7 BIOCIDAS

Os biocidas englobam agentes químicos com atividade antisséptica, desinfetante/esterilizante e/ou preservativa. São utilizados para uma variedade de finalidades, externamente sobre a pele e mucosas (antissépticos), sobre objetos e

superfícies inanimadas (desinfetantes) ou incorporados a produtos farmacêuticos, cosméticos e outros para prevenir a contaminação microbiana (conservantes) (RUSSELL, 2003).

Os biocidas têm sido utilizados em diferentes formas por séculos, inicialmente de maneira empírica como o uso de cobre e prata em vasilhames para estocar água e vinagre para limpar feridas. Muitos foram introduzidos nos séculos XIX e XX (hipoclorito de sódio, cresóis, quaternário de amônio, clorexidina) e vêm sendo utilizados de forma rotineira em muitas áreas até a atualidade. Desempenham um papel relevante nesse contexto, atuando de forma a minimizar ou mesmo impedir a proliferação de microrganismos (BLOCK, 2001, RUSSELL, 2002b).

1.7.1 Breve histórico sobre a utilização de biocidas

Um dos primeiros relatos sobre desinfecção pode ser observado no livro de Homero “A Odisseia”, onde citava para desinfecção e preservação de frutas secas e sucos de frutas, o enxofre, na forma de dióxido de enxofre (aproximadamente 800 a.C.). O enxofre também foi utilizado na idade média durante as grandes epidemias e ainda hoje é empregado (BLOCK, 2001).

A cidade de Veneza foi uma das pioneiras em controle sanitário, quando instituiu, em 1438, a fumigação de cargas de navios e da correspondência, a fim de evitar a disseminação de doenças (BLOCK, 2001).

Anton Van Leeuwenhoek (1676), em um de seus experimentos observou o efeito letal de diversas substâncias inclusive o vinagre, sobre o que ele denominava pequenos animais (BLOCK, 2001).

Em 1750, um médico inglês, publicou três artigos comparando a resistência à putrefação devido à aplicação de substâncias às quais chamou de antissépticos. O conhecimento dos desinfetantes químicos explodiu no século XVIII, com a descoberta do cloro, em 1774, seguida pela descoberta dos hipocloritos em 1789 (BLOCK, 2001).

No século XIX Lister e Semmelweis demonstraram em seus experimentos que agentes químicos poderiam prevenir doenças, o primeiro utilizado foi o fenol como antisséptico pré-cirúrgico e o último empregando água clorada para lavagem de mãos

previamente ao trabalho em obstetrícia, reduzindo significativamente a morte de recém-nascidos por febre puerperal (BLOCK, 2001).

Louis Pasteur (1864) mostrou que eram os microrganismos os responsáveis por doenças infecciosas. Ele desenvolveu o método físico, denominado pasteurização, ainda hoje utilizado na higienização de produtos alimentícios (BLOCK, 2001, RUSSEL, 2004).

Kroning e Paul, em 1897, introduziram o conhecimento científico e moderno sobre a dinâmica de desinfecção química, fundamentando os princípios básicos para a avaliação da atividade dos desinfetantes (BLOCK, 2001, RUSSEL, 2004). Já no século XX, muitas substâncias têm sido descritas para serem utilizadas como biocidas em desinfecção, esterilização e antissepsia (ROMÃO, 2010).

1.8 DESINFETANTES

Os desinfetantes são produtos com a capacidade de destruir todos os microrganismos patogênicos, mas não necessariamente todas as formas microbianas esporuladas, presentes em objetos e superfícies contaminadas (BRASIL, 2007a). Esses produtos são amplamente empregados no ambiente domiciliar, em locais públicos como escolas, instituições e em hospitais.

Algumas características são consideradas altamente importantes para o uso e aplicação desses produtos, como por exemplo: devem possuir um amplo espectro de ação; serem ativos na presença de matéria orgânica; serem compatíveis com sabões, detergentes e outros produtos químicos; possuírem baixa toxicidade; serem compatíveis com diversos tipos de materiais (não serem corrosivos em superfícies metálicas e não devem causar deterioração de borrachas, plásticos e outros materiais); serem inodoros ou de odor agradável; estáveis à temperatura ambiente; econômicos; não poluentes; estáveis em concentração original ou quando diluídos (BLOCK, 2001).

Os procedimentos de desinfecção têm como finalidade impedir ou interromper a disseminação de microrganismos, principalmente os potencialmente patogênicos, de forma a evitar que esses organismos alcancem indivíduos suscetíveis, quebrando o ciclo de transmissão de agentes infecciosos (BRASIL, 2007a).

1.8.1 Legislação sobre desinfetantes

Os desinfetantes são categorizados no Brasil como produtos saneantes com ação antimicrobiana. Os saneantes são substâncias ou preparações destinadas à higienização de objetos inanimados e/ou ambientes domiciliares, coletivos e/ou públicos, tanto para fins domésticos, quanto para fins profissionais, em lugares de uso comum e no tratamento de água (BRASIL, 1976).

Esses produtos são submetidos à Resolução RDC N° 59, de 17 de dezembro 2010, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) (BRASIL, 2010a), que estabelece normas e procedimentos referentes ao registro de produtos descritos como saneantes domissanitários. Esta Resolução estabelece que as empresas que são legalmente autorizadas a produzir ou importar esses produtos estão sujeitas a verificação do cumprimento das Boas Práticas de Fabricação e Controle. O registro é efetuado levando-se em conta a avaliação e o gerenciamento do risco, devendo ser considerados os seguintes itens: a) toxicidade das substâncias e suas concentrações no produto; b) finalidade e condições de uso dos produtos; c) ocorrência de problemas antecedentes; d) população provavelmente exposta; e) frequência de exposição e sua duração; f) formas de apresentação. Os saneantes podem ser categorizados em quatro grandes grupos: os produtos para limpeza e afins (detergentes, sabões, limpadores, ceras, etc), os saneantes com ação antimicrobiana (desodorizantes, desinfetantes, esterilizantes químicos) os desinfestantes (inseticidas, raticidas, etc) e os produtos biológicos de uso domissanitário (à base de microrganismos).

Os desinfetantes são regulamentados no Brasil pela Resolução RDC Anvisa n° 14 de 2007 (produtos de uso geral, indústria alimentícia, usos específicos e desinfetante hospitalar para superfícies e roupas) (BRASIL, 2007a) e pela Resolução RDC Anvisa n° 35 de 2010 (para desinfetantes de uso hospitalar em artigos e instrumentos médicos) (BRASIL, 2010b). Essas Resoluções estabelecem as definições, classificação, composição, apresentação, comprovação da eficácia, avaliação toxicológica, rotulagem, relatórios técnicos para o registro.

1.8.2 Avaliação da qualidade dos desinfetantes

O controle da qualidade dos desinfetantes abrange análises químicas, toxicológicas, microbiológicas e de rótulo. Na análise química são realizados ensaios para a determinação do teor de princípio ativo e do pH. A avaliação toxicológica envolve, entre outros, a realização dos ensaios de irritação dérmica e ocular. A avaliação microbiológica, no caso dos desinfetantes, inclui a comprovação da eficácia de acordo com a classificação dos produtos. A avaliação do rótulo é feita com base na legislação geral e nos regulamentos técnicos específicos para cada categoria de produto (BRASIL, 2007a; 2010).

1.8.3 Avaliação microbiológica

A análise microbiológica de desinfetantes tem como objetivo comprovar a eficácia do produto para a finalidade a que se destina.

Existem diversos tipos de métodos para avaliar a atividade antimicrobiana dos desinfetantes, onde os microrganismos teste podem estar em suspensão (ensaios em suspensão) ou sobre superfícies, como discos e cilindros de aço inoxidável, lâminas de vidro, etc (ensaios com carreadores). Vários métodos da *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) preconizam o uso de carreadores, como o Método da Diluição de Uso, onde são empregados cilindros de aço inoxidável (TOMASINO, 2012). Esse método é um dos mais utilizados, porém a sua reprodutibilidade entre laboratórios é problemática, necessitando uma alta padronização (LAMBERT, 2004b)

No Brasil, segundo a Resolução RDC Anvisa nº 14 de 2007, a comprovação da eficácia dos produtos desinfetantes deve ser realizada mediante a metodologia da AOAC ou métodos adotados pelo Comitê Europeu de Normatização (CEN). No caso dos desinfetantes de uso geral, a comprovação deve ser realizada frente a cepas de referência de *Staphylococcus aureus* e *Salmonella enterica*, e aqueles a serem empregados na desinfecção de superfícies em estabelecimentos de assistência à saúde devem ainda ser avaliados frente a *P. aeruginosa* (BRASIL, 2007a).

As cepas de referência de *S. aureus* e *S. enterica* representam dois grandes grupos de microrganismos. O *S. aureus* é um coco Gram-positivo e a *S. enterica* um

bastonete Gram-negativo da família das enterobactérias. Estas cepas são potencialmente patogênicas, principalmente para indivíduos mais susceptíveis a infecções, como idosos, crianças recém-nascidas além de indivíduos imunodeprimidos.

1.9 AGENTES QUÍMICOS UTILIZADOS COMO DESINFETANTES

Diversos agentes químicos são utilizados como princípios ativos de produtos desinfetantes, como etanol, glutaraldeído, peróxido de hidrogênio e cloreto de benzalcônio (**Tabela 2**).

Tabela 2 – Exemplos de princípios ativos de produtos desinfetantes

Grupo Químico	Exemplos
Álcoois	Etanol Isopropanol
Aldeídos	Glutaraldeído Formaldeído*
Agentes liberadores de halogênios	Compostos de cloro Compostos de iodo
Peroxigênios	Peróxido de hidrogênio Ácido peracético
Compostos fenólicos	Fenol Cresol
Compostos à base de Quaternário de amônio	Cetrimida Cloreto de benzalcônio

*Proibido para uso

Fonte: ROLLIN, 2012

Os mecanismos de ação através dos quais esses ativos afetam a viabilidade celular microbiana são variáveis. O álcool etílico atua principalmente causando danos à membrana plasmática e desnaturando proteínas; o glutaraldeído causa danos à parede celular e na função de diversas enzimas celulares; os compostos de cloro afetam o DNA e a respiração celular; os compostos de iodo afetam enzimas, nucleotídeos e ácidos graxos; o peróxido de hidrogênio e ácido peracético agem como

um oxidante, liberando radicais livres que afetam componentes celulares, incluindo lipídeos, proteínas e DNA; já os compostos quaternários de amônio (QAC) agem na parede celular e membrana plasmática (MCDONNELL; RUSSELL, 1999).

Alguns desses compostos têm sido amplamente utilizados em diferentes campos como indústria de alimentos, hospitais, domiciliar, como por exemplo os produtos à base de ácido peracético e os compostos quaternários de amônio. O ácido peracético é um agente oxidante muito forte, oxidando qualquer grupo-SH (por exemplo, de proteínas) exposto na superfície microbiana levando à lise celular. Os compostos quaternários de amônio são detergentes catiônicos que agem causando danos físicos e não químicos uma vez que as moléculas não reagem entre si mas funcionam como trocadores de íons, ocasionando danos físicos (WESSELS; INGMAR, 2013).

1.10 COMPOSTOS QUATERNÁRIOS DE AMÔNIO

Entre os produtos mais utilizados para desinfecção estão aqueles à base de compostos quaternários de amônio (QAC), existindo inúmeras marcas no mercado. Os QAC são detergentes catiônicos amplamente empregados no controle da disseminação de microrganismos em ambientes de assistência à saúde, industriais e domésticos. Esses compostos têm sido usados para uma variedade de finalidades médicas, farmacêuticas e para outras finalidades (RUTALA; WEBER, 2013).

Esses compostos têm seu mecanismo de ação bactericida atribuído a sua molécula catiônica. Em princípio, a célula bacteriana é lesada por causa da longa cadeia alquila que permeia a membrana, rompendo sua estrutura física e propriedades bioquímicas enquanto o nitrogênio permanece na superfície da membrana rompendo o equilíbrio iônico. Os QAC também possuem alvos intracelulares, atuando na inativação de enzimas responsáveis pelos processos de produção de energia, desnaturação de proteínas celulares essenciais e ainda se ligando ao DNA (LAMBERT, 2004a, WIDMER; FREI, 2011, WESSELS; INGMAR, 2013).

A atividade antimicrobiana dos QAC foi descrita em 1915 por Jacob et al e a partir de 1935, Domagk estabeleceu a utilidade desses compostos não só como

desinfetantes hospitalares, mas também para outras áreas (RUSSELL, 2004). Os QAC apresentam um átomo de nitrogênio do grupo amônio com quatro substituintes, sendo radicais alquila ou arila, e um quinto substituinte que mais frequentemente é um haleto. As substituições ao nitrogênio quaternário resultam numa diversidade de compostos com grau variado de atividade antimicrobiana, dependente do tamanho e tipo dos radicais. O cloreto de benzalcônio [N-alkil (C14 50%, C12 40%, C16 10%)] foi o primeiro composto a ser comercializado e continua a ser empregado atualmente. Várias gerações desses compostos têm sido desenvolvidas através de alterações das cadeias de carbono, com o objetivo de aumentar a atividade antimicrobiana, mantendo a baixa toxicidade (LAMBERT, 2004b, TEZEL; PAVILOSTHATIS, 2015).

Em geral os QAC são muito efetivos para bactérias Gram-positivas e menos efetivos para bactérias Gram-negativas; isso se dá pela presença de membrana externa, de natureza lipoproteica, que irá agir como uma espécie de barreira, limitando a entrada de muitos agentes antimicrobianos. Algumas bactérias Gram-negativas têm apresentado um alto nível de resistência a muitos antissépticos e desinfetantes, como *P. aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* e *Proteus spp*, havendo ainda relatos de sobrevivência de *Serratia marcescens* em clorexidina, *P. aeruginosa* e *B. cepacia* em soluções à base de iodo (WESSELS; INGMAR, 2013).

A maior resistência das bactérias Gram-negativas parece ser desencadeada devido à alguma adaptação fisiológica em resposta à mudança no meio ambiente, principalmente com alterações na membrana externa das células. Em *P. aeruginosa* já foram descritas mudanças na composição do lipossacarídeo (LPS) e aumento no conteúdo de ion Mg⁺, que fortalece as ligações entre os LPS. Além disso, a presença de porinas de baixa eficiência impede a difusão de moléculas para o interior da célula. Em *B. cepacia*, o alto conteúdo de arabionose ligado ao fosfato no seu LPS parece diminuir a afinidade da membrana externa às moléculas catiônicas (MCDONELL; RUSSELL, 1999).

Nas concentrações usualmente utilizadas, os QAC apresentam baixa toxicidade, porém se utilizados de forma incorreta podem causar irritação e sensibilização da pele. São comumente utilizados em formulações de desinfetantes de uso geral, institucional e hospitalar para superfícies fixas. Sua aplicação é recomendada para desinfecção de superfícies não críticas, como piso, móveis e paredes, além de serem apropriados para desinfecção de superfícies e equipamentos em áreas relacionadas com alimentos (ROMÃO, 2010; TEZEL; PAVILOSTHATIS, 2015).

Os QAC são amplamente utilizados como componentes ativos em desinfetantes, amaciantes, entre outros produtos e por isso são descartados em grande quantidade através de esgotos sanitários e de águas servidas. Esses compostos foram detectados em altas concentrações em ambientes impactados com esgoto, o que pode afetar as comunidades microbianas ou até mesmo levar à seleção e disseminação de elementos genéticos contendo determinantes de resistência aos QAC (LI; BROWNAWELL, 2010).

1.11 MICRORGANISMOS E SUSCEPTIBILIDADE DIMINUÍDA A BIOCIDAS

Assim como ocorre com o crescente aumento de bactérias resistentes aos antibióticos, questionamentos a respeito da resistência ou diminuição da susceptibilidade de microrganismos a biocidas têm despertado grande interesse por parte dos pesquisadores. Uma das questões é se a introdução de biocidas nas diversas áreas: médica, domiciliar, na indústria de alimentos, cosméticos e outras desempenha algum papel na seleção de bactérias antibiótico-resistentes.

Os QAC são biodegradáveis em condições aeróbicas e por isso suas concentrações são flutuantes nos ambientes. Como resultado disso, microrganismos são expostos aos QAC, dinamicamente, em diferentes faixas de concentração (não inibitória, subinibitória e acima da concentração inibitória). Geralmente as concentrações de QAC são abaixo das concentrações inibitórias.

Quando em um ambiente com grande diversidade microbiana (como esgotos domésticos e outros efluentes) ocorrem concentrações subinibitórias de QAC, esses ambientes tornam-se seletivos resultando na emergência e disseminação de uma população microbiana resistente ou com susceptibilidade diminuída aos QAC, entre diferentes gêneros bacterianos que podem incluir patógenos humanos (TEZEL; PAVILOSTHATIS, 2015).

Desta forma, isolados bacterianos ambientais que em muitas situações sofrem ação de produtos desinfetantes e de outros agentes antimicrobianos (exemplo: amaciantes de roupas), em efluentes de esgoto doméstico, por exemplo, poderiam apresentar resistência a antibióticos e biocidas.

Muitas rotas e mecanismos de resistência aos QAC são similares aos

envolvidos em resistência aos antibióticos, sendo, portanto, importante no contexto global da problemática de resistência aos antibióticos (TEZEL; PAVILOSTHATIS, 2015).

Dados sobre o assunto são escassos em nosso país. Ramos e Alonso (2011), avaliando cepas bacterianas de diversos microrganismos, entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, de ambientes naturais frente a desinfetantes, sugerem que é necessário estudar a susceptibilidade desses organismos aos antibióticos e aos biocidas mais comumente empregados.

Concentrações de biocidas no ambiente, no ar, na água e no solo têm sido descritas na literatura. Uma contínua exposição da microbiota a biocidas em ambientes naturais e efluentes deve ser considerada como uma possibilidade de desenvolvimento de resistência a algum antibiótico (SCENIHR, 2009).

Quanto às características das cepas clínicas frente aos biocidas, McDonnell e Russel (1999) concluíram, apesar de controvérsias, que deve existir uma preocupação crescente sobre uma diminuição da susceptibilidade a biocidas e resistência cruzada aos antibióticos, ficando claro que microrganismos isolados de amostras clínicas devem ser avaliados continuamente e que possíveis mecanismos devem ser investigados (RUSSELL, 2002a).

A resistência aos QAC está presente em diversos microrganismos e é facilitada por inúmeros mecanismos como modificação na composição da membrana, expressão de sistemas de reparo e resposta a estresse e ainda expressão de genes responsáveis por bombas de efluxo (HEGSTAD et al, 2010).

Os mecanismos de resistência ou de susceptibilidade diminuída aos biocidas descritos são intrínsecos (impermeabilidade, sistemas de bombas de efluxo e inativação do biocida) ou adquiridos (inativação do biocida, diminuição do acúmulo - efluxo mediado por plasmídeo), estando neste caso envolvidos genes determinantes de efluxo como *qacA* em bactérias Gram-positivas e *qacE* e *qacEΔ1*, em bactérias Gram-negativas (POOLE, 2005, HEGSTAD et al, 2010).

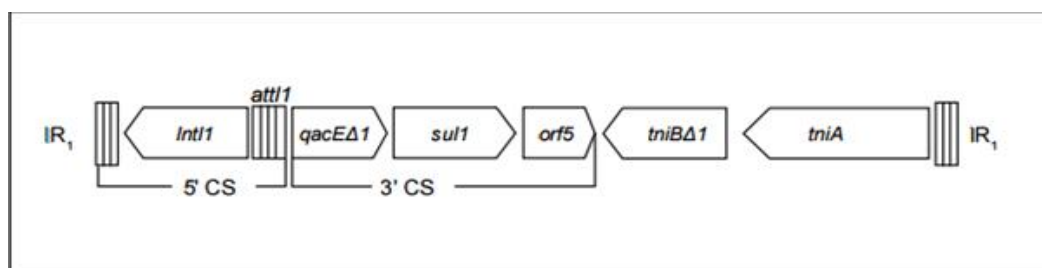
Os genes *qacE* codificam resistência a QAC e encontram-se em elementos móveis denominados integrons. Estes elementos genéticos são capazes de integrar e expressar genes de resistência a antibióticos e a desinfetantes. São compostos por duas sequências conservadas 5' e 3' (5'CS e 3'CS) e por uma região variável (PEREIRA, 2013).

A região 5'CS acomoda o gene *intI* que codifica a enzima integrase e acomoda também o gene *attI* que está localizado ao lado do gene *intI*. Entre estes dois genes, encontram-se os promotores divergentes que atuam para a expressão da integrase e para a expressão dos cassetes de genes inseridos na região variável (MENDES et al, 2006).

Já a região 3'CS geralmente é composta pelo gene *qacEΔ1* conjugado ao gene *sul1*. Esses genes codificam resistência a compostos quaternário de amônio e a sulfonamidas, respectivamente. O gene *qacEΔ1* é uma versão defectiva do gene *qacE* (WALSH et al, 2005) (**Figura 2**).

Os cassetes gênicos (CG) são constituídos por dois componentes funcionais, um gene, responsável pela codificação de alguma proteína, e um sítio de recombinação, esses genes não possuem promotor, portanto, dependem do promotor presente no integron, no qual o cassete gênico se encontra inserido. (MENDES et al, 2006).

Figura 2 – Representação esquemática de integron de classe 1



Legenda: IR representam terminais de repetição invertidos. A região conservada 5' consiste em *intI1* e sítio de inserção *attI1*. A seta dos respectivos genes indica a direção de sua transcrição. A região conservada 3' consiste nos genes *qacEΔ1*, *sul1* e *orf5* de função desconhecida, seguidos do módulo *tni*.

Fonte: MENDES et al, 2006

Portanto, pode-se observar que não deve haver apenas a preocupação com o uso indiscriminado e impróprio dos antibióticos, mas também com o uso incorreto e indiscriminado de antissépticos e de desinfetantes. Estudos que exploram esses aspectos são relevantes, pois contribuirão para prever a emergência de patógenos resistentes em ambientes e indivíduos saudáveis. Tais estudos são escassos no Brasil, especialmente no que diz respeito aos biocidas.

1.12 JUSTIFICATIVA

A vigilância sanitária é o conjunto de ações capaz de eliminar, diminuir ou prevenir riscos à saúde e de intervir nos problemas sanitários decorrentes do meio ambiente, da produção e circulação de bens e da prestação de serviços de interesse da saúde, abrangendo: o controle de bens de consumo que, direta ou indiretamente, se relacionem com a saúde, compreendidas todas as etapas e processos, da produção ao consumo; e o controle da prestação de serviços que se relacionam direta ou indiretamente com a saúde (BRASIL, 1990). O Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) compõe o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária como laboratório do nível federal e atua como referência para as questões científicas e tecnológicas relativas ao controle da qualidade de produtos, ambientes e serviços vinculados à vigilância sanitária. É papel do INCQS, desenvolver pesquisas no sentido de contribuir para a promoção e recuperação da saúde e prevenção de doenças.

Pesquisas com enfoque em resistência microbiana aos antibióticos e aos biocidas, envolvendo indivíduos sadios e o ambiente, estão diretamente relacionadas à prevenção de doenças já que o controle da disseminação de microrganismos inclui diversas medidas, entre elas a desinfecção de objetos, superfícies e o tratamento terciário de efluentes, fundamentais para todos os segmentos: domiciliares, coletivos, institucionais, industriais, estabelecimentos de assistência à saúde.

Grande quantidade de esgoto ainda é desposta no ambiente *in natura*. Por exemplo, no Município do Rio de Janeiro, a capacidade da rede coletora de esgotos tem sido ampliada, porém 40% do esgoto ainda chegam à Baía de Guanabara sem tratamento (ESTADO DO RIO DE JANEIRO, 2014). No Brasil, menos de 50% do esgoto é tratado antes de ser disposto no ambiente, o que representa risco potencial à disseminação de microrganismos, inclusive daqueles apresentando resistência aos antibióticos (BRASIL, 2014).

Atualmente a resistência aos antibióticos constitui uma preocupação não só em relação aos pacientes em internação hospitalar como também em indivíduos não hospitalizados, da comunidade, evidenciando-se isolados bacterianos resistentes a antibióticos utilizados somente para infecções graves, em estabelecimentos de saúde (VILLAR et al, 2013). Vale ressaltar que cada vez mais cresce o número de indivíduos

mais susceptíveis considerando a elevação da perspectiva de vida da população brasileira.

Microrganismos resistentes têm sido detectados em diversos efluentes só que certamente traz impactos negativos ao ambiente (BAQUERO et al, 2008, SERVAIS; PASSERAT, 2009).

Como já mencionado, a introdução de biocidas nas diversas áreas: médica, domiciliar, na indústria de alimentos, cosméticos e outras, levantou diversas questões; uma delas refere-se ao papel desses produtos na seleção de bactérias antibiótico-resistentes, existindo uma preocupação crescente sobre a diminuição da susceptibilidade a biocidas e resistência cruzada aos antibióticos em amostras microbianas advindas de indivíduos e do meio ambiente.

Algumas questões a respeito da susceptibilidade dos microrganismos encontrados na prática necessitam investigação como: os isolados microbianos de origem ambiental e comunitária apresentam susceptibilidade a antibióticos e desinfetantes utilizados pela população e instituições? Deve ser considerada a possibilidade de microrganismos expostos a biocidas, em ambientes naturais onde pode haver a presença dessas substâncias, desenvolverem resistência a algum antibiótico ou até mesmo às substâncias biocidas? (SCENIHR, 2009, BUFFET-BATAILLON et al, 2012).

Investigar a susceptibilidade de isolados bacterianos ambientais e de origem comunitária frente aos antibióticos e a desinfetante amplamente empregado nos mais diversos segmentos da sociedade irá contribuir para elucidar questionamentos e fornecerá dados significativos para as ações de vigilância em saúde no âmbito sanitário e ambiental.

2 OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente estudo foi avaliar a susceptibilidade de isolados bacterianos de origem ambiental e comunitária frente a um desinfetante à base de compostos quaternários de amônio e antimicrobianos, incluindo a pesquisa do gene envolvido na diminuição da susceptibilidade bacteriana a biocidas.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Pesquisar, isolar e identificar fenotipicamente cepas de *Escherichia coli* e *Klebsiella sp.* a partir de fezes de indivíduos sadios da comunidade;
- b) Pesquisar, isolar e identificar fenotipicamente cepas de *Escherichia coli* e *Klebsiella sp.* a partir de efluentes domésticos e de ambientes aquáticos impactados por esgoto doméstico;
- c) Avaliar o perfil de susceptibilidade dos isolados bacterianos aos antibióticos usualmente empregados na prática médica;
- d) Comparar os perfis de susceptibilidade aos antibióticos dos isolados bacterianos ambientais e da comunidade;
- e) Avaliar a susceptibilidade dos isolados bacterianos por meio da determinação da Concentração Inibitória Mínima de um composto quaternário de amônio para esses isolados;
- f) Avaliar a susceptibilidade dos isolados de origem ambiental e comunitária frente a um desinfetante de uso geral à base de compostos quaternários de amônio;
- g) Pesquisar o gene *qacEΔ1*, envolvido na diminuição da susceptibilidade a compostos quaternários de amônio, nos isolados bacterianos ambientais e de origem comunitária;
- h) Correlacionar o perfil de susceptibilidade aos antibióticos e a susceptibilidade ao desinfetante das amostras ambientais e de origem comunitária.

3 METODOLOGIA

3.1 ISOLADOS BACTERIANOS

Os isolados bacterianos ambientais e de origem comunitária de *E. coli* e *Klebsiella sp* foram obtidos no período de julho/2014 a novembro/2015.

As amostras de fezes foram fornecidas por 27 voluntários de ambos os sexos, todos saudáveis e da comunidade (não hospitalizados).

As amostras ambientais foram coletadas em 16 locais distintos, no Estado do Rio de Janeiro, compreendendo: esgoto doméstico, rios, valões abertos e mangue impactados por esgoto doméstico, e uma estação de tratamento de esgoto.

3.1.1 Obtenção dos isolados bacterianos ambientais

Os isolados bacterianos ambientais foram obtidos por meio de amostras de esgotos domésticos, rios, valões abertos e mangue impactados por esgoto doméstico, e de uma estação de tratamento de esgoto. Foram coletadas amostras de 1.000 mL em frasco âmbar estéril. As amostras foram encaminhadas, sob refrigeração, ao Setor de Saneantes do Departamento de Microbiologia do INCQS/FIOCRUZ. Após homogeneização, alíquotas de 1 mL foram semeadas em caldo infusão cérebro coração (BHI), caldo Lethen (DIFCO®) e/ou Meio Neutralizante de Dey/Engley (DIFCO®), com incubação a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 a 48 h. A seguir, o crescimento foi semeado nos meios: ágar MacConkey (MERCK®) e ágar eosina azul de metileno (ACUMEDIA®).

Os isolados de *E. coli* foram identificados pela letra E seguida do número de ordem do local de coleta (Exemplo: E1). Nos isolados identificados como pertencentes ao gênero *Klebsiella sp*, foi acrescentada a letra K na sua identificação (Exemplo: EK1). Os isolados bacterianos de um mesmo local de coleta que apresentaram perfis de susceptibilidade aos antibióticos distintos, foram considerados isolados diferentes, recebendo o mesmo número seguido de letra para distingui-los (Exemplo: E1A).

3.1.2 Obtenção das amostras de origem comunitárias

Amostras de fezes foram fornecidas por 27 indivíduos voluntários, adultos, saudáveis, da comunidade após a leitura e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO A). Uma pequena porção das fezes foi coletada com *swab* e colocada em meios de transporte de Stuart e enviada pelo voluntário ao Setor de Saneantes do Departamento de Microbiologia do INCQS/FIOCRUZ.

Os *swabs* foram identificados somente com o número de ordem acrescido de F (fezes), com a idade e sexo do voluntário. Nenhum material foi identificado com o nome do indivíduo ou instituição (Exemplo: F1, masculino, 48 anos). Os *swabs* foram semeados nos meios ágar MacConkey e ágar EMB, com incubação a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 a 48 h.

Após a identificação, os isolados de *E. coli* foram identificados pela letra F e os isolados identificados como pertencentes ao gênero *Klebsiella sp* foram identificados pelo acréscimo da letra K (Exemplo: FK1).

3.1.3 Cepas usadas como controle

Foram empregadas as cepas de referência de *S. aureus* (INCQS0039/ ATCC 6538), *S. enterica* (INCQS0028/ ATCC 10708), *E. coli* (INCQS 0033/ATCC 25922), *E. coli* (INCQS 00032/ATCC 11229), *K. pneumoniae* (INCQS 00147/ATCC 13883), *E. coli* INCQS 00325 (ATCC 35218) e *P. aeruginosa* (INCQS 00099/ ATCC 27853) fornecidas pela Coleção de Microrganismos de Referência em Vigilância Sanitária (CMRVS) do INCQS/FIOCRUZ. Além disso, as cepas *P. aeruginosa* 7249 e *P. aeruginosa* 1456-02 foram utilizadas como controle nos experimentos de reação em cadeia da polimerase (PCR) (cepas do acervo microbiano interno do Setor de Saneantes do Departamento de Microbiologia do INCQS).

3.1.4 Ética

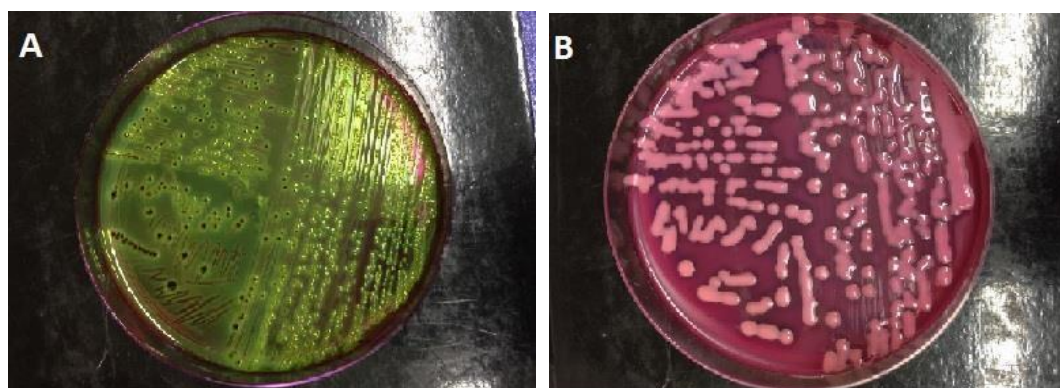
O presente projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da FIOCRUZ, sendo aprovado com parecer de número 951.436.

3.2 IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA

A identificação dos isolados bacterianos iniciou-se com a análise da morfologia e características das colônias obtidas a partir do material semeado em ágar EMB e ágar MacConkey, com posterior realização da prova da oxidase e do teste da fermentação/oxidação em meio OF-glicose.

As colônias (3 a 5 colônias) bacterianas selecionadas com características sugestivas do gênero *Klebsiella* sp e da espécie *E. coli* foram isoladas (**Figura 3**) e a seguir semeadas em ágar soja tríptica (TSA, MERCK®) e identificadas bioquimicamente pelo método convencional.

Figura 3 - Colônias sugestivas de *E. coli* (**A**) e *Klebsiella* sp. (**B**) em meios EMB e MacConkey, respectivamente.



Foram realizadas as seguintes provas bioquímicas: produção de indol, utilização do citrato, produção de H₂S, hidrólise da ureia, fenilalanina, descarboxilação

de lisina, descarboxilação de arginina, descarboxilação de ornitina, prova de motilidade, hidrólise de gelatina, utilização de malonato, fermentação de glicose, produção de gás, fermentação de lactose, fermentação de sacarose, hidrólise de esculina, produção de DNase, de acordo com o Manual da Anvisa (BRASIL, 2013) e com Versalovic et al (2011).

3.2.1 Preservação dos isolados de origem ambiental e comunitária e dos microrganismos de referência

Os isolados de origem ambiental e comunitária foram preservados em solução crioprotetora à base de TSB acrescido de 15% de glicerol, em criotubos identificados. Os criotubos foram mantidos à temperatura de -70°C . Os microrganismos de referência foram fornecidos em ampolas liofilizadas e foram ressuspensos em caldo soja tríptica (TSB, MERCK®). A seguir, foram semeados neste mesmo meio e em TSA em placa de Petri. Após incubação, foram preparadas suspensões de cada uma das cepas em solução crioprotetora à base de TSB acrescido de 15% de glicerol e foram mantidos também a -70°C .

3.2.2 Controle dos microrganismos

Após a preservação a -70°C , foi realizado o controle da pureza das cepas de referência e dos 70 isolados bacterianos ambientais e de origem comunitária de *E. coli* e *Klebsiella sp*, selecionando-se aleatoriamente criotubos de cada espécie. Foram feitas semeaduras por esgotamento em TSA, com posterior incubação a $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 48 h. Também foi realizada a confirmação indicativa dos gêneros microbianos dessas cepas através da semeadura em ágar manitol com cloreto de sódio para avaliar *S. aureus*; em ágar entérico Hektoen e ágar xilose lisina descarboxilase para *S. enterica*; ágar EMB para *E. coli* e ágar MacConkey para *K. pneumoniae*.

3.3 SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIBIÓTICOS

Foi empregado o Método de Difusão de discos de Kirby-Bauer segundo o *Clinical and Laboratory Standard Institute* (CLSI, 2013), utilizando-se o meio ágar Müller Hinton (DIFCO®).

Os isolados foram cultivados em TSA em placas de Petri por 18-24 horas a $36 \pm 1^\circ\text{C}$. A partir desse crescimento foi preparada uma suspensão em solução de cloreto de sódio a 0,85% estéril, cuja turvação foi ajustada a do tubo 0,5 da Escala de MacFarland.

Foram empregados os seguintes antibióticos: cefuroxima (30 μg); ciprofloxacina (5 μg); gentamicina (10 μg); sulfametoxazol-trimetoprima (25 μg); norfloxacina (10 μg); meropenem (10 μg); imipenem (10 μg); cefazolina (30 μg); ampicilina/sulbactam (20 μg); amoxicilina + ácido clavulânico (30 μg); ampicilina (10 μg); aztreonam (30 μg); ampicilina (30 μg); ceftazidima (30 μg); ceftioxima (30 μg); cefepima (30 μg); ceftazidima (30 μg); ceftriaxona (30 μg); tetraciclina (30 μg); cefalotina (30 μg); tobramicina (10 μg). Os discos de antibióticos foram adquiridos da empresa Sensifar.

Todas as placas foram incubadas por 16 a 18 horas a $36 \pm 1^\circ\text{C}$.

O controle da qualidade dos discos de antibióticos foi realizado com as seguintes cepas de referência: *E. coli* INCQS 00033 (ATCC 25922), *E. coli* INCQS 00325 (ATCC 35218), *P. aeruginosa* (INCQS 00099/ ATCC 27853).

A leitura foi realizada por meio da medida das zonas de inibição de crescimento bacteriano, utilizando-se paquímetro. O tamanho da zona foi então interpretado de acordo com os critérios do CLSI (2013). Isolados com resultado intermediário foram considerados resistentes.

O critério para definir os isolados como resistentes foi resistência a pelo menos um dos antibióticos empregados (SERVAIS; PASSERAT, 2009). Já o critério para considerar os isolados multirresistentes foi resistência a pelo menos um antibiótico em três classes diferentes (MAGIORAKOS et al, 2012).

3.4 AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE DOS ISOLADOS AMBIENTAIS E DE ORIGEM COMUNITÁRIA A BIOCIDAS

A susceptibilidade dos isolados ambientais e de origem comunitária foi avaliada através de duas metodologias: determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) empregando-se um composto biocida à base de quaternário de amônio (todos os isolados) e pelo Método da Diluição de Uso (isolados selecionados).

3.4.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima

Para a determinação da CIM foram utilizadas soluções preparadas a partir do composto quaternário de amônio, cloreto de alquil dimetil benzil amônio (cloreto de benzalcônio) a 50% (Herquat 3500-50) (CBA).

Foi realizado o ensaio para a determinação da CIM, segundo o CLSI (2012), da seguinte forma: os 70 isolados bacterianos ambientais e de origem comunitária de *E. coli* e *Klebsiella sp* e as cepas de referência de *E. coli* (INCQS 0033/ATCC 25922), *E. coli* (INCQS 00032/ATCC 11229) e *K. pneumoniae* (INCQS 00147/ATCC 13883) foram cultivadas em meio TSA a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 h. As concentrações finais do desinfetante CBA utilizadas foram 500 $\mu\text{g/mL}$, 250 $\mu\text{g/mL}$, 125 $\mu\text{g/mL}$, 62,5 $\mu\text{g/mL}$, 31,5 $\mu\text{g/mL}$, 15,63 $\mu\text{g/mL}$, 7,82 $\mu\text{g/mL}$, 3,91 $\mu\text{g/mL}$ em Caldo Müller Hinton (OXOID®) acrescido dos cátions cálcio e magnésio.

A partir do crescimento em meio TSA foi preparada uma suspensão em solução de cloreto de sódio a 0,85% estéril, cuja turvação foi ajustada a do tubo 0,5 da Escala de MacFarland. Essa suspensão foi diluída também no meio caldo Müller Hinton acrescido de cátions até a concentração final do inóculo de aproximadamente 10^4 UFC/mL.

Foram utilizadas microplacas com 96 poços. Em cada poço, foram adicionados 50 μL do CBA nas diferentes concentrações (para fornecer as concentrações finais de 3,91 $\mu\text{g/mL}$ a 500 $\mu\text{g/mL}$), em seguida adicionados também 50 μL do inóculo padronizado e em seus respectivos poços (todos foram realizados em triplicata). As placas foram incubadas por 24 h a $36 \pm 1^\circ\text{C}$. Foi considerada como a CIM, aquela

correspondente a menor concentração do CBA que não forneceu crescimento visível. Os isolados e as cepas de referência também foram cultivados na ausência do CBA como controle positivo.

3.4.2 Avaliação da susceptibilidade dos isolados bacterianos frente ao desinfetante de uso geral

Foi utilizado um desinfetante de uso geral à base de compostos quaternários de amônio, contendo como princípio ativo cloreto de alquil dimetil benzil amônio a 0,15%. O desinfetante foi submetido à análise química para determinação do teor do princípio ativo, no Setor de Saneantes do Departamento de Química do INCQS, mostrando resultado satisfatório.

Inicialmente foi avaliada a qualidade do desinfetante (atividade antimicrobiana) frente às cepas de referência, através do Método da Diluição de Uso da AOAC (TOMASINO, 2012).

Os isolados bacterianos ambientais e de origem comunitária que passaram pelo Método da Diluição de Uso foram escolhidos aleatoriamente entre os grupos, sendo: quatro isolados multirresistentes, três com resistência a três ou mais antibióticos, dois com resistência ao imipenem e dez sensíveis ou com resistência até a 2 antibióticos.

O procedimento foi realizado da seguinte forma, resumidamente. Da cultura estoque criopreservada foi realizado um repique com uma alçada de 10 μ L do microrganismo teste em 10 mL de caldo sintético (DIFCO®), seguido de incubação a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 h. A partir desse crescimento, foi feito outro repique também com uma alçada de 10 μ L do microrganismo teste em 10 mL de caldo sintético, incubado a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 48 h (oito tubos) para ser utilizado como cultura a ser empregada no ensaio. A seguir foi feito um *pool* das culturas de 48 h. Desse *pool*, foram distribuídos 24 mL da cultura em três tubos e foram colocados 24 cilindros de aço inoxidável (carreadores) em cada um dos tubos contendo a cultura, deixando-os em contato por um período de 15 ± 2 min. Após o período de contato dos carreadores com os microrganismos, os cilindros foram removidos e colocados em placas de Petri de vidro

com duas folhas de papel filtro (doze carreadores por placa) (**Figura 4**) e foram incubados por 40 minutos a $36 \pm 1^\circ\text{C}$, para a secagem.

A seguir os cilindros, um a um, foram colocados em contato com o desinfetante (10 mL, sem diluição), onde cada cilindro ficou exposto por 10 min. Após o tempo de exposição, os cilindros foram retirados do produto e transferidos para caldo Lethen (10 mL) onde estes ficaram em contato por 30 min (primeira subcultura), para neutralização. Após a primeira subcultura, os cilindros foram removidos para uma nova subcultura (segunda subcultura) (**Figura 5**). Todos os tubos contendo caldo Lethen foram incubados por 48h a $36 \pm 1^\circ\text{C}$.

Foram utilizados 60 cilindros de aço inoxidável, para cada isolado bacteriano.

Figura 4 – Placa de Petri com duas folhas de papel filtro contendo 12 cilindros de aço inoxidável.

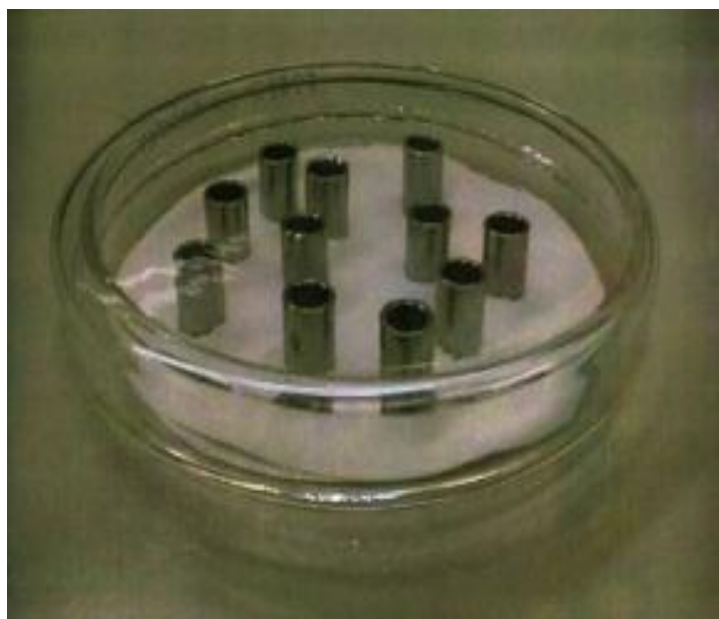
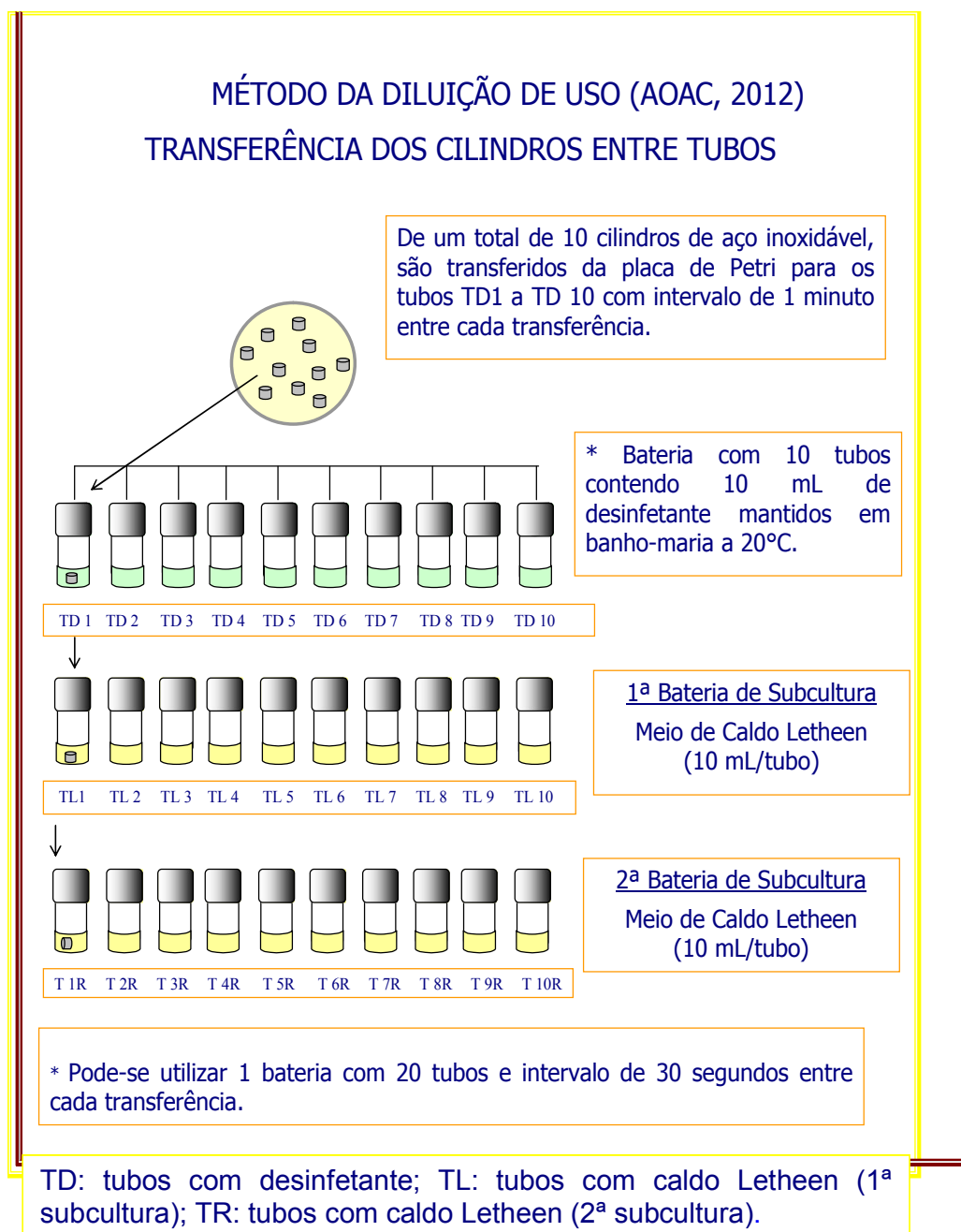


Figura 5 – Esquema resumido do Método da Diluição de Uso.



Foram realizados os seguintes controles: número de microrganismos sobre os cilindros carreadores, esterilidade dos meios de cultura e materiais e viabilidade do meio de cultura.

A contagem de bactérias viáveis nos cilindros carreadores, para os ensaios com *S. aureus*, *S. enterica* e para os isolados de origem comunitária e ambiental de

E. coli e *Klebsiella sp* foi efetuada da seguinte maneira. Após a secagem dos carreadores por 40 ± 2 minutos, foi selecionado aleatoriamente um carreador de cada placa de Petri, esse foi colocado em 10 mL de caldo Letheen. O tubo foi então levado a um banho de ultrassom para sonicação por $1 \text{ min} \pm 5 \text{ s}$, após a sonicação, os tubos contendo os cilindros carreadores foram agitados em agitador de tubos por aproximadamente 1 min, e a seguir foram realizadas diluições seriadas em 9 mL de solução tampão fosfato diluída (10^{-1} a 10^{-4}). Foi semeado 0,1 mL das diluições em duplicata em TSA, pela técnica do espalhamento em superfície. A contagem de colônias foi realizada manualmente usando as diluições que forneceram contagem até 300 colônias (10^{-2} a 10^{-4}) para a enumeração das unidades formadoras de colônias (UFC). Placas com contagem zero foram incluídas no cálculo para determinar a média geométrica da densidade de microrganismos.

Para calcular o número de UFC/mL foi empregada a seguinte equação:

$$\text{UFC/mL} = \frac{(\text{Média UFC dil. } 10^{-x}) + (\text{média UFC dil. } 10^{-y}) + (\text{média UFC dil. } 10^{-z})}{10^{-x} + 10^{-y} + 10^{-z}}$$

Para calcular o número de UFC/cilindro, o resultado foi multiplicado por 10 (volume de caldo Letheen utilizado em cada tubo).

Os valores de média geométrica da densidade de microrganismos nos cilindros carreadores para cada ensaio em \log^M foram: pelo menos 5,0 e não mais que 6,0 para *S. enterica* e para os isolados ambientais e da comunidade. Nos ensaios para *S. aureus*, foi considerado o \log^M de no mínimo 6,0 e no máximo 7,0.

Para que um desinfetante seja considerado eficaz (satisfatório), o critério do método preconiza que poderá ocorrer crescimento do microrganismo teste em no máximo um carreador, dos 60 utilizados no ensaio. Isolados bacterianos de origem comunitária e ambiental que apresentaram crescimento em dois ou mais cilindros carreadores foram considerados menos susceptíveis ao desinfetante do que a cepa de referência de *S. enterica*, considerada representante das enterobactérias (BRASIL, 2007).

3.5 PESQUISA DO GENE *qacEΔ1*

Os isolados de *E. coli* e *Klebsiella sp* foram estudados quanto à presença do gene *qacEΔ1*, através da PCR.

Todos os isolados de *E. coli* e *Klebsiella sp* foram submetidos ao ensaio. Como controle foram utilizadas duas cepas de *P. aeruginosa* 7249 e *P. aeruginosa* 1456-02 (ROMÃO et al, 2011).

3.5.1 Extração do DNA genômico

As cepas de *E. coli*, *Klebsiella sp* e as de referência foram cultivadas em meio TSA. Foi transferida a quantidade de uma alçada de 10 µL de cada crescimento microbiano para um microtubo de 1,5 mL, contendo tampão específico do kit Qiagen, para a extração e purificação do DNA genômico. Foram seguidas as etapas do protocolo da Qiagen D Neasy Tissue Kit (Qiagen Inc, Valencia, Calif, EUA). O DNA extraído e purificado foi armazenado a -20°C. A extração do DNA foi avaliada através de eletroforese em gel de agarose (Sigma) a 1,0% em tampão TBE 1X (Tris-Borato-EDTA).

3.5.2 Reação em cadeia da polimerase

Para a realização da PCR foram utilizados os seguintes iniciadores: Upstream *qac1*- 5'- CCC GAA TTC ATG AAA GGC TGG CTT; downstream *qac 2*- 5'- TAT AAG CTT TCA CCA TGG CGT CGG, descritos por Kücken, Heinz-Hubert e Kaufers (2000) e sintetizados pela Invitrogen Brazil Ltda.

As reações de amplificação foram realizadas utilizando-se 5 µL da solução do DNA bacteriano (diluído 1:5), que foram adicionados a uma mistura de reação de volume final de 50 µL, contendo os seguintes componentes (todos oriundos da Invitrogen, Carlsbad, Canadá): 20 mM de Tris-HCl, pH 8,4; 50 mM de KCl; 200 µM de

deoxinucleotídeos trifosfatados (dNTPs); 1,5 mM de $MgCl_2$; 10 picomoles de cada iniciador e 2,5U de *Taq*polimerase recombinante.

Os tubos contendo os componentes das reações foram submetidos às seguintes condições de ciclagem: desnaturação inicial 94°C/3 minutos; 30 ciclos de desnaturação 94°C/30 segundos, anelamento 57°C/1,5 minuto, extensão 72°C/1 minuto; extensão final 72°C/10 minutos, no equipamento Peltier Thermal Cycler, modelo PTC-200, MJ Research.

Alíquotas de 6 μ l dos produtos da reação foram submetidas à eletroforese em gel de agarose (Sigma) a 1,0% em tampão TBE 1X (Tris-Borato-EDTA). Um padrão de peso molecular (100 pb DNA Ladder, Invitrogen Carlsbad, Canadá) foi incluído em cada gel. Os géis foram corados com solução de brometo de etídio (5mg/mL) e as imagens foram analisadas através do Sistema de Vídeo Documentação com o software Image Master (Amersham Pharmacia Biotech), fotografadas e digitalizadas. A amplificação do gene deve fornecer um produto com 350 pb.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para correlacionar a susceptibilidade aos antibióticos e a susceptibilidade aos desinfetantes dos isolados bacterianos foi empregado o teste estatístico do Qui quadrado, utilizando-se o Programa Epi Info versão 7.1.5.0.

Para comparar a resistência aos antibióticos entre as cepas ambientais e da comunidade foi aplicado o teste não paramétrico de Mann-Whitney/Wilcoxon para dados pareados. Este teste foi aplicado sob o nível de significância ($\alpha=0,05$).

4 RESULTADOS

4.1 AMOSTRAS AMBIENTAIS

As amostras ambientais foram coletadas em diversos efluentes presentes no Estado do Rio de Janeiro, sendo 16 locais distintos: esgoto doméstico, rios, valões abertos e mangue impactados por esgoto doméstico, e uma estação de tratamento de esgoto (**Tabela 3**).

4.2 AMOSTRAS COMUNITÁRIAS

As amostras de fezes foram fornecidas por 27 voluntários de ambos os sexos, todos saudáveis e da comunidade (não hospitalizados) com idade que variou de 18 a 69 anos (**Tabela 4**).

4.3 IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA DOS ISOLADOS DE ORIGEM AMBIENTAL E COMUNITÁRIA

Os isolados foram identificados pelo método convencional. Foram efetuadas provas bioquímicas para todos os isolados bacterianos de origem ambiental e comunitária.

Foram identificados 70 isolados no total, pertencentes às espécies *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Klebsiella oxytoca*, sendo 35 de origem comunitária e 35 de origem ambiental.

Nas amostras ambientais foram obtidos 22 isolados de *E. coli*, 12 de *K. pneumoniae* e uma de *K. oxytoca*. Em relação aos isolados de origem comunitária, foram identificados 20 isolados de *E. coli* e 15 de *K. pneumoniae* (**Gráfico 1**).

Tabela 3 - Locais de coleta das amostras ambientais.

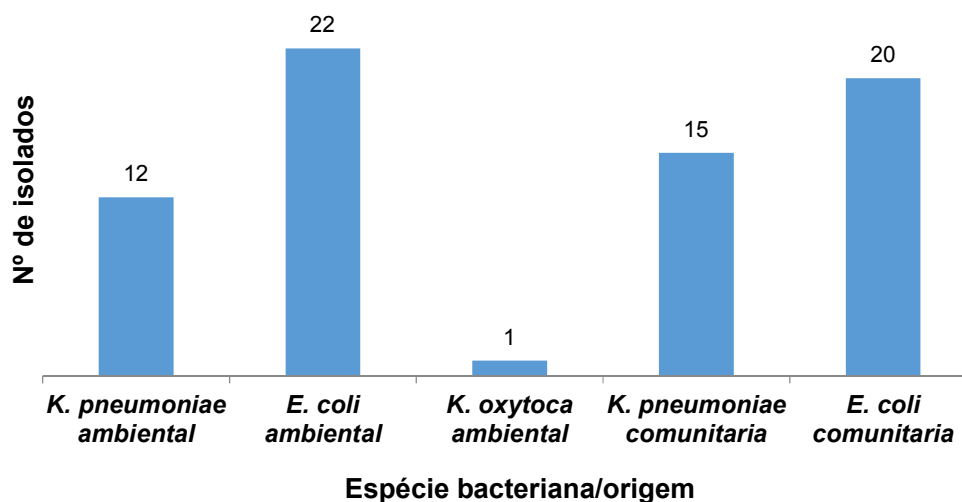
Amostra	Local de coleta	Natureza do efluente	Latitude e Longitude (Aproximadamente)
E1	R. Engenheiro Pena Chaves – Jardim botânico – Rio de Janeiro – RJ	Esgoto doméstico	22°57'43.8"S 43°13'21.9"W
E2	Av. do Canal – Maré/Vila do João – Rio de Janeiro – RJ	Esgoto doméstico	22°51'46.8"S 43°14'15.9"W
E3	R. Fernandes Vieira – Petrópolis – RJ	Rio impactado com esgoto	22°28'19.0"S 43°11'06.5"W
E4	R. Emílio, de Menezes - Quintino Bocaiúva – Rio de Janeiro – RJ	Esgoto doméstico	22°53'12.9"S 43°18'49.8"W
E5	R. Pernambuco Paraná – Manguinhos – Rio de Janeiro – RJ	Esgoto doméstico	22°52'49.8"S 43°15'05.0"W
E6	Manguinhos, Rio de Janeiro – RJ	Estação de Tratamento de Esgoto - Tanque de aeração	22°52'41.9"S 43°14'55.0"W
E7	Manguinhos, Rio de Janeiro – RJ	Estação de Tratamento de Esgoto – Saída Final	22°52'41.9"S 43°14'55.0"W
E8	R. Antenor Costa, – Neves – São Gonçalo – RJ	Esgoto doméstico	22°47'03.4"S 43°00'07.0"W
E9	Morada do Sol II – Itaboraí – RJ	Valão aberto	22°44'36.0"S 42°54'09.3"W
E10	Avenida Almirante Ary Parreiras - Icaraí – Niterói – RJ	Valão aberto	22°54'27.0"S 43°06'00.1"W
E11	R. Adalgisa Monteiro – Itaipu – Niterói – RJ	Valão aberto	22°56'26.2"S 43°01'40.5"W
E12	Av. Estado da Guanabara - Recreio dos Bandeirantes – Rio de Janeiro – RJ	Valão aberto	23°02'24.6"S 43°30'16.8"W
E13	Av. Sernambetiba – Barra da Tijuca – Rio de Janeiro – RJ	Esgoto doméstico	23°00'28.7"S 43°19'41.0"W
E14	R. Álvaro Chaves – Laranjeiras – Rio de Janeiro – RJ	Esgoto doméstico	22°56'08.8"S 43°11'03.1"W
E15	R. Octávio Cantanhede - Cidade Universitária, Rio de Janeiro – RJ	Mangue	22°50'28.7"S 43°13'35.5"W
E16	Av. Maracanã – Tijuca – Rio de Janeiro – RJ	Rio impactado com esgoto	22°55'18.5"S 43°14'09.1"W

S = Sul; W = Oeste

Tabela 4 - Amostras comunitárias

Amostra de fezes	Idade	Sexo
F2	22anos	Masculino
F3	69 anos	Masculino
F4	23 anos	Masculino
F5	23 anos	Feminino
F6	43 anos	Feminino
F10	33 anos	Feminino
F14	44 anos	Feminino
F17	25 anos	Masculino
F18	30 anos	Feminino
F22	18 anos	Masculino
F23	42 anos	Feminino
F25	41 anos	Feminino
F26	52 anos	Masculino
F27	Dado não fornecido	Masculino
F28	Dado não fornecido	Feminino
F31	29 anos	Feminino
F32	55anos	Masculino
F33	64 anos	Feminino
F34	18 anos	Masculino
F35	Dado não fornecido	Feminino
F36	48 anos	Feminino
F37	56 anos	Masculino
F39	50 anos	Feminino
F39	59 anos	Feminino
F40	23anos	Masculino
F41	29 anos	Masculino
F42	35 anos	Masculino

Gráfico 1 - Identificação dos isolados bacterianos de origem ambiental e comunitária.



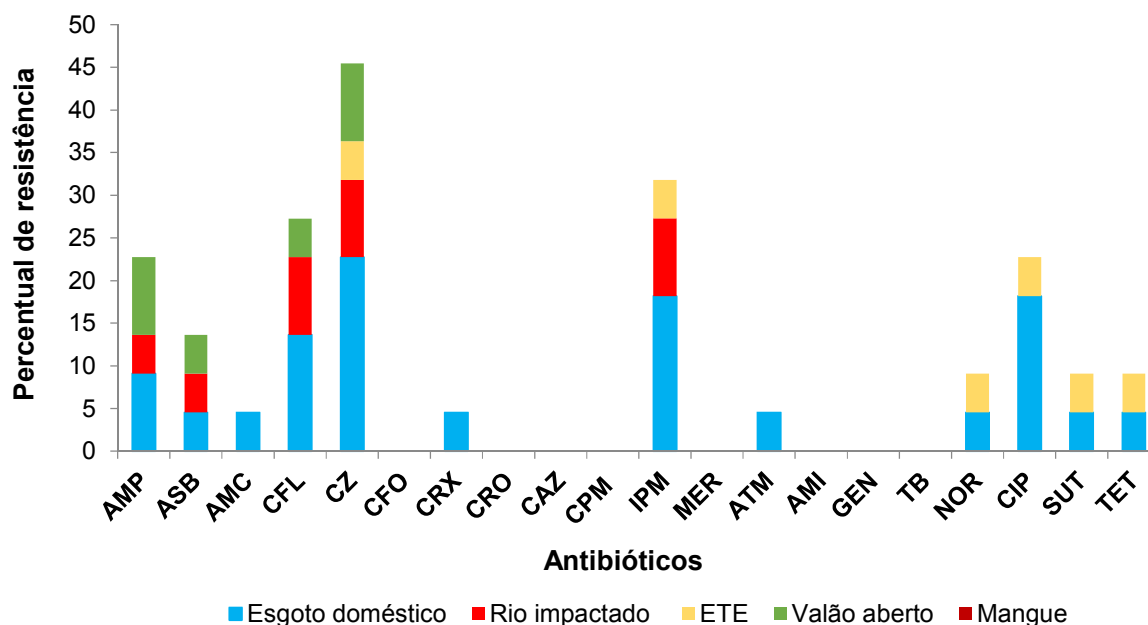
Nas amostras comunitárias, foi observado que das 20 cepas de *E. coli* identificadas, oito cepas pertenciam a voluntários do sexo masculino enquanto 12 pertenciam a voluntárias do sexo feminino. Em contraste, foi observado que nos 15 isolados identificados como *K. pneumoniae* apenas quatro pertenciam a voluntárias do sexo feminino enquanto 11 pertenciam a voluntários do sexo masculino.

4.4 TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

Os isolados de origem ambiental e comunitária foram submetidos ao teste de susceptibilidade aos antimicrobianos frente aos antibióticos mais utilizados na prática médica. Os resultados encontrados estão apresentados nos **Gráficos 2, 3, 4 e 5**.

O isolado encontrado de *Klebisella oxytoca* apresentou resistência aos seguintes antibióticos: ampicilina, ampicilina+sulbactam, cefazolina e aztreonam.

Gráfico 2 - Resistência aos antibióticos em isolados de *E. coli* em amostras ambientais por tipo de local.

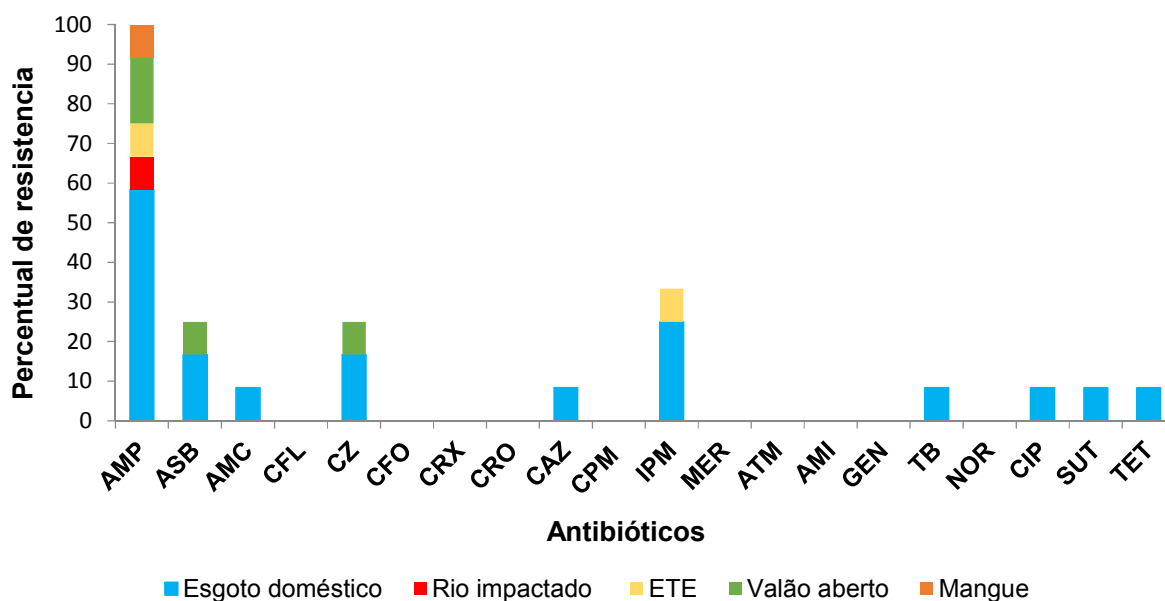


Estação de tratamento de esgoto (ETE), ampicilina (AMP), ampicilina + sulbactam (ASB), amoxicilina + ácido clavulânico (AMC), cefalotina (CFL), cefazolina (CZ), cefoxitina (CFO), cefuroxima (CRX), ceftriaxona (CRO), ceftazidima (CAZ), cefepima (CPM), imipenem (IPM), meropenem (MER), aztreonam (ATM), amicacina (AMI), gentamicina (GEN), tobramicina (TB), norfloxacina (NOR), ciprofloxacina (CIP), cotrimoxazol (trimetoprim/sulfametoxazol) (SUT) e tetraciclina (TET).

Observamos que os isolados de *E. coli* ambientais apresentaram os maiores percentuais de resistência aos antibióticos cefazolina (45,45%) e imipenem (31,81%). Além disso, foi observada também uma resistência significativa frente à cefalotina (27,27%), ampicilina e ciprofloxacina (22,72%, respectivamente para cada antibiótico).

Em relação aos isolados de *K. pneumoniae*, 100% dos isolados de origem ambiental se mostraram resistentes à ampicilina, sendo observados também percentuais de resistência significativos frente à ampicilina + sulbactam (33,33%), cefazolina (33,33%) e imipenem (33,33%) (**Gráfico 3**). Não foi observada resistência frente aos antibióticos: cefalotina, cefoxitina, cefuroxima, ceftriaxona, cefepima, meropenem, amicacina, gentamicina e norfloxacina.

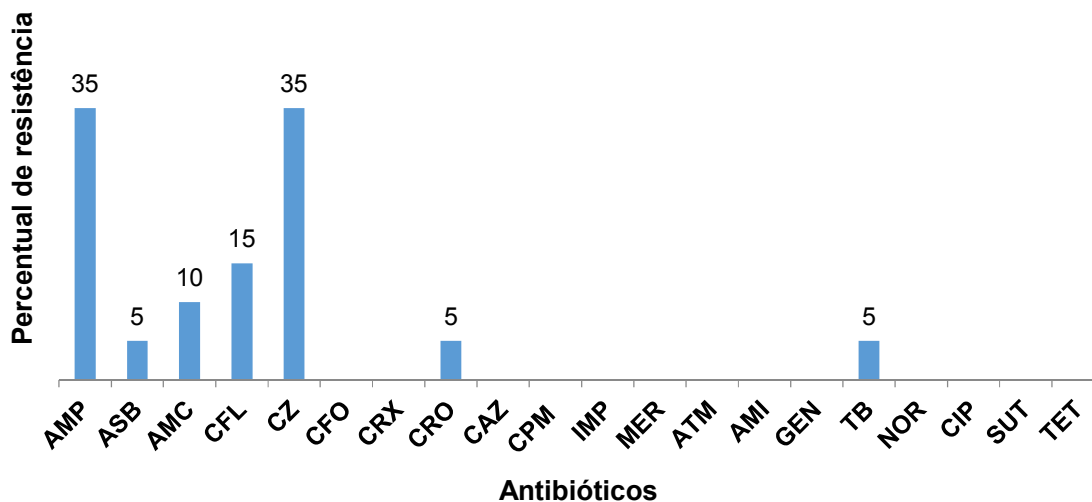
Gráfico 3 - Resistência aos antibióticos em isolados de *K. pneumoniae* em amostras ambientais por tipo de local.



Estação de tratamento de esgoto (ETE), ampicilina (AMP), ampicilina + sulbactam (ASB), amoxicilina + ácido clavulânico (AMC), cefalotina (CFL), cefazolina (CZ), cefoxitina (CFO), cefuroxima (CRX), ceftriaxona (CRO), ceftazidima (CAZ), cefepima (CPM), imipenem (IPM), meropenem (MER), aztreonam (ATM), amicacina (AMI), gentamicina (GEN), tobramicina (TB), norfloxacina (NOR), ciprofloxacina (CIP), cotrimoxazol (trimetoprim/sulfametoxazol) (SUT) e tetraciclina (TET).

Quanto aos isolados de origem comunitária, obtidos através de amostras de fezes de voluntários saudáveis, foi observado que 35% dos isolados de *E. coli* apresentaram resistência frente aos antibióticos cefazolina e ampicilina, sendo ainda 15% resistentes à cefalotina. Uma cepa mostrou-se resistente à ceftriaxona (**Gráfico 4**).

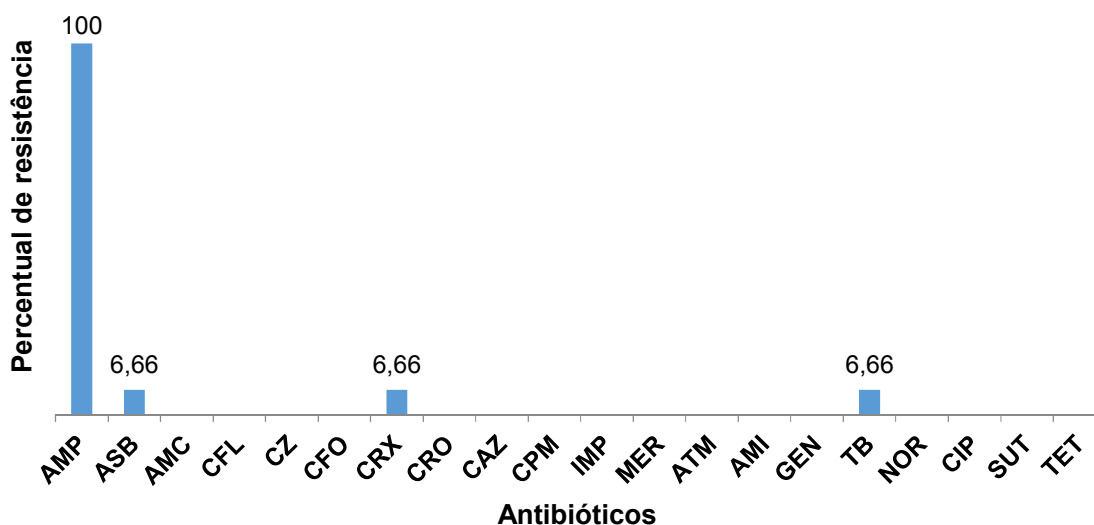
Gráfico 4 - Resistência aos antibióticos em isolados de *E. coli* em amostras comunitárias.



Ampicilina (AMP), ampicilina + sulbactam (ASB), amoxicilina + ácido clavulânico (AMC), cefalotina (CFL), cefazolina (CZ), cefoxitina (CFO), cefuroxima (CRX), ceftriaxona (CRO), ceftazidima (CAZ), cefepima (CPM), imipenem (IPM), meropenem (MER), aztreonam (ATM), amicacina (AMI), gentamicina (GEN), tobramicina (TB), norfloxacina (NOR), ciprofloxacina (CIP), cotrimoxazol (trimetoprim/sulfametoxazol) (SUT) e Tetraciclina (TET)

Os isolados de *K. pneumoniae* de origem comunitária se mostraram sensíveis à maioria dos antibióticos avaliados, apresentando apenas um baixo percentual de resistência. Um isolado apresentou resistência a ampicilina + sulbactam, um a cefuroxima e um a tobramicina. Em contraste a isso, como esperado, 100% dos isolados apresentaram resistência frente à ampicilina (**Gráfico 5**).

Gráfico 5 - Resistência aos antibióticos em isolados de *K. pneumoniae* em amostras comunitárias.

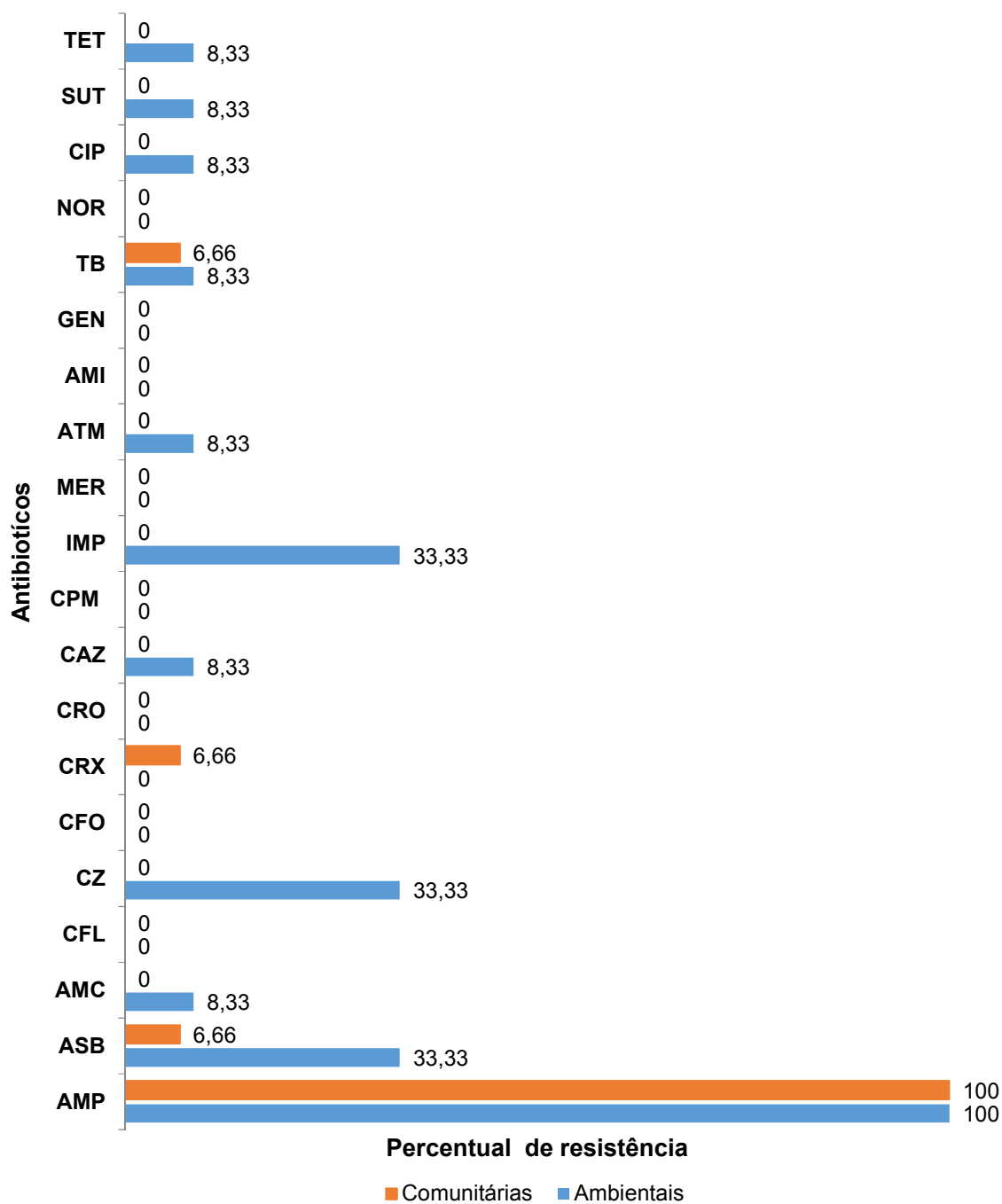


Ampicilina (AMP), ampicilina + sulbactam (ASB), amoxicilina + ácido clavulânico (AMC), cefalotina (CFL), cefazolina (CZ), cefoxitina (CFO), cefuroxima (CRX), ceftriaxona (CRO), ceftazidima (CAZ), cefepima (CPM), imipenem (IPM), meropenem (MER), aztreonam (ATM), amicacina (AMI), gentamicina (GEN), tobramicina (TB), norfloxacina (NOR), ciprofloxacina (CIP), cotrimoxazol (trimetoprim/sulfametoxazol) (SUT) e Tetraciclina (TET).

Foi realizada uma avaliação conjunta entre os isolados de origem ambiental e comunitária da mesma espécie como pode ser observado nos **Gráficos 6 e 7**.

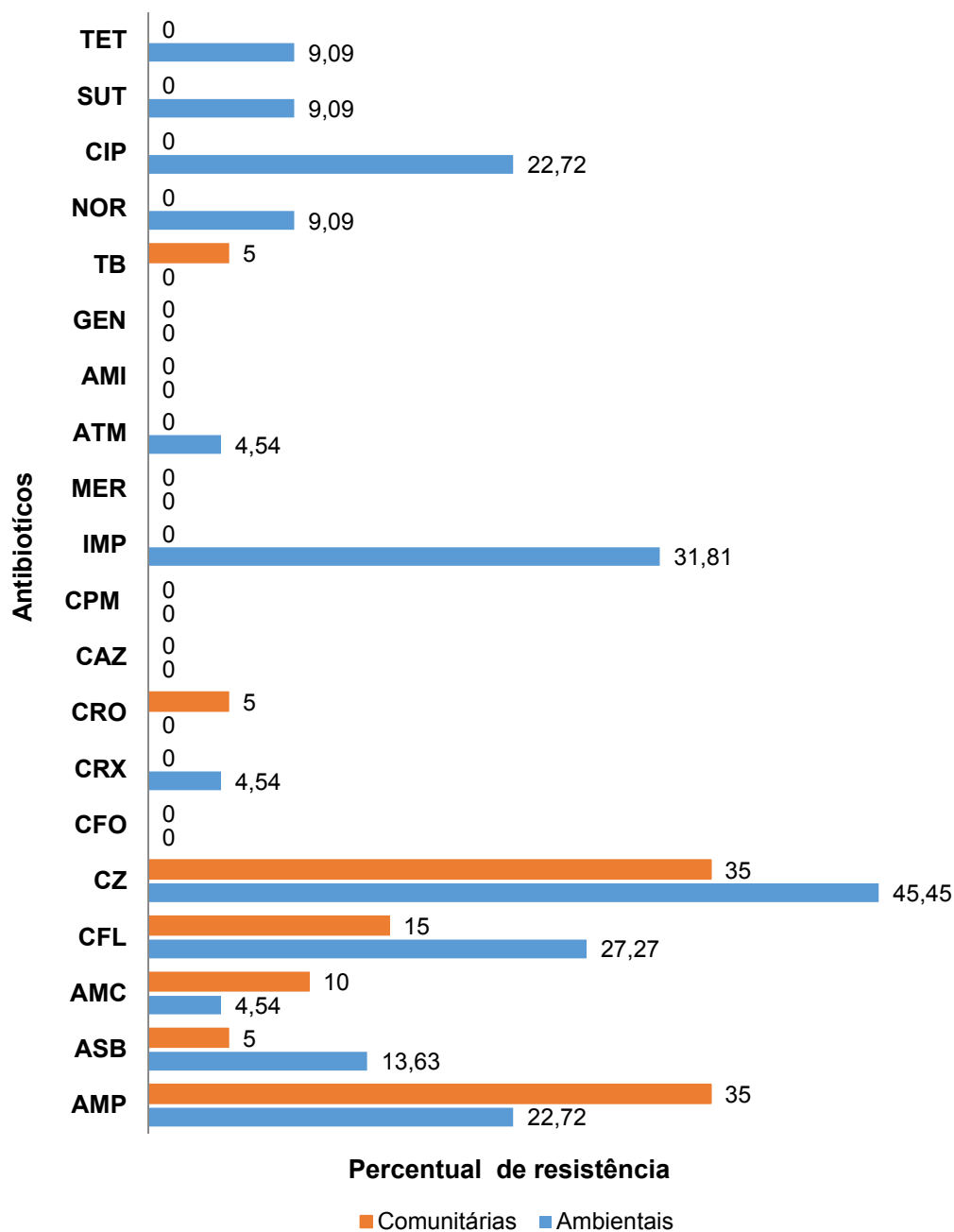
A partir dessa comparação, foi possível observar que os isolados de origem ambiental apresentaram uma maior resistência aos antibióticos, podendo-se destacar algumas diferenças consideráveis como para o imipenem: *Klebsiella pneumoniae* (ambientais: 30,76% e comunitárias: 0%) e *E. coli* (ambientais: 31,81% e comunitárias: 0%).

Gráfico 6 - Avaliação conjunta da resistência aos antibióticos em isolados de *K. pneumoniae* em amostras ambientais e comunitárias.



Ampicilina (AMP), ampicilina + sulbactam (ASB), amoxicilina + ácido clavulânico (AMC), cefalotina (CFL), cefazolina (CZ), cefoxitina (CFO), cefuroxima (CRX), ceftriaxona (CRO), ceftazidima (CAZ), cefepima (CPM), imipenem (IPM), meropenem (MER), aztreonam (ATM), amicacina (AMI), gentamicina (GEN), tobramicina (TB), norfloxacina (NOR), ciprofloxacina (CIP), cotrimoxazol (trimetoprim/sulfametoxazol) (SUT) e tetraciclina (TET).

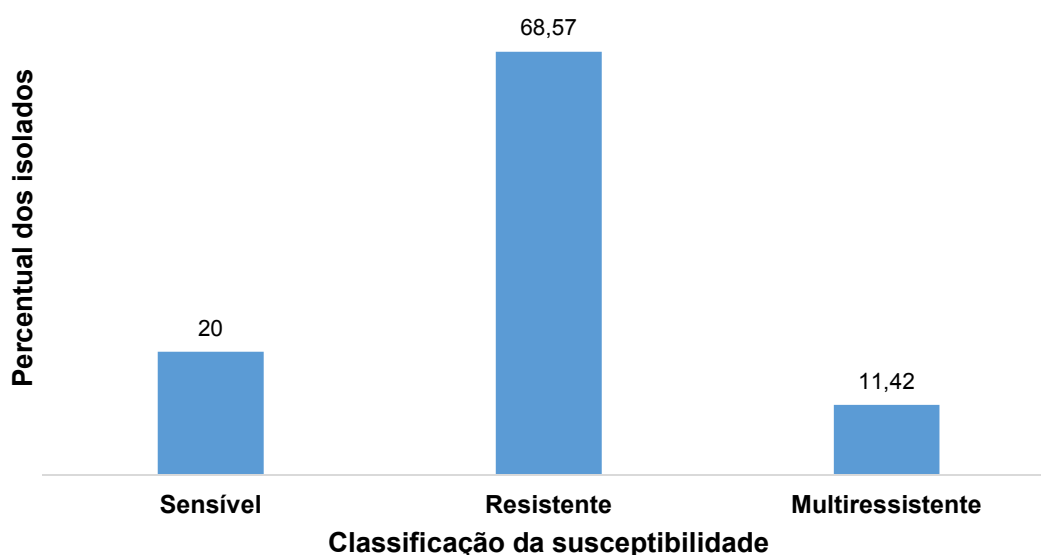
Gráfico 7 - Avaliação conjunta dos perfis resistência aos antibióticos em isolados de *E. coli* em amostras ambientais e comunitárias.



Ampicilina (AMP), ampicilina + sulbactam (ASB), amoxicilina + ácido clavulânico (AMC), cefalotina (CFL), cefazolina (CZ), cefoxitina (CFO), cefuroxima (CRX), ceftriaxona (CRO), ceftazidima (CAZ), cefepima (CPM), imipenem (IPM), meropenem (MER), aztreonam (ATM), amicacina (AMI), gentamicina (GEN), tobramicina (TB), norfloxacin (NOR), ciprofloxacina (CIP), cotrimoxazol (trimetoprim/sulfametoxazol) (SUT) e tetraciclina (TET).

De acordo com o perfil de susceptibilidade às classes de antimicrobianos apresentado pelos isolados, os mesmos foram classificados em sensíveis, resistentes e multirresistentes. Foi observado que 68,57% dos isolados se mostraram resistentes a pelo menos um dos antibióticos utilizados, 11,42% dos isolados apresentaram resistência à pelo menos três ou mais classes de antibióticos, sendo classificadas como multirresistentes e 20% se mostraram sensíveis a todos os antibióticos que foram testados (**Gráfico 8**).

Gráfico 8 - Classificação dos isolados de origem ambiental e comunitária de acordo com a susceptibilidade aos antimicrobianos.



A partir dos resultados encontrados no teste de susceptibilidade aos antimicrobianos realizados em todos os isolados, foi possível traçar perfis de resistência. Entre os isolados ambientais de *E. coli* foram encontrados 12 diferentes perfis de resistência aos antibióticos, sendo que uma cepa se mostrou resistente a 11 antibióticos (**Tabela 5**). Os isolados de *K. pneumoniae* ambientais apresentaram nove tipos de perfis de resistência (**Tabela 6**).

Tabela 5 - Perfis de resistência dos isolados de *E. coli* ambientais.

Perfis	Grupos de antibióticos	Frequência de resistência	
		N	(%)
1	Sensíveis a todos os antibióticos	6	27,27
2	CZ	3	13,63
3	IPM	1	4,54
4	CFL	1	4,54
5	AMP	1	4,54
6	IPM; CIP	2	9,09
7	CFL; CZ	1	4,54
8	CZ; IPM	1	4,54
9	CZ; IPM; CIP*	1	4,54
10	AMP; ASB; CFL; CZ	3	13,63
11	IPM; NOR; CIP; SUT; TET*	1	4,54
12	AMP; AMC; CFL; CZ; CRX; IPM; ATM; NOR; CIP; SUT; TET*	1	4,54

*Multirresistentes. Ampicilina (AMP), ampicilina + sulbactam (ASB), amoxicilina + ácido clavulânico (AMC), cefalotina (CFL), cefazolina (CZ), cefuroxima (CRX), imipenem (IPM), aztreonam (ATM), amicacina (AMI), norfloxacin (NOR), ciprofloxacina (CIP), cotrimoxazol (trimetoprim/sulfametoxazol) (SUT) e tetraciclina (TET); N: número de isolados

Tabela 6 - Perfis de resistência dos isolados de *K. pneumoniae* ambientais.

Perfis	Grupos de antibióticos	Frequência de resistência	
		N	(%)
1	AMP	4	30,76
2	AMP; IPM	2	15,38
3	AMP; CZ	1	7,69
4	AMP; ASB; CZ	1	7,69
5	AMP; IPM; CIP*	1	7,69
6	AMP; ASB; CZ; ATM*	1	7,69
7	AMP; CZ; GEN; TB*	1	7,69
8	AMP; ASB; CAZ; IPM*	1	7,69
9	AMP; ASB; AMC; SUT; TET*	1	7,69

*Multirresistentes. Ampicilina (AMP), ampicilina + sulbactam (ASB), amoxicilina + ácido clavulânico (AMC), cefazolina (CZ), ceftazidima (CAZ), imipenem (IPM), aztreonam (ATM), gentamicina (GEN), tobramicina (TB), ciprofloxacina (CIP), cotrimoxazol (trimetoprim/sulfametoxazol) (SUT) e tetraciclina (TET) N: número de isolados.

Diferentes perfis de resistência aos antimicrobianos também foram observados nos isolados de origem comunitária. Para os isolados de *E. coli* foram observados nove perfis diferentes, já para os isolados de *K. pneumoniae* foram encontrados quatro perfis de resistência (**Tabelas 7 e 8**).

Tabela 7 - Perfis de resistência dos isolados de *E.coli* de origem comunitária.

Perfis	Grupos de antibióticos	Frequência de resistência	
		N	(%)
1	Sensíveis a todos os antibióticos	8	40,00
2	AMP	2	10,00
3	CZ	3	15,00
4	TB	1	5,00
5	CFL	1	5,00
6	AMP; CZ	2	10,00
7	AMP; CRO	1	5,00
8	AMP; AMC; CFL; CZ	1	5,00
9	AMP; ASB; AMC;CFL;CZ	1	5,00

Ampicilina (AMP), ampicilina + sulbactam (ASB), amoxicilina + ácido clavulânico (AMC), cefalotina (CFL), cefazolina (CZ), ceftriaxona (CRO), tobramicina (TB), N: número de isolados

Tabela 8 - Perfis de resistência dos isolados de *K. pneumoniae* de origem comunitária.

Perfis	Grupos de antibióticos	Frequência de resistência	
		N	(%)
1	AMP	12	80,00
2	AMP; TB	1	6,66
3	AMP; CRX	1	6,66
4	AMP; ASB	1	6,66

Ampicilina (AMP), Ampicilina + sulbactam (ASB), Cefuroxima (CRX), Tobramicina (TB), N: número de isolados

4.5 AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE DOS ISOLADOS BACTERIANOS FRENTE A BIOCIDAS

4.5.1 Concentração Mínima Inibitória

As CIM foram estabelecidas a partir de diluições preparadas do CBA em Caldo Müeller Hinton acrescido de cátions, com concentrações variando de 3,91 µg/mL a 500 µg/mL.

A CIM variou de 7,82 $\mu\text{g/mL}$ a 62,5 $\mu\text{g/mL}$, como pode ser observado no **Gráfico 9**. Para 73% dos isolados a CIM do CBA foi de 31,25 $\mu\text{g/mL}$, assim como para as cepas de referências empregadas. Nos isolados de origem comunitária, a CIM do CBA variou de 7,82 $\mu\text{g/mL}$ a 62,5 $\mu\text{g/mL}$ (**Gráfico 10**). Já nos isolados de origem ambiental a CIM do CBA variou de 15,63 $\mu\text{g/mL}$ a 62,5 $\mu\text{g/mL}$ (**Gráfico 11**). Para o isolado de *K. oxytoca* a CIM do CBA foi de 62,5 $\mu\text{g/mL}$. A **Tabela 9** apresenta as CIM do CBA para os isolados multirresistentes. Observa-se que a CIM variou de 15,63 a 62,5 $\mu\text{g/mL}$ para esses isolados.

Gráfico 9 - Concentração inibitória mínima do cloreto de alquil dimetil benzil amônio frente aos isolados bacterianos de origem ambiental e comunitária.

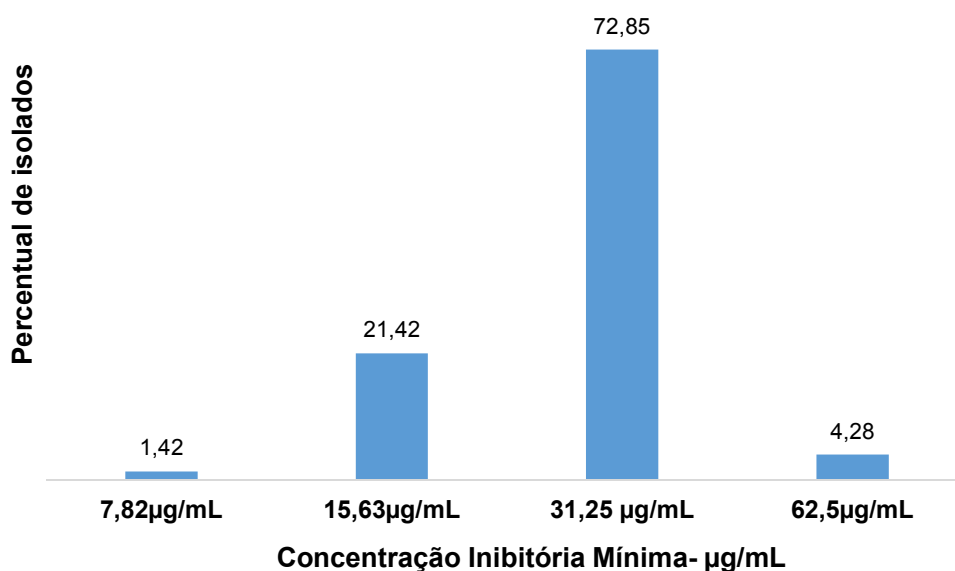


Gráfico 10 - Concentração inibitória mínima do cloreto de alquil dimetil benzil amônio para isolados de origem comunitária.

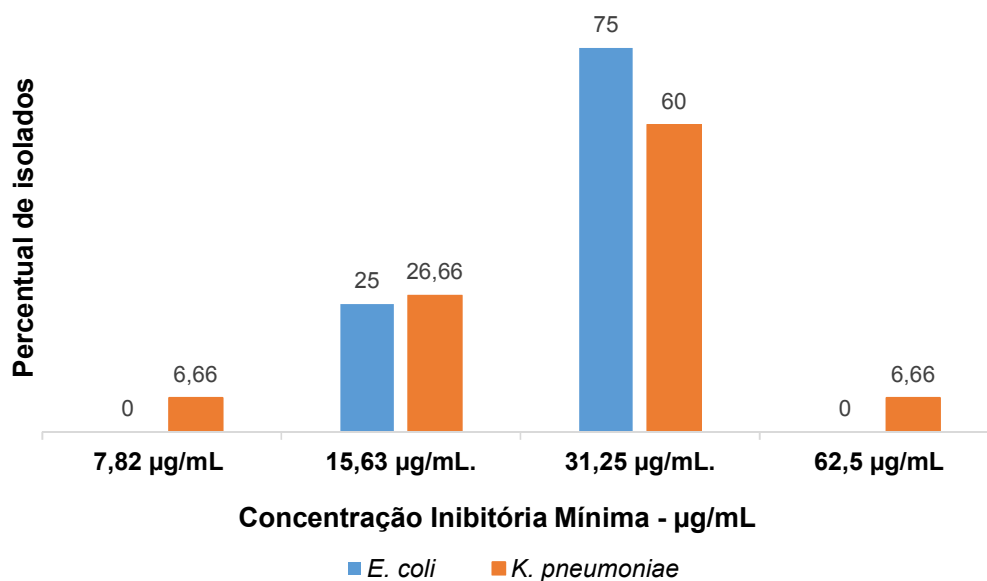


Gráfico 11 - Concentração inibitória mínima do cloreto de alquil dimetil benzil amônio nos isolados de origem ambiental.

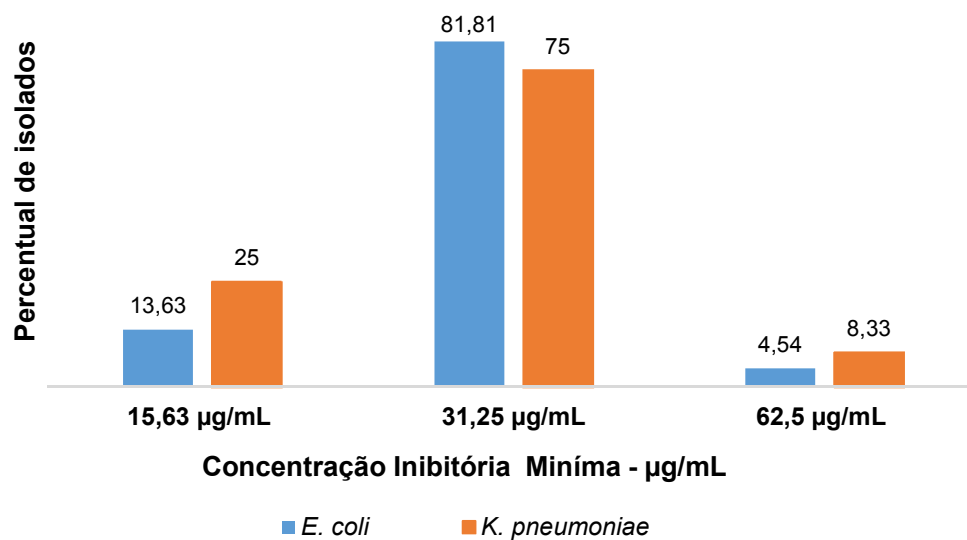


Tabela 9 - Concentrações mínimas inibitórias do cloreto de alquil dimetil benzil amônio para os isolados bacterianos multirresistentes aos antibióticos.

Microorganismos	Cepa	Perfil de Resistência	CIM (CBA) (µg/mL)
<i>E. coli</i>	E1C	AMP; AMC; CFL; CZ; CRX; IPM; ATM; NOR; CIP; SUT; TET	31,25
	E5A	CZ; IPM; CIP	31,25
	E6F	IPM, NOR, CIP, SUT, TET	31,25
<i>K. oxytoca</i>	EK1A	AMP; ASB; CZ; ATM	62,5
<i>K. pneumoniae</i>	EK1F	AMP; CZ; GEN; TB	31,25
	EK2A	AMP; IPM; CIP	15,63
	EK2B	AMP; ASB; CAZ; IPM	31,25
	EK14B	AMP; ASB; AMC; SUT; TET	15,63

E = *E. coli* de origem ambiental; EK = *K. pneumoniae* ambiental; F = *E. coli* de origem comunitária; CIM = Concentração mínima inibitória; CBA = Cloreto de alquil dimetil benzil amônio

4.5.2 Avaliação da susceptibilidade dos isolados bacterianos ao desinfetante de uso geral à base de compostos quaternários de amônio

Inicialmente, a eficácia do desinfetante de uso geral utilizado neste estudo foi comprovada por ensaio microbiológico (Método da Diluição de Uso), sendo o produto capaz de eliminar os microrganismos teste de referência *S. aureus* e *S. enterica*, sendo portanto considerado satisfatório, de acordo com a legislação vigente. Adicionalmente, o desinfetante foi avaliado frente às cepas de referência de *E. coli* e *K. pneumoniae*, mostrando-se também eficaz para esses microrganismos. Dezenove isolados de origem ambiental e comunitária foram submetidos ao Método da Diluição de Uso.

Foram realizados os controles relacionados à carga microbiana por cilindro, exigidos pela metodologia para a validação dos ensaios. Os resultados das contagens de UFC/cilindro encontram-se na **Tabela 10**. Os ensaios realizados foram válidos uma vez que cumpriram os parâmetros exigidos pela metodologia empregada.

Todos os isolados se mostraram susceptíveis ao desinfetante uma vez que não ocorreu crescimento microbiano em nenhum dos cilindros durante a aplicação do método frente aos 19 isolados testados (**Tabela 10**).

Tabela 10 – Quantidade de UFC/cilindro nos ensaios para avaliação da susceptibilidade dos isolados de origem ambiental e comunitária frente ao desinfetante de uso geral.

Isolados	Média do N° de UFC/Cilindro	log M do N° UFC/Cilindro	Conformidade	N° carreadores positivos pelo N° de empregados
E1C	2,12 x 10 ⁵	5,43	Conforme	0/60
E3D	1,51 x 10 ⁵	5,17	Conforme	0/60
E7A	1,66 x 10 ⁵	5,22	Conforme	0/60
E2G	1,45 x 10 ⁵	5,16	Conforme	0/60
F14	1,04 x 10 ⁵	5,01	Conforme	0/60
F23B	1,78 x 10 ⁵	5,25	Conforme	0/60
F31A	1,10 x 10 ⁵	5,04	Conforme	0/60
EK1A	2,35 x 10 ⁵	5,37	Conforme	0/60
EK2A	1,08 x 10 ⁵	5,03	Conforme	0/60
EK2B	2,08 x 10 ⁵	5,31	Conforme	0/60
EK14B	2,23 x 10 ⁵	5,34	Conforme	0/60
EK11B	1,50 x 10 ⁵	5,17	Conforme	0/60
EK13A	3,98 x 10 ⁵	5,59	Conforme	0/60
FK17A	2,74 x 10 ⁵	5,45	Conforme	0/60
FK2B	3,55 x 10 ⁵	5,55	Conforme	0/60
FK22A	4,47 x 10 ⁵	5,65	Conforme	0/60
FK32B	2,42 x 10 ⁵	5,38	Conforme	0/60
FK33A	1,07 x 10 ⁵	5,02	Conforme	0/60
FK8A	1,56 x 10 ⁵	5,19	Conforme	0/60
INCQS 00147	1,31 x 10 ⁵	5,11	Conforme	0/60
INCQS 00032	4,05 x 10 ⁵	5,60	Conforme	0/60

K. pneumoniae (EK2B, EK11B, EK14B, FK32B, FK22A, FK17A, FK2B, EK13A, FK33A, FK8A, ATCC 13883), *E. coli* (E1C, F14, E7A, E2G, E3D, F23B, F31A, ATCC0032) e *K. oxytoca* (EK1A)

4.6 PESQUISA DO GENE *qacEΔ1*

O gene *qacEΔ1* que codifica uma diminuição de susceptibilidade a compostos quaternários de amônio foi pesquisado por PCR nos 70 isolados de origem ambiental e comunitária estudados. Não foi detectada a presença do gene *qacEΔ1* em nenhum dos 70 isolados estudados. A cepa utilizada como controle positivo apresentou banda de 350 pb.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

A correlação entre multirresistência aos antibióticos e diminuição da susceptibilidade ao biocida foi realizada através do teste estatístico Qui quadrado, com os isolados multirresistentes aos antibióticos (08) e os isolados cujos CIM para o CBA foram iguais ou superiores a 31,25 µg/mL. Foi utilizado critério baseado em Abuzaid et al (2012), que consideraram CIM superiores a 32 mg/L como indicativo de susceptibilidade diminuída ao CBA. A comparação mostrou não ter ocorrido diferença significativa entre os grupos ($\chi^2 = 0,45$; $P = 0,50$), ou seja, não houve correlação entre multirresistência aos antibióticos e susceptibilidade diminuída ao CBA.

Para comparar a resistência aos antibióticos entre as cepas ambientais e da comunidade, foi aplicado o teste não paramétrico de Mann-Whitney/Wilcoxon para dados pareados. Esse teste revelou haver diferenças significativas entre esses dois grupos ($p\text{-valor} = 0,02471$). Os isolados ambientais mostraram níveis de resistência superiores aos isolados da comunidade.

5 DISCUSSÃO

A introdução dos antibióticos na prática médica representou um dos mais importantes passos no que diz respeito ao controle de doenças infecciosas. Os antibióticos vêm salvando milhões de vidas e trouxeram uma revolução na medicina (ALÓS, 2015). Entretanto, o número de microrganismos resistentes aos antibióticos vem crescendo consideravelmente, gerando uma preocupação mundial. A disseminação desses microrganismos em locais não desejáveis, principalmente daqueles que apresentam resistência, ou até mesmo multirresistência, a agentes antimicrobianos, é uma preocupação não só dos profissionais da área da saúde humana, mas também da área industrial como indústria de alimentos, medicamentos, cosméticos, veterinária e também no ambiente domiciliar e em instituições com grande circulação de público, como escolas e áreas recreativas (PRESTINACI et al, 2015).

Neste trabalho, foi avaliada a susceptibilidade de isolados de *E. coli* e *Klebsiella sp* de origem ambiental e comunitária frente a desinfetante à base de compostos quaternários de amônio e a antibióticos, incluindo a pesquisa do gene *qacEΔ1* envolvido na diminuição da susceptibilidade bacteriana a biocidas. Foram avaliadas amostras de fezes fornecidas por indivíduos saudáveis da comunidade. A partir dessas amostras, 57% dos isolados foram identificados como *E. coli* e 43% como *K. pneumoniae*. O percentual encontrado é compatível com a microbiota intestinal humana normal que inclui *E. coli* e *K. pneumoniae* (ECKBURG et al, 2005).

Em nosso estudo, em algumas amostras de fezes de voluntários não isolamos *E. coli*, pois outras espécies apareciam em abundância dificultando o isolamento. Este fato pode ser devido a características individuais.

Ainda que *E. coli* e *Klebsiella* estejam presentes na microbiota humana, em muitas situações são consideradas importantes agentes etiológicos causadores de infecções atingindo não apenas indivíduos hospitalizados, como também indivíduos da comunidade (MACHADO et al, 2013).

Um estudo realizado em um laboratório particular no município de São Luís-MA nos anos de 2005 a 2008, onde foram analisadas 2.380 uroculturas, foi observado que 23,7% das culturas analisadas se mostraram positivas para enterobactérias em amostras da comunidade. *E. coli* e *Klebsiella spp* juntas representaram 71,5% do grupo de enterobactérias isoladas nas amostras estudadas (SANTANA et al, 2012).

Medina-Polo et al (2015), em estudo realizado, em Madri, Espanha, com pacientes com infecções do trato urinário na comunidade que requereram hospitalização, observaram que o microrganismo mais frequentemente causador das infecções do trato urinário foi a *E. coli* sendo encontrada em 60,6% das uroculturas. Também foi verificada a presença de *Klebsiella sp* (9,2%).

A maior parte das infecções causadas por *Klebsiella sp* é associada à hospitalização e costuma atingir principalmente indivíduos imunodeprimidos. Os microrganismos pertencentes a esse gênero causam diversas infecções como aquelas do trato urinário e de feridas, bacteremia, rinite crônica atrofica, artrites, enterites, meningites em crianças e sepse (MURRAY et al, 2009; SEIBERT et al, 2014).

Além das amostras de fezes, nesse estudo foram analisadas também, amostras provenientes de esgotos domésticos, rios, valões, mangue impactados com esgoto doméstico e de uma estação de tratamento de esgoto. A partir das amostras coletadas, foram isoladas e identificadas *E. coli* (63%), *K. pneumoniae* (34%) e *K. oxytoca*. (3%). A presença de microrganismos pertencentes ao grupo dos coliformes é um importante indicador de contaminação de origem humana e animal em ambientes e efluentes aquáticos, pois são típicos do intestino do homem e de outros animais de sangue quente (ANDRADE; MORAIS, 2007, DROPA et al, 2010).

Os isolados bacterianos encontrados estão de acordo com a literatura sobre o assunto. Um estudo realizado para avaliar a concentração de coliformes termotolerantes no esgoto da ETE-Goiânia, em 2007, revelou a presença desses microrganismos em concentrações que variaram de 10^6 a 10^8 N.M.P./100mL (ANDRADE; MORAIS, 2007). Os coliformes termotolerantes incluem os microrganismos dos gêneros *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter* e *Klebsiella* (BARBOSA et al, 2009).

Przygodda et al (2009) analisaram 515 amostras de água provenientes de poços e fontes de água “in natura” utilizadas sem tratamento em propriedades rurais e urbanas de alguns municípios do Estado do Paraná. Foi verificado que em 78,64% das amostras havia a presença de coliformes totais, sendo 40,50% de *E. coli*.

Ruiz (2010) pesquisou enterobactérias em amostras de água coletadas de efluentes hospitalares e comunitários do município de Votuporanga, São Paulo. Foram identificadas noventa e duas cepas de enterobactérias, das quais 73 foram obtidas de amostras do efluente hospitalar e vinte e nove do Córrego Marinheiro no trajeto em

direção à estação de tratamento de esgoto. Foram identificadas 18 cepas de *K. pneumoniae* ao total, sendo 14 presentes no efluente hospitalar e quatro no Córrego Marinheiro. Foi observada também a presença de *K. oxytoca* nos dois efluentes estudados: Efluente hospitalar (4), Córrego Marinheiro (1).

Efluentes provenientes da comunidade, se não forem coletados e tratados adequadamente passam a ser importantes locais de contaminação por microrganismos potencialmente patogênicos, podendo ser ainda resistentes e multiresistentes a antibióticos (MEIRELLES-PEREIRA et al, 2007). No Brasil, os parâmetros para efluentes são estabelecidos pela Resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente nº 430 de 2011 (BRASIL, 2011).

Nesse estudo, os 70 isolados provenientes das amostras ambientais e comunitárias foram submetidos ao teste de susceptibilidade aos antimicrobianos frente a 20 antibióticos comumente utilizados na prática médica. Foram encontradas resistências significativas tanto nos isolados de origem comunitária, quanto nos de origem ambiental. No geral, dos 70 isolados estudados apenas 20% se mostraram sensíveis a todos os antibióticos testados. Em contraste, 68,57% dos isolados encontrados se mostraram resistentes a pelo menos um antibiótico, além disso, 11,42% das cepas se mostram multiresistentes.

Reinthal et al (2003) demonstraram que das cepas de *E. coli*, isoladas a partir de estações de tratamento de esgoto doméstico e hospitalar, 40% se mostraram resistentes a um ou mais antibióticos e 10% se mostraram multiresistentes.

Na presente investigação, foi observado que cepas de *E. coli* de origem ambiental mostraram-se resistentes a diversos antibióticos, principalmente à cefazolina, imipenem, cefalotina e ampicilina. Foi detectada uma grande variabilidade de perfis de resistência em *E. coli* ambientais (12 diferentes). Vale ressaltar que uma cepa apresentou resistência a 11 antibióticos, sendo, portanto, um importante disseminador, em potencial, de resistência aos antimicrobianos. Foi verificado ainda que 13 % dos isolados de *E. coli* apresentaram multiresistência aos antibióticos. Os percentuais encontrados são altos, quando comparados aos detectados nos estudos de Rebello e Regua-Mangia (2014) com 178 cepas de *E. coli* de águas residuais agrícolas, águas de recreio, águas residuais hospitalares, efluentes domésticos e efluentes industriais, no Rio de Janeiro. A partir do resultado do antibiograma, os pesquisadores revelaram que 18,5% (33/178) dos isolados foram sensíveis a todos os antimicrobianos testados. Entretanto, nesse mesmo estudo foram detectados

isolados bacterianos com os seguintes percentuais de resistência: cefalotina 24,7% (44/178), amicacina 12,4% (22/178), ampicilina 9% (16/178), gentamicina 5,6% (10/178), ciprofloxacina 3,4% (06/178), norfloxacina 3,4% (06/178), trimetoprim 3,4% (06/178), cefoxitina 2,8% (05/178), nitrofurantoína 2,8% (05/178), sulfazotrim 2,8% (05/178) e cefepima 0,6% (01/178). Foi observada também uma diferença entre o percentual de resistência encontrada e o local de onde os microrganismos foram isolados. O maior percentual de *E. coli* resistente foi encontrado nos isolados recuperados a partir de águas residuais agrícolas (15/26, 57,7%), seguido de águas de recreio (22/39 56,4%), águas residuais hospitalares (10/29, 34,5%), efluentes residenciais (17/75, 22,7%) e efluentes industriais (02/09, 22,2%).

Nos isolados de *K. pneumoniae* ambientais do presente estudo, foi observado que 100% apresentaram resistência à ampicilina. Isso se deve ao fato desse microrganismo possuir resistência intrínseca a esse antibiótico. Essa resistência é ocasionada pela produção de beta-lactamases TEM-1 e SHV-1 (PEREIRA et al, 2003, PIRES et al, 2005). Em relação à resistência à ampicilina + sulbactam, cefazolina, imipenem, foi encontrado percentual significativo de resistência (33,33% referente à cada droga).

Foram detectados nove perfis de resistência aos antibióticos para os isolados de *K. pneumoniae*, destacando-se que três isolados foram resistentes a quatro antibióticos e um a cinco drogas. Vale ressaltar que um alto percentual (41%) dos isolados de *K. pneumoniae* se mostraram multirresistentes aos antibióticos. Esses dados demonstram a variabilidade de resistência aos antimicrobianos detectados nos locais pesquisados, sugerindo uma possível ocorrência de troca de determinantes de resistência, como ocorre em locais onde há concentração de organismos, como no caso de esgotos (BAQUERO et al, 2008).

Consideramos o percentual de resistência ao imipenem detectado tanto nos isolados de *E. coli* quanto nos de *K. pneumoniae* de origem ambiental surpreendentemente alto, ao contrário dos resultados encontrados por outros pesquisadores. Em estudo conduzido por Canal (2010), 22,2% dos 477 isolados de *E. coli* identificados a partir de amostras de água de diversos pontos da Lagoa de Patos localizada no Estado do Rio Grande do Sul apresentaram resistência à tetraciclina. Porém, todos os isolados foram sensíveis ao aztreonam, cefepime, ceftazidima, cefotaxima, cefoxitina, gentamicina e imipenem. O autor observou ainda que 16,3% dos isolados se mostraram multirresistentes, utilizando como critérios

isolados que apresentaram resistência a dois ou mais antimicrobianos. Além disso, o autor também observou uma grande variabilidade de resistência (24 perfis de resistência a antimicrobianos distintos).

Em um estudo realizado a partir de amostras de água coletadas ao longo do curso do Arroio Dilúvio, desde sua nascente até seu desague no Município de Porto Alegre – RS, foram identificadas 87 bactérias Gram-negativas; 84,61% (66/84) pertenciam à família *Enterobacteriaceae*. Destas 23,43% foram identificadas como *E.coli*, sendo este o microrganismo mais encontrado. *K. pneumoniae* também foi detectada (6,89%). Foi observado que 71,26% dos isolados apresentaram resistência a pelo menos dois antimicrobianos o que os caracterizou como multirresistentes. O maior índice de resistência encontrada foi frente à cefalotina (60,91%). A resistência ao imipenem foi detectada em uma das cepas estudadas (OLIVEIRA, 2011). O autor desse estudo empregou como critério de multirresistência, a resistência a dois antimicrobianos. Entretanto no presente estudo a multirresistência aos antimicrobianos só foi considerada quando o isolado se mostrou resistente a pelo menos um agente em três categorias de antimicrobianos.

Um outro caso de *E. coli* resistente ao imipenem foi detectado em um rio do Reino Unido (AMOS et al, 2014), porém estes resultados são muito inferiores aos encontrados por nós, onde 31,81% das cepas de *E. coli* apresentaram resistência ao imipenem. Estudo realizado no Brasil, Rio de Janeiro, em pontos da Lagoa de Jacarepaguá revelou microrganismos resistentes a pelo menos um dos antibióticos testados, com alto percentual de resistência frente ao aztreonam, entretanto os autores não detectaram resistência ao imipenem (SALLOTO et al, 2012).

Em relação aos isolados de *E. coli* de origem comunitária, foi observada resistência frente à cefazolina, ampicilina, cefalotina, amoxicilina + ácido clavulânico, ampicilina + sulbactam, ceftriaxona e tobramicina. Não foi observada resistência frente aos demais antibióticos testados. Nos isolados de *K. pneumoniae*, foi observada 100% de resistência frente à ampicilina, valendo ressaltar novamente que esse microrganismo possui resistência intrínseca frente a esse antimicrobiano. Percentuais de resistência inferiores a 10% foram observados para ampicilina + sulbactam, cefuroxima, ceftazidima, tobramicina, não sendo detectada, resistência frente aos demais antibióticos avaliados. Também entre os isolados de origem comunitária encontramos perfis distintos de resistência, nove em *E. coli*, (um isolado resistente a cinco fármacos) e quatro em *K. pneumoniae*, não sendo detectada multirresistência.

Não detectamos resistência ao sulfametoxazol-trimetoprim entre os isolados de origem comunitária, o que nos surpreendeu tendo em vista o uso desse antimicrobiano para tratar infecções urinárias e os altos índices de resistência encontrados por outros pesquisadores (LEBLEBICIOGLU et al, 2015).

Os percentuais de resistência dos isolados de origem comunitária encontrados no presente estudo foram inferiores aos detectados por alguns pesquisadores, porém consideramos significativos. Também neste caso, essas diferenças podem ser atribuídas às diferenças nas prescrições de antibióticos em diferentes locais e países e ao uso de antibióticos na agricultura e pecuária (PRESTINACI et al, 2015), fazendo com que a população entre em contato com drogas mesmo que não seja de forma medicamentosa.

Uma pesquisa realizada na Bolívia e no Peru, com isolados a partir de amostras de fezes de crianças saudáveis mostrou cepas de *E. coli* resistentes a vários antibióticos, sendo detectado um alto percentual de resistência ao trimetoprim/sulfametoxazol (83%). Foi revelada também a presença de genes *sul* nos isolados. Os autores sugeriram que a alta prevalência desses genes mostra a importância do papel da microbiota fecal na emergência e disseminação de resistência bacteriana (INFANTE et al, 2005).

Bailey et al (2010), em um estudo realizado em Sydney, Austrália, detectaram *E. coli* em 19 das 20 amostras de fezes fornecidas por 20 indivíduos adultos (18 – 60 anos) saudáveis, e que não haviam sido recentemente expostos a antibióticos. Foi realizada a pesquisa de integrons, cassetes de genes e outros genes de resistência. Os pesquisadores verificaram que os genes *dfrA1*, *dfrA5*, *dfrA7*, ou *dfrA12 dfrA17* que conferem resistência ao trimetoprim estavam em cassetes, em um integron classe 1 ou classe 2. Verificaram também que a resistência à ampicilina foi conferida pelo gene *blaTEM*, e detectaram ainda os genes *sul1*, *sul2* ou *sul3* responsáveis pela resistência à sulfametoxazol e os genes *tetA* (A) ou *tetA* (B) que codificam resistência à tetraciclina. No presente estudo, não foi realizada a pesquisa de genes de resistência aos antibióticos, porém, fenotipicamente os nossos resultados foram bem diferentes pois, como já citado, não detectamos resistência ao trimetoprim e nem à tetraciclina.

Um outro estudo realizado em um Hospital Estadual em Rize, Turquia (março 2011 e fevereiro de 2012), para avaliar os padrões de resistência aos antimicrobianos, em 268 cepas de *E. coli* em amostras clínicas de pacientes ambulatoriais não

relacionadas com infecções revelou percentuais significativos de baixa susceptibilidade. A resistência à ampicilina foi predominante em 50,6% dos isolados. A resistência à estreptomicina (27,9%), trimetoprim/ sulfametoxazol (33,5%) e tetraciclina (36,8%) também foram altas. A taxa de resistência mais baixa foi para o aztreonam (7,4 %) e a resistência à amicacina não foi observada (COPUR-CICEK et al, 2014).

Pesquisadores da Índia avaliaram fezes de mulheres grávidas entre 18 a 49 anos de idade em exames de rotina de pré-natal, sem infecções associadas, no período de novembro de 2007 a fevereiro de 2009. Foram identificados 710 isolados de *E. coli*. Um número alto (94 %) das cepas de *E. coli* apresentou resistência a pelo menos um dos grupos dos antibióticos testados: ácido nalidíxico (77%), tetraciclina (69%), ampicilina (55%), cotrimoxazol (48%), cefixima (32%), ciprofloxacina (28%) e amoxicilina/clavulanato (27%). Dos 710 isolados identificados, 109 eram produtores da enzima beta-lactamases de espectro estendido (ESBL), destas 35 se mostraram multirresistentes. Todos os isolados foram sensíveis ao imipenem (PATHAK et al, 2013).

Segundo Andremont (2003), avaliar o papel da microbiota comensal no desenvolvimento de resistência aos antibióticos entre patógenos é difícil, porque a resistência aumenta primeiro na microbiota comensal e só depois é transferida para agentes patogênicos. Assim, os pacientes que foram infectados por microrganismos resistentes geralmente não são aqueles nos quais foram utilizados os antibióticos recentemente. Por exemplo, o aumento da resistência às quinolonas em pneumococos no Canadá ocorreu cinco anos após estes antibióticos entrarem em uso naquele país. Neste caso, a resistência foi devida provavelmente à pressão seletiva na microbiota comensal e mais tarde transferida aos agentes patogênicos (ANDREMONT, 2003).

Por outro lado, pacientes com infecções, tratados ambulatorialmente, também podem ser fontes de bactérias resistentes ou até mesmo multirresistentes, já que muitos estudos revelaram a presença de resistência bacteriana aos antibióticos em infecções em pacientes não hospitalizados.

Bail, Ito e Esmerino (2006) estudaram 106 uroculturas positivas de pacientes hospitalizados e em tratamento ambulatorial da Santa Casa de Misericórdia de Ponta Grossa, Paraná, Brasil. Os microrganismos isolados foram classificados, segundo sua origem, comunitária (64,25%) e hospitalar (35,8%). Enterobactérias predominaram

entre os isolados (82,1%). A susceptibilidade geral foi de 89,8% à nitrofurantoína, 84% à norfloxacin, 82% à gentamicina, 75,3% à cefalotina, 63,4% ao sulfazotrim e 45,7% à ampicilina. No mesmo estudo ainda foi comparado o perfil de susceptibilidade, observado no antibiograma, com as prescrições empíricas. Dos 94 prontuários estudados, em 80,8% (76/94) constavam antibióticos prescritos. Em 62,8% (59/94) deles iniciou-se o tratamento empiricamente e em 18% (17/94) aguardou-se o resultado do antibiograma para a tomada de decisão. Na comparação entre o perfil de susceptibilidade, com as prescrições empíricas, foi observado que em 81,4% dos casos os antimicrobianos prescritos apresentaram sensibilidade no antibiograma e em 18,6% dos casos estavam resistentes. O antibiótico mais prescrito empiricamente foi a norfloxacin, onde as *E. coli* isoladas de infecções comunitárias e hospitalares apresentaram resistência de 11,6% e 15,8%, respectivamente. Outras enterobactérias apresentaram taxas de 5,9% e 12,5%. Os autores concluíram que as taxas de resistência inferiores a 20%, entre os principais agentes, mostraram que a norfloxacin é adequada para ser utilizada como terapia empírica.

Da Silva et al (2014) analisaram 53 laudos de uroculturas provenientes de mulheres grávidas, no Estado de Goiás e mostraram que a *E. coli* foi o uropatógeno mais prevalente, sendo o causador de 67,9% das infecções no trato urinário, seguido por *Klebsiella* sp (7,5%). Quanto ao perfil de resistência encontrado, foi possível observar que a ampicilina foi o antibiótico com o maior percentual de resistência (45,5%), seguido por cefalotina (39,2%), sulfametoxazol-trimetoprima (26,7%), ácido pipemídico (28%), ácido nalidíxico (24%), ofloxacin (9,1%), norfloxacin (7,7%), gentamicina (6,5%), levofloxacin (6,3%), ciprofloxacina (4,4%), cefepima (4,2%), nitrofurantoína (3,3 %) e amicacina (3,2%). Não foi encontrada resistência frente à cefotaxima, ceftriaxona e imipenem. Foi observado também que um terço das amostras de *E. coli* apresentou resistência a três ou mais antimicrobianos.

No presente estudo, os antibióticos para os quais foram detectados os maiores percentuais de resistência são: imipenem, cefazolina e ampicilina. Em contraste, observou-se que nenhum dos isolados estudados expressou resistência frente à ceftaxima, cefepima, meropenem e amicacina.

A cefazolina, uma cefalosporina de primeira geração, é ativa para estafilococos e estreptococos e têm atividade moderada para *E. coli* isoladas na comunidade. Por ser de 1ª geração, é muito utilizada em casos de alergia à penicilina, além disto é amplamente utilizada como profilaxia na maioria dos pré-operatórios (BRASIL, 2007b,

PIRES et al, 2012). O elevado percentual de resistência observado para a cefazolina pode ser justificado pela relação com as altas taxas de consumo destas drogas, pois o seu uso não criterioso induz ao aumento de resistência de uma forma geral (PAVIANI et al, 2004).

Já o imipenem é um antibiótico pertencente ao grupo dos carbapenêmicos. É um antimicrobiano de amplo espectro de ação, portanto, este fármaco não deve ser utilizado como tratamento empírico de infecções. O imipenem é utilizado principalmente no tratamento de infecções hospitalares graves, quando outras drogas não se mostram eficazes devido à resistência bacteriana. É frequentemente utilizado em Unidades de Tratamento Intensivo, para infecções causadas por microrganismos multirresistentes ou quando se suspeita que a infecção é causada por mais de um microrganismo (POSSEBON; CAMARGO, 2003; BRASIL, 2007b,).

Os dados na literatura sobre resistência microbiana a antibióticos carbapenêmicos, em efluentes não hospitalares são escassos, entretanto, começam a surgir relatos nesse sentido. Uma pesquisa recente, realizada em Portugal, em amostras de um rio impactado com diferentes fontes de poluição (agrícola, industrial e doméstica) revelou a presença de cepas bacterianas de diferentes espécies resistentes ao imipenem em baixos percentuais, sendo 2,7% dos isolados representados pelas enterobactérias. Os autores sugeriram que o baixo percentual de resistência a esse antibiótico está relacionado às regras restritivas de administração da droga no país (TACÃO; CORREIA; HENRIQUES, 2015). No mesmo estudo, foram pesquisados genes de resistência responsáveis pela produção de beta-lactamases. Diversos genes de resistência foram detectados em *P. aeruginosa* e *Stenotrophomonas* mas não nas enterobactérias e os autores sugerem que a maioria dos mecanismos de resistência, neste caso, seja de origem intrínseca.

Por outro lado, os altos percentuais de resistência ao imipenem encontrados no nosso estudo, podem indicar um reflexo do uso excessivo do antibiótico em algumas regiões, resultando na presença de cepas resistentes. Essas cepas, provavelmente originárias de indivíduos submetidos em algum momento ao tratamento com essa droga, poderiam através de transferência horizontal de genes disseminar essa resistência para outros microrganismos presentes nos locais estudados, e esses conseqüentemente transmitirem para outros e assim por diante. Outros mecanismos adquiridos por mutações também não podem ser descartados. De qualquer forma, é intrigante a resistência encontrada pois algumas cepas

ambientais não apresentaram resistência significativa a outros antimicrobianos (exemplo: *E. coli* E3B; *K. pneumoniae* EK7C). Essas cepas merecem uma investigação mais aprofundada sobre a resistência encontrada.

Foi realizada análise estatística para comparar a resistência aos antibióticos entre as cepas ambientais e da comunidade, tendo sido detectadas diferenças significativas entre esses dois grupos. Os isolados ambientais mostraram níveis de resistência superiores aos isolados da comunidade. Este fato também pode ser reflexo da presença de substâncias, como desinfetantes e amaciantes à base de compostos catiônicos nos efluentes estudados que podem ocasionar alterações na susceptibilidade da microbiota ambiental (BUFFET-BATAILLON et al, 2012). Segundo Baquero et al (2008), os ambientes podem ser classificados como reatores genéticos para o desenvolvimento e disseminação de resistência: 1) as microbiotas humana e animal são o primeiro reator, onde antibióticos usados em terapêutica e em prevenção exercem sua ação. Os demais reatores são: 2) os estabelecimentos de assistência à saúde, fazendas, criações de animais ou qualquer outro local onde indivíduos susceptíveis estejam juntos e possibilitem a troca de microrganismos; 3) o esgoto e qualquer outro tipo de resíduo biológico, como estações de tratamento de esgoto; e 4) por último o solo e os ambientes aquáticos superficiais e profundos.

Como já citado, a disseminação de bactérias resistentes e de genes de resistência depende de diferentes fatores, principalmente, da pressão seletiva devido ao uso de antimicrobianos e a transferência horizontal.

Dentre as medidas empregadas para controlar e prevenir a disseminação de microrganismos está o uso rotineiro de biocidas. Esses produtos são amplamente empregados e portando são descartados em esgotos e assim compõem os efluentes das mais diversas origens (domésticos, industriais, hospitalares).

Os procedimentos de desinfecção vêm sendo utilizados pelo homem para as mais diversas finalidades, com o objetivo principal de impedir ou interromper a disseminação de microrganismos evitando que esses organismos alcancem indivíduos susceptíveis a infecções, além de evitar também a contaminação de ambientes e de produtos.

Os desinfetantes de uso geral fazem parte da rotina prática não só nos lares, como também nos mais diversos estabelecimentos, inclusive industriais. A diminuição da susceptibilidade aos biocidas não é um fenômeno novo, tem sido observado em cepas bacterianas há longo tempo. Entretanto, somente mais recentemente tem sido

dada atenção a essa questão. Isso se deve a questionamentos sobre a diminuição da susceptibilidade a biocidas e uma possível resistência cruzada aos antibióticos, devido ao uso indiscriminado de desinfetantes e de outros biocidas (RUSSELL, 2002a, 2004). Segundo o *Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks* (SCENIHR) (2009) é importante avaliar corretamente os riscos de selecionar bactérias resistentes aos antibióticos pelo uso de biocidas e entender a seleção e disseminação de organismos resistentes aos biocidas. Portanto, é de interesse para saúde pública verificar se cepas microbianas presentes no ambiente, e originárias de indivíduos, são suscetíveis aos desinfetantes usados comumente pela população.

Nesse contexto, na presente investigação, os isolados foram avaliados quanto à susceptibilidade a compostos quaternários de amônio. A CIM do CBA para todos os isolados estudados variou de 7,82 µg/mL a 62,5 µg/mL.

Duas cepas ambientais (uma *E. coli* e uma *K. pneumoniae*) e uma cepa de *K. pneumoniae* de origem comunitária apresentaram MIC de 62,5 µg/mL. Essas cepas apresentaram resistência significativa aos antibióticos: *E. coli* resistente ao imipenem e norfloxacin, e *K. pneumoniae* resistente à ampicilina, ampicilina+sulbactam, cefazolina e aztreonam.

Abuzaid et al (2012), estudando a atividade do cloreto de benzalcônio frente a cepas hospitalares de *K. pneumoniae* encontraram CIM variando de 16 a 64 mg/L, e consideraram isolados com CIM superiores a 32 mg/L com susceptibilidade diminuída a esse composto. Usando o critério de Abuzaid et al (2012) como base, observou-se no presente estudo que 73% dos isolados estudados apresentaram CIM de 31,25 µg/mL, o que conseqüentemente pode também significar uma diminuição da susceptibilidade ao cloreto de benzalcônio empregado no estudo. Esses resultados também chamam a atenção quando comparados aos de Pereira (2013) em seu estudo com 17 isolados de *Acinetobacter baumannii*, dois isolados de *Acinetobacter nosocomialis* e um isolado de *Acinetobacter pittii*. O autor observou que a CIM do desinfetante à base de composto quaternário de amônio variou de 6 ppm a 14 ppm, CIM bem inferiores aos determinados no presente estudo.

No presente estudo, foi aplicado método estatístico visando correlacionar multirresistência aos antibióticos e diminuição da susceptibilidade ao biocida. A comparação mostrou não ter ocorrido diferença significativa entre os grupos, não demonstrando correlação entre multirresistência a antibióticos e susceptibilidade diminuída ao biocida. Esses dados estão de acordo com Soumet, Ragmbeau e Maris

(2005) que encontraram cepas de *Listeria monocytogenes* resistentes ao cloreto de benzalcônio, mas não evidenciaram resistência cruzada com os antibióticos. Por outro lado, Kõljalg, Naaber e Mikelsaar (2002) concluíram que cepas resistentes aos antibióticos eram menos susceptíveis à clorexidina. Carson et al (2008) avaliaram o efeito do uso constante de desinfetante à base de QAC e antisséptico à base de triclosan, em ambiente domiciliar, sobre a susceptibilidade de bactérias desses ambientes ao cloreto de benzalcônio e aos antibióticos. Concluíram que para as bactérias Gram-negativas existiu uma associação significativa entre CIM do cloreto de benzalcônio elevadas e resistência aos antibióticos, porém, o mesmo não ocorreu em relação às bactérias Gram-positivas.

O assunto continua controverso, havendo necessidade de estudos mais ampliados, incluindo ainda outros princípios ativos.

A definição de resistência a biocidas é fortemente relacionada à metodologia empregada. Ao contrário dos antibióticos, não existe um padrão definido para classificar uma bactéria como resistente ou susceptível a um biocida e a determinação dos limites é com frequência arbitrária (SOMET; RAGIMBEAU; MARIS, 2005). As concentrações de uso são normalmente muito superiores ao CIM, de forma que, pequenos aumentos no CIM podem não ter significado na prática.

A diminuição da sensibilidade aos biocidas é frequentemente determinada em termos de CIM (NG et al, 2002, COLE et al, 2003). Os ensaios de CIM são úteis para uma avaliação inicial, mas não são suficientes para demonstrar que uma redução na susceptibilidade ocorra nas concentrações reais de uso dos produtos (RUSSEL, 2004). A aplicação dos biocidas, em particular os desinfetantes, tem como objetivo matar os microrganismos e não simplesmente inibi-los.

Além da determinação do CIM, no presente estudo 19 isolados foram submetidos ao Método da Diluição de Uso para avaliar a sua susceptibilidade frente a um produto desinfetante de uso geral à base também de cloreto de benzalcônio. Todas as cepas avaliadas mostraram-se susceptíveis ao desinfetante ao qual foram expostas.

O Método da Diluição de Uso emprega cilindros carreadores e prevê a utilização de meios de subcultura com neutralizantes, de forma a garantir os resultados analíticos. No presente trabalho foi empregado como meio de subcultura, o caldo Lethen que possui em sua formulação lecitina e polissorbato 80 que neutralizam os compostos quaternários de amônio. A neutralização é uma etapa de

grande importância em qualquer método para avaliação de eficácia de desinfetantes. Uma neutralização inadequada permite que o produto possa agir por um tempo maior que o recomendado, podendo gerar resultados falso-positivos (RUSSEL, 1981; ESPIGARES et al, 2003). Vários controles foram realizados de forma a garantir o resultado final.

As contagens dos microrganismos teste sobre os cilindros carreadores constituem uma etapa imprescindível para que se possa ter uma reprodutibilidade do método. No presente estudo, todas as contagens, mostraram-se dentro do limite preconizado no método, garantindo assim, uma carga microbiana uniforme nos cilindros carreadores.

A susceptibilidade reduzida aos biocidas em espécies bacterianas ocorre por mecanismos intrínsecos ou adquiridos. Como para os antibióticos, entre esses mecanismos estão os sistemas multidroga de efluxo que também atuam para biocidas. Em bactérias Gram-positivas, a maioria dos determinantes de efluxo estão codificados em plasmídeos e são da família *small multidrug regulator* (SMR), como por exemplo QacG e QacH, ou da família *major facilitator* (MF) (Qac A/B). Em bactérias Gram-negativas, os sistemas de efluxo capazes de acomodar biocidas também são transportadores multidroga e incluem QacE e QacE Δ 1 (SMR). Os genes determinantes desses sistemas são carregados por integrons de classe 1, sendo que o gene *qacE Δ 1* também ocorre acompanhado do gene de resistência a sulfonamida *sul1* em diversas espécies, inclusive em enterobactérias (PAULSEN et al, 1993; KÜCKEN; HEINZ-HUBERT; KAUKFERS, 2000).

A pesquisa do gene *qacE Δ 1* foi realizada em todos os 70 isolados estudados nesse trabalho, porém em nenhuma das cepas foi detectada a presença deste gene. O gene *qacE Δ 1* normalmente está associado a integrons classe 1. A não detecção desse gene pode significar a presença de integrons da classe 1 com outras conformações, como por exemplo carregando o gene *qacF* (ZOU et al, 2014). A diminuição da susceptibilidade ao composto quaternário de amônio, observada em alguns isolados, pelos valores superiores da CIM, provavelmente é reflexo de mecanismo que não envolve o gene *qacE Δ 1*, podendo estar presentes outros determinantes de resistência, como genes cromossômicos (*emrE*), conhecidos como codificadores de diminuição da susceptibilidade a compostos quaternários de amônio (ZOU et al, 2014). Segundo Azadpour et al (2015), a diminuição da susceptibilidade de isolados clínicos de *K. pneumoniae* frente a um composto quaternário de amônio

foi independente da presença do gene *qacEΔ1*, o mesmo tendo sido observado por outros pesquisadores em estudo com cepas de *P. aeruginosa* (ROMÃO et al, 2011).

O presente trabalho evidenciou resistência bacteriana significativa em relação a alguns antibióticos. Os dados encontrados são altamente relevantes para a saúde da população, uma vez que estes isolados são provenientes de amostras de fezes humanas de indivíduos saudáveis, de esgoto doméstico, estações de tratamento de esgoto, rios, mangues e valões abertos. Efluentes sem tratamento adequado podem atingir outros locais, como por exemplo o solo e outros ambientes aquáticos, ocasionando a disseminação da resistência aos antimicrobianos nestes locais, gerando agravos à saúde. Além disso, os dados indicam a presença de isolados com diminuição da susceptibilidade aos biocidas provavelmente em função do consumo intenso de desinfetantes e outros produtos contendo biocidas.

Ressalta-se que estudos que exploram esses aspectos são escassos no Brasil, e os resultados obtidos nesse estudo podem contribuir para a avaliação da situação em nosso país. Os dados mostram que deve existir uma maior preocupação com microrganismos resistentes no ambiente e na comunidade, por parte dos órgãos de vigilância em saúde, destacando-se a vigilância sanitária e ambiental, visando assim prevenir a disseminação de microrganismos resistentes aos antimicrobianos.

6 CONCLUSÕES

- Foram identificados isolados de *E. coli* em 63% das amostras comunitárias e 57% das amostras ambientais e de *K. pneumoniae* em 34% das amostras comunitárias e 42% das amostras ambientais;
- Foi detectado um isolado de *K. oxytoca* entre as amostras ambientais;
- Esse estudo revelou a existência de cepas resistentes que estão sendo disseminadas através de indivíduos saudáveis da comunidade e que não fizeram o uso de antibióticos recentemente;
- Foi observada a existência de cepas resistentes e multirresistentes aos antibióticos que estão sendo disseminadas através do meio ambiente, por meio de esgoto doméstico, rio, valões, mangue impactados por esgoto doméstico e de uma estação de tratamento de esgoto;
- Os isolados estudados se mostraram resistentes a diversos antibióticos, com os maiores percentuais para ampicilina, cefazolina e imipenem;
- Foram detectados percentuais significativos de resistência ao imipenem em amostras ambientais de *E. coli* e de *K. pneumoniae*;
- Foram observados 12 diferentes perfis de resistência nas cepas de *E. coli*, e nove nos isolados de *Klebsiella* ambientais. Já nos isolados de origem comunitária foram observados nove perfis em *E. coli* e quatro em *K. pneumoniae*;
- Quarenta e um por cento das cepas de *K. pneumoniae* ambientais foram consideradas multirresistentes aos antibióticos; já nos isolados de *E. coli* a multirresistência foi detectada em 13% das cepas;

- Foram detectadas diferenças significativas em relação à resistência aos antibióticos entre os isolados de origem ambiental e comunitária: os isolados ambientais mostraram níveis de resistência superiores aos isolados da comunidade;
- Foi observado que o CIM do cloreto de benzalcônio foi de 31,25 µg/mL em 73% dos isolados estudados e de 62,5 µg/mL em quatro cepas, podendo significar uma diminuição da susceptibilidade ao cloreto de benzalcônio empregado no estudo;
- Dezenove cepas bacterianas foram submetidas ao Método da Diluição de Uso e se mostraram susceptíveis ao desinfetante de uso geral à base de compostos quaternários de amônio;
- No presente estudo não foi observada correlação significativa entre a diminuição da susceptibilidade aos biocidas e a resistência cruzada aos antibióticos.
- Os dados mostram que deve existir uma maior preocupação por parte dos órgãos de vigilância em saúde, em especial quanto à vigilância sanitária e ambiental, visando controlar e prevenir a disseminação de microrganismos resistentes aos agentes antimicrobianos que podem pôr em risco a saúde da população.

REFERÊNCIAS

ABUZAID, A.; HAMOUDA, A.; AMYES, S. G. *Klebsiella pneumoniae* susceptibility to biocides and its association with *cepA*, *qacΔE* and *qacE* efflux pump genes and antibiotic resistance. **J Hosp Infect.**, v. 81, n. 2, p. 87-91, 2012.

ALLEN, H. K. et al. Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. **Nat Rev Microbiol.**, v. 8, p. 251-259, 2010.

ALÓS, J-I. Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. **Enferm Infecc Microbiol Clin.**, v. 33, n. 10, p. 692–699, 2015.

AMOS, G. C. A. et al. Waste water effluent contributes to the dissemination of CTX-M-15 in the natural environment. **J Antimicrob Chemother.**, v. 69, n. 7, p.1785-1791, 2014.

ANDRADE, F. M. F; MORAIS, L. S. **Avaliação das concentrações de coliformes no afluente e efluente da ETE Goiânia em 2007**. 2008. 13 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Faculdade de Engenharia Ambiental, Universidade Católica de Goiás, Goiânia, 2007.

ANDREMONT, A. Commensal flora may play key role in spreading antibiotic resistance. **ASM News**. v. 69, n12, p. 601–607, 2003.

ARUMUGAM M, R. J. et al. Enterotypes of the human gut microbiome. **Nature**, v. 473, n. 7346, p. 174-80, 2011.

AZADPOUR, M. et al. Presence of *qacEΔ1* and *cepA* genes and susceptibility to a hospital biocide in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* in Iran. **Trop Biomed.**, v. 32, n.1, p. 109–115, 2015.

BAIL, L.; ITO, C, A. S.; ESMERINO, L. A. Infecção do trato urinário: comparação entre o perfil de susceptibilidade e a terapia empírica com antimicrobianos. **RBAC.**, v. 38, n. 1, p. 51-56, 2006.

BAILEY, J. K. et al. Commensal *Escherichia coli* of healthy humans: a reservoir for antibiotic-resistance determinants. **J Med Microbiol.**, v. 59, p. 1331–1339, 2010.

BAQUERO, F; MARTÍNEZ, J. L; CANTÓN, R. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. **Curr Opin Biotechnol.**, v. 19, p. 260 - 265, 2008.

BARBOSA, D. A. et al. Microbiological quality of water drinking fountains of a university campus in Ipatinga, Minas Gerais. **Rev Nutr.**, v. 3, n. 5, p. 505-517, 2009.

BLAIR, A. M. J. et al. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nat Rev Microbiol.**, v.13, p. 42–5, 2015.

BLASCO, M. D; ESTEVE, C; ALCAIDE, E. J. Multiresistant waterborne pathogens isolated from water reservoirs and cooling systems. **J Appl Microbiol.**, v. 105, n.2, p. 469-475, 2008.

BLOCK, S. S. Historical review. In: BLOCK, S. S (ed). **Disinfection, Sterilization and Preservation**. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.2011. p. 3-18.

BRASIL. **Lei n.º 6360, de 23 de setembro de 1976**, que submete ao sistema de vigilância sanitária os medicamentos, insumos farmacêuticos, drogas, correlatos, cosméticos, produtos de higiene, saneantes e outros. Diário Oficial [da República Federativa do Brasil], Brasília, setembro, 1977.

BRASIL. Lei nº 8.080, de 19 de setembro de 1990. Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] União República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 20 set. 1990. Seção 1.

BRASIL. Resolução Anvisa RDC nº 14 de 28 de fevereiro de 2007. Aprova o Regulamento Técnico para produtos saneantes com ação antimicrobiana harmonizado no âmbito do Mercosul. **Diário Oficial [da] União República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 05 mar. 2007a. Seção 1.

BRASIL. Resolução ANVISA RDC nº 59 de 17 de dezembro 2010. Dispõe sobre os procedimentos e requisitos técnicos para a notificação e o registro de produtos saneantes e dá outras providências. **Diário Oficial [da] União República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 22 dez. 2010a. Seção 1.

BRASIL. Resolução Anvisa RDC nº 35, de 16 de agosto de 2010. Dispõe sobre o Regulamento Técnico para produtos saneantes com ação antimicrobiana utilizados em artigos críticos e semicríticos. **Diário Oficial [da] União República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 18 ago. 2010b.

BRASIL. Resolução CONAMA nº 430, de 15 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, do Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA. **Diário Oficial [da] União República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 16 de mai. 2011.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Módulo 6: Detecção e identificação de bactérias de importância médica. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Brasília, 2013.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Antimicrobianos – Bases Teóricas e Uso Clínico. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Brasília, 2007b. Disponível em: <
http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_w eb/modulo1/conceitos.htm>. Acesso em: 10 nov. 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 2.914, 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] União República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 14 de dez. 2011.

BRASIL. Ministério das Cidades. Secretaria Nacional de Saneamento Ambiental – **Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento: Diagnóstico dos Serviços de Água e Esgotos** – 2012. Brasília: SNSA/MCIDADES, 2014.

BUFFET-BATAILLON, S. et al. Emergence of resistance to antibacterial agents: the role of quaternary ammonium compounds — a critical review. **Int J Antimicrob Agents.**, v. 39, n. 5, p. 381-9, 2012.

CAUMO, K. Resistência bacteriana no meio ambiente e implicações na clínica hospitalar. **Rev Liberato.**, v. 11, n. 16, p. 183-190, 2010.

CANAL, N. **Caracterização de resistência a antimicrobianos e diversidade genética em *Escherichia coli* isolada de amostras de água da Lagoa dos Patos, RS**. 2010. 88f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Ciências Básicas da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente. Porto Alegre – RS. 2011.

CARNEIRO, M. et al. Antibiotic prescription in a teaching hospital: a brief assessment. **Rev Assoc Méd Bras.**, v. 57, n. 4, p. 421-4, 2011.

CARSON, R. T. et al. Use of antibacterial consumer products containing quaternary ammonium compounds and drug resistance in the community. **J Antimicrob Chemother.**, v. 62, n. 5, p. 1160-1162, 2008.

COPUR-CICEK, A. M. D et al. Antimicrobial resistance patterns and integron Carriage of *Escherichia coli* isolates causing community-acquired infections in Turkey. **Ann Lab Med.**, v. 34, p. 139-144, 2014.

CHANG, L. W. K. et al. Managing a nosocomial outbreak of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: an early Australian hospital experience. **Intern Med J.**, v. 45, n.10, p. 1037-1043, 2015.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard — 9. ed. Wayne, P. A.: **Clinical and Laboratory Standards Institute**. 2012.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Wayne, P. A.: **Clinical and Laboratory Standards Institute**. 2013.

CHAGAS, T. P. et al. Multiresistance, beta-lactamase-encoding genes and bacterial diversity in hospital wastewater in Rio de Janeiro, Brazil. **J Appl Microbiol.**, v. 111, n. 3, p. 572-581, 2011.

COLE, E. C. et al. Investigation of antibiotic and antibacterial agent cross resistance in target bacteria from homes of antibacterial product users and nonusers. **J Appl Microbiol.**, v. 95, p. 664-676, 2003.

DA SILVA, J. C. et al. Estudo retrospectivo de bactérias Gram-negativas isoladas a partir de uroculturas e determinação de seu perfil de resistência. **News Lab**, n. 122, p. 82-90, 2014.

DE FILIPPO C. et al. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. **Proc Natl Acad Sci USA.**, v. 107, n. 33, p. 14691-1496, 2010.

DEL FIOLE, F. S.; MATTOS FILHO, T. R.; GROPPA, F. C. Resistência Bacteriana. **Rev Bras Med.**, v. 57, n.10, p. 1129-1140, 2000.

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

DROPA, M. et al. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* carrying the novel extended-spectrum beta-lactamase gene variants bla(SHV-40), bla(TEM-116) and the class 1 integron associated bla(GES-7) in Brazil. **Clin Microbiol Infect.**, v. 16, n. 6, p. 630-632, 2010.

ECKBURG, P. B. et al. Diversity of the human intestinal microbial flora. **Science**, v. 308, n. 5728, p. 1635–1638, 2005.

ESPIGARES, E. et al. Efficacy of some neutralizers in suspension tests determining the activity of disinfectants. **J Hosp Infect.**, v. 55, n. 2, p. 137-140, 2003.

ESTADO DO RIO DE JANEIRO. Secretaria de Estado de Obras. **Memorial Descritivo. Implantação do Coletor Tronco Timbo Faria**. Disponível em: <<http://www.rj.gov.br/web/seobras/exibeconteudo?article-id=849193>> Acesso em: 02 set. 2014.

FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA. São Paulo, 2015. Disponível em: <<https://www.sosma.org.br/projeto/rede-das-aguas/observando-os-rios/analise-da-qualidade-da-agua-2015/>>. Acesso em: 05 nov. 2015.

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

HEGSTAD, K. et al Does the wide use of quaternary ammonium compounds enhance the selection and spread of antimicrobial resistance and thus threaten our health? **Microb Drug Resist.**, v. 16, n. 2, p. 91-104, 2010.

HENZE, M.; COMEAU, Y. Wastewater Characterization. In: HENZE, M. et al. **Biological Wastewater Treatment - Principles, Modelling and Design**. 1. ed. London: IWA Publishing., p. 33- 52, 2008.

HERRUZO-CABRERA, R; VIZCAINO-ALCAIDE, M. J; FERNÁNDEZ-ACEÑERO, M.J. The influence of laboratory adaptation on test strains, such as *Pseudomonas aeruginosa*, in the evaluation of the antimicrobial efficacy of ortho-phthalaldehyde. **J Hosp Infect.**, v. 57, p. 217-222, 2004.

HUTTENHOWER, C et al. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. **Nature**, v. 486, n. 7402, p. 207-14, 2012.

INFANTE, B. et al. Acquired sulphonamide resistance genes in faecal *Escherichia coli* from healthy children in Bolivia and Peru. **Int J Antimicrob Agents.**, v. 25, p. 308–312, 2005.

INSTITUTO TRATA BRASIL. **Situação Saneamento no Brasil**. São Paulo, 2013. Disponível em: < <http://www.tratabrasil.org.br/saneamento-no-brasil#MA> >. Acesso em: 05 nov. 2015.

JERNBERG, C. et al. Long-term impacts of antibiotic exposure on the human intestinal microbiota. **Microbiol.**, v. 156, p. 3216–3223, 2010.

KESTER, M. et al. **Farmacologia**. Série Elsevier de formação básica integrada. Rio de Janeiro: Mosby Elsevier, 2008.

KOHANSKI, M. A.; DWYER, D. J.; COLLINS, J. J. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. **Nat Rev Microbiol.**, v. 8, n. 6, p. 423–435, 2010.

KÖLJALG, S.; NAABER, P.; MIKELSAAR, M. Antibiotic resistance as an indicator of bacterial chlorhexidine susceptibility. **J Hosp Infect.**, v. 51, p. 106-173, 2002.

KÜCKEN, D; HEINZ-HUBERT, F; KAUKFERS, P. M. Association of *qacE* and *qacEΔ1* with multiple resistance to antibiotics and antiseptics in clinical isolates of Gram-negative bacteria. **FEMS Microbiol Lett.**, v. 183, p. 95-98, 2000.

LAMBERT, P.A. Mechanisms of action of biocides. In: FRAISE, A. P.; LAMBERT, P. A.; MAILLARD, J-Y (Ed.). **RUSSELL, HUGO & AYLIFFE'S Principles and Practice of Disinfection, Preservation & Sterilization**. 4. ed. Oxford: Blackwell Publishing, 2004a. p.139-155.

LAMBERT, W. L. Evaluation of antimicrobial efficacy. In: FRAISE, A. P.; LAMBERT, P. A.; MAILLARD, J-Y (Ed.). **RUSSELL, HUGO & AYLIFFE'S Principles and Practice of Disinfection, Preservation & Sterilization**. 4. ed. Oxford: Blackwell Publishing, 2004b, p. 345-360.

LAWRENCE, J. G. Gene transfer, speciation, and the evolution of bacterial genomes. **Curr Opin Microbiol.**, v. 2, p. 519-23, 1999.

LEBLEBICIOGLU, H.; OZARAS, R.; SUNBUL, M. Role of co-trimoxazole for urinary tract infections in developing countries. **Lancet Infect Dis.**, v. 15, n. 7, p. 764-5, 2015.

LEVERSTEIN-VAN HALL. et al. Evidence of extensive interspecies transfer of integron mediated antimicrobial resistance genes among multidrug-resistant *Enterobacteriaceae* in a clinical setting. **J Infect Dis.**, v. 186, p. 49-56, 2002.

LI, X; BROWNAWELL, B. J. Quaternary ammonium compounds in urban estuarine sediment environments – A class of contaminants in need of increased attention? **Environ Sci Technol.**, v. 44, n. 19, p. 7561-7568, 2010.

LPSN. **List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature**. Genus: *Klebsiella*. 2015. Disponível em: < <http://www.bacterio.net/klebsiella.html> > acesso em: 11 fev. 2016.

MACHADO, E. et al. Commensal *Enterobacteriaceae* as reservoirs of extended-spectrum beta-lactamases, integrons, and sul genes in Portugal. **Frontiers Microbiology**. v. 8, p. 4 - 80, 2013.

MAGIORAKOS, A. P. et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clin Microb Infect.**, v. 18, n. 3, p. 268-281, 2012.

MARRA, A. R. **Análise dos fatores de risco relacionados à letalidade das infecções da corrente sanguínea hospitalares por *Klebsiella pneumoniae***. 2002. 69f (Dissertação de Mestrado) Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina. São Paulo, 2002.

MCDONNELL, G; RUSSELL, A. D. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. **Clin Microbiol Rev.**, v. 12, p. 147-179, 1999.

MEIRELLES-PEREIRA, F. et al. Ecological aspects; of the antimicrobial resistance in bacteria of importance to human infections. **Braz J Microbiol.**, v. 33, p. 287-293, 2007.

MENDES, R. L. et al. Metalo- β -lactamases. **J Bras Patol Med Lab.**, v. 42, n. 2, p. 103-113, 2006.

MEDINA-POLO, J. et al. Community-associated urinary infections requiring hospitalization: Risk factors, microbiological characteristics and patterns of antibiotic resistance. **Actas Urol Esp.**, v. 39, n. 2, p. 104-111, 2015.

MIRANDA, C. D.; CASTILLO, G. Resistance to antibiotic and heavy metals of motile aeromonads from Chilean freshwater. **Science Total Environmenta.** v. 224, p. 167, 1998.

MORAES, A . C . F. et al. Microbiota intestinal e risco cardiometabólico: mecanismos e modulação dietética. **Arq Bras Endocrinol Metabol.**, v. 58, n. 4, p. 317-327, 2014.

MURRAY, P. R. et al. **Manual of Clinical Microbiology.** 9. ed, Washington, DC: ASM Press, v. 2, 2009.

NATARO, J. P. et al. *Escherichia*, *Shiguella*, and *Salmonella*. In: VERSALOVIC. J. et al. **Manual of Clinical Microbiology.** 10. ed. Washington, DC: ASM Press, v. 1, p 603–626, 2011.

NUÑEZ, L; MORETTON, J. Disinfectant-resistant bacteria in Buenos Aires city hospital wastewater. **Braz J Microbiol.**, v. 38, p. 644-648, 2007.

NG, M. L. et al. Biocides and antibiotics with apparently similar actions on bacteria: is there potential for cross-resistance? **J Hosp Infect.**, v. 51, p. 147-149, 2002.

OLIVEIRA, D. V. **Avaliação do perfil de resistência a antimicrobianos de bactérias Gram-negativas isoladas nas águas do Arroio Dilúvio.** 2011. 84f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Ciências Básicas da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente. Porto Alegre – RS. 2011.

OTEO, J. et al. Antimicrobial-resistant invasive *Escherichia coli*, Spain. **Emerg Infect Dis.**, v. 11, n. 4, p. 546-553, 2005.

PATHAK, A. et al. Frequency and factors associated with carriage of multi-drug resistant commensal *Escherichia coli* among women attending antenatal clinics in Central India. **BMC Infect Dis.**, v. 13, p. 199, 2013.

PAULSEN, I. T. et al. The 3' conserved segment of integrons contains a gene associated with multidrug resistance to antiseptics and disinfectants. **Antimicrob Ag Chemother** v. 37, p. 761-768, 1993.

PAVIANI, E. R.; STADNIK, C. B.; HEINEK, I. Estudo da epidemiologia e perfil de sensibilidade de *Pseudomonas aeruginosa*. **Infarma**, v. 12, p. 11-12, 2004.

PEREIRA et al. Avaliação da acurácia de testes laboratoriais para detecção de amostras de *Klebsiella pneumoniae* produtora de betalactamase de espectro estendido. **J Bras Patol Med Lab.**, v. 39, n. 4, p. 301-308, 2003.

PHU, V.D. et al. Burden of Hospital Acquired Infections and Antimicrobial Use in Vietnamese Adult Intensive Care Units. **PLoS One.**, v. 11, n. 1, p. e0147544, 2016.

PIRES, M. C. S. et al. Prevalência e suscetibilidades bacterianas das infecções comunitárias do trato urinário, em Hospital Universitário de Brasília, no período de 2001 a 2005. **Rev Soc Bras Med Trop.**, v. 40, n. 6, p. 643-647, 2005.

PIRES, M. R. et al. Avaliação do uso de cefazolina como profilaxia antibiótica em procedimentos cirúrgicos. **Revista HCPA.**, v. 32, n. 1, p. 18-23, 2012.

POSSEBON, M.I; CAMARGO, E.A. Resistência bacteriana aos carbapenêmicos. **Rev. Bras. Med.**, v. 60, n. 6, p. 378-378, 2003.

POOLE, K. Efflux-mediated antimicrobial resistance. **J Antimicrob Chemoth.**, v. 56, p. 20-51, 2005.

POOLMAN J. T; WACKER M. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*, a common human pathogen: challenges for vaccine development and progress in the field. **J Infect Dis.**, v. 213, n. 1, p. 6-13, 2015.

PRADO, T. et al. Detection of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in effluents and sludge of a hospital sewage treatment plant. **Lett Appl Microbiol.**, v. 46, n. 1, p.136-41, 2008.

PRESTINACI, F.; PEZZOTTI, P.; PANTOSTI, A. Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon. **Pathog Glob Health.**, v. 7, p. 1-10, 2015.

PRZYGODDA, F.; DE BONA, E. A. M.; FALCONI, F. A. Quantificação de coliformes totais e *Escherichia coli* da água *in natura* dos municípios pertencentes a 10° regional da saúde do Estado do Paraná. **Anais do I Seminário Internacional de Ciência, Tecnologia e Ambiente.** 2009.

QIN, J. et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. **Nature**, v. 464, n. 7285, p. 59-65, 2010.

QUINN, P.J. et al. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas.** 1ª ed. Porto Alegre: Artmed. p. 512, 2005.

RAMOS, Y; ALONSO, G. Evaluación de la resistencia a agentes desinfectantes de bacterias aisladas de ambientes naturales. **Rev. Soc. Ven. Microbiol.**, v. 31, p. 130-137, 2011.

REBELLO, R. C. L.; REGUA-MANGIA, A. H. Potential enterovirulence and antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolates from aquatic environments in Rio de Janeiro, Brazil. **Sci Total Environ.**, v. 490, p. 19–27, 2014.

REINTHALER, F. F. et al. Antibiotic resistance of *E. coli* in sewage and sludge. **Water Res.**, v. 37, n. 8, p.1685-1690, 2003.

RICE, L. B. The clinical consequences of antimicrobial resistance. **Curr Opin Microbiol.**, v. 12, p. 476–481, 2009.

ROE, M.T. et al. Class 1 and Class 2 integrons in poultry carcasses from broiler house and poultry processing environments. **J Food Prot.**, v. 6, p. 1426-1431, 2003.

ROMÃO, C. M. P. A. Desinfecção e Esterilização Química. In: TEIXEIRA P., VALLE S. (orgs). **Biossegurança: Uma Abordagem Multidisciplinar.** FIOCRUZ. Rio de Janeiro. p.175-198, 2010.

ROMÃO, C. et al. Presence of *qacEΔ1* gene and susceptibility to a hospital biocide in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* resistant to antibiotics. **Curr Microbiol.**, v. 63, p 16-21, 2011.

ROLLIN, R. P. **Aplicação de diferentes métodos no controle de qualidade da atividade antimicrobiana de saneantes domissanitários**. 2012. 118f. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) – Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária; Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, 2012.

ROSEN, D. A. et al. Utilization of an intracellular bacterial community pathway in *Klebsiella pneumoniae* urinary tract infection and the effect of fimK on type 1 pilus expression. **Infect. Immun.** v. 76, p. 3337-3345, 2008.

ROSSI, D. J. et al. Evolution of resistance of *Klebsiella pneumoniae* in Londrina University Hospital from 2000 to 2011. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 36, n. 1, p. 267-274, 2015.

RUIZ, L. G. P. **Resistência aos beta-lactâmicos e detecção dos genes *blashv*, *blatem*, *blactx-m* e *blages* em Enterobacteriaceae isoladas de efluentes hospitalar e comunitário em um município do noroeste paulista**. 2010. 74 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, 2010. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/94851>>. Acesso em: 05 dez. 2015.

RUSSEL, A. D. Neutralization procedures in the evaluation of bactericidal activity. In: COLLINS, C. H. et al. **Disinfectantes: their use and evaluation of effectiveness**. London: Academic Press, 229p. 1981.

RUSSELL, A. D. Antibiotic and biocide resistance in bacteria: comments and conclusions. **J Appl Microbiol Symp 92(Suppl)**., p. 121-135, 2002a.

RUSSELL, A. D. Introduction of biocides into clinical practice and the impact on antibiotic-resistant bacteria. **J Appl Microbiol Symp 92(Suppl)**., p. 171-173, 2002b.

RUSSELL, A. D. Biocide use and antibiotic resistance: the relevance of laboratory findings to clinical and environmental situations. **Lancet Infect Dis.**, v. 3, p. 794-803, 2003.

RUSSELL, A. D. Bacterial adaptation and resistance to antiseptics, disinfectants and preservatives is not a new phenomenon. **J Hosp Infect.**, v 57, n. 2, p 97–104, 2004.

RUTALA, W. A; WEBER, D. J Disinfectants used for environmental disinfection and new room decontamination technology. **Am J Infect Control.**, v. 41, p. S36-S41, 2013.

SANTANA, T. C. F. S. et al. Perfil de resistência de *Escherichia coli* e *Klebsiella spp* isoladas de urocultura de comunidade do Município de São Luis - MA no período de 2005-2008. **Rev Patol Trop.**, v. 41, n. 3, p. 295-303, 2012.

SANTOS, D. F. **Características microbiológicas de *Klebsiella pneumoniae* isoladas no meio ambiente hospitalar de pacientes com infecção nosocomial.** 2007. 65f. (Mestrado em Ciências Ambientais e Saúde) - Universidade Católica de Goiás, Goiânia, 2007.

SCARPATE, E. C. B; COSSATIS, J. J. A presença da *Klebsiella pneumoniae* produtora de β - lactamase de espectro estendido no ambiente hospitalar. **Saúde & Amb. Rev.**, v.4, n.1, p.1-11, 2009.

SCENIHR - Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks (European Community). **Antibiotic Resistance Effects of Biocides.** 2009. Disponível em: <http://ec.europa.eu/health/ph_risks/committees/> Acesso em: 1 ago. 2014.

SCHEMBRI, M. A.; BLOM, J.; KROGFELT, K. A.; KLEMM, P. Capsule and fimbriae interaction in *Klebsiella pneumoniae*. **Intect. Immun.** v. 73, p. 4626-4633, 2005.

SCHEUTZ, F.; STROCKBINE, N. A. Genus I. *Escherichia*. In: BRENNER, D. J.; KRIEG, N. R.; STALEY, J. T. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.** 2.ed., New York: Springer. v. 2, p. 607-624, 2005.

SEIBERT, G. et al. Nosocomial infections by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase producing enterobacteria in a teaching hospital. **Einstein (São Paulo)**, v.12, n.3, p. 282-286, 2014.

SERVAIS, P; PASSERAT, J. Antimicrobial resistance of fecal bacteria in waters of Seine river watershed (France). **Sci Total Environ.**, v. 408, p.365-372, 2009.

SOMENSI, C. A. **Tratamento de efluentes hospitalares: uso de parâmetros físico-químicos, microbiológicos e ecotoxicológicos na avaliação de eficiência da ozonólise da associação sonólise/ozonólise.** 2013. 130f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia Ambiental) - Universidade Vale do Itajaí, Itajaí, 2013.

SOMET, C.; RAGIMBEAU, C.; MARIS, P. Screening of benzalkonium chloride resistance in *Listeria monocytogenes* strains isolated during cold smoked fish production. **Lett Appl Microbiol.**, v. 41, p. 291-296, 2005.

SALLOTO, G. R. et al. Pollution impacts on bacterioplankton diversity in a tropical urban coastal lagoon system. **PLoS One**. V. 7, n, 11, 2012.

TACÃO, M., CORREIA, I., HENRIQUES, I.S. Low prevalence of carbapenem-resistant bacteria in river water: resistance is mostly related to intrinsic mechanisms. **Microb Drug Resist.**, v 21, n. 5, p. 497-506, 2015.

TEZEL, U; PAVLOSTATHIS, S. G. Quaternary ammonium disinfectants: microbial adaptation, degradation and ecology. **Curr Opin Biotechnol.**, v. 33, p. 296- 304, 2015.

TOMASINO, S. Disinfectants. In: LATIMER, G. (Ed.) **Official methods of analysis of AOAC**. 19th ed. Gaithersburg: Association of Official Analytical Chemists, 2012. Cap 6.

VASQUES, G. R. M. et al. β -lactamase producing enterobacteria isolated from surveillance swabs of patients in a Cardiac Intensive Care Unit in Rio de Janeiro, Brazil. **Braz J Infect Dis.**, v. 15, n. 1, p. 28-33, 2011.

VERSALOVIC. J. et al. **Manual of Clinical Microbiology**. 10. ed. Washington, DC: ASM Press, v. 1, 2011.

VILLAR, H. E; BASERNI, M. N; JUGO, M. B; Faecal carriage of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* and carbapenem-resistant Gram-negative bacilli in community settings. **J Infect Dev Ctries.**, v. 7, n. 8, p. 630-634, 2013.

WALSH, C. Antibiotics: actions, origins, resistance. **Protein Sci.**, v. 13, n. 11, p. 3059–3060, 2003.

WALSH, T.R. et al. Metallo- β -lactamases: the quiet before the storm? **Clin Microbiol Rev.**, v. 18, p. 306–25, 2005.

WESSELS, S.; IGMER, H. Modes of action of three disinfectant active substances: A review. **Regul Toxicol Pharm.**, v. 67, p. 456–467, 2013.

WIDMER, A. F; FREI, R. Decontamination, disinfection and sterilization. In: MURRAY, P.R. et al. **Manual of Clinical Microbiology**. 10.ed. American Society of Microbiology. Washington DC. v. 1, p. 143-173, 2011.

ZOU, L. et al. Presence of disinfectant resistance genes in *Escherichia coli* isolated from retail meats in the USA. **J Antimicrob Chemother.**, v. 7, p. 1-6, 2014.

ANEXO A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

..... autoriza a utilização de material fezes fornecido pelo(a) mesmo(a). Está ciente de participar como voluntário(a) do projeto “Caracterização da susceptibilidade de amostras bacterianas ambientais e comunitárias frente a desinfetante à base de composto quaternário de amônio e antimicrobianos”.

Este estudo será realizado em laboratório e o seu objetivo é avaliar a susceptibilidade de isolados bacterianos de origem ambiental e da comunidade frente a um desinfetante e a antibióticos, incluindo a pesquisa do gene envolvido na resistência de bactérias a desinfetante. Estudos sobre esse assunto são muito importantes para a saúde pública pois permitirão verificar se certos micro-organismos estão resistentes a antibióticos e a desinfetantes e se estão sendo espalhados no ambiente, a partir de esgoto. Os benefícios esperados são de grande relevância para a ciência brasileira e contribuirão para a melhoria da vigilância sanitária, do controle desses produtos e portanto da saúde pública. A partir das fezes coletadas serão isolados micro-organismos que serão estudados no laboratório.

Não há riscos e desconforto na coleta desse material (fezes), pois esse material é obtido de forma natural, fisiológica. A coleta do material será feita pelo(a) mesmo(a), da forma natural de obtenção de fezes, em sua casa ou onde quiser coletar e tem ciência de que a amostra das suas fezes não será armazenada.

Tem também conhecimento de que está participando como voluntário(a) e que possui plena liberdade para recusar-se a participar ou retirar o seu consentimento, desistindo de participar em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e de que também serão mantidos sigilo, confidencialidade e privacidade sobre a sua participação durante todas as fases da pesquisa. Poderá perguntar e acompanhar a pesquisa e solicitar esclarecimento em qualquer fase do trabalho à pesquisadora responsável ou ao Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEP), pois está ciente também de que pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEP) para esclarecimento de eventuais dúvidas relativas à eticidade da pesquisa, contatando diretamente: Comitê de Ética em Pesquisa com Seres

Humanos (CEP FIOCRUZ-IOC), situado na Av. Brasil, 4036, sala 705, campus Expansão, Manguinhos. Rio de Janeiro. RJ. Tel.: 21-38829011; cepfiocruz@ioc.fiocruz.br.”

Está ciente de que não haverá bônus financeiro, ou seja, não receberá nenhum tipo de pagamento por essa participação pois ela é totalmente voluntária.

Autoriza que os dados obtidos sejam publicados, sem a sua identificação, para as fontes científicas que o responsável por este projeto considere adequadas. Concorde também em fornecer os dados: idade e sexo para análise dos dados.

Tem acesso aos telefones e endereço da pesquisadora responsável e de onde será realizada esta pesquisa.

Pesquisadora: Célia Maria Carvalho Pereira Araujo Romão

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde/ Fundação Oswaldo Cruz

Av. Brasil, 4365. Manguinhos. Rio de Janeiro. RJ. CEP: 21045-900.

Telefones: 21 3865 5174 (horário comercial)

21 2294 7383 ou 21 99882 7818 (particular da pesquisadora)

....., *após a leitura e de esclarecer suas dúvidas, confirma a sua participação como voluntário(a) no presente estudo e está ciente de que receberá uma via deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.*

Rio de Janeiro,

Assinatura do voluntário

Assinatura da pesquisadora responsável

Data da última revisão: 29/12/2014