

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE

**CARACTERIZAÇÃO DO RESISTOMA DE UMA LAGUNA COSTEIRA DO SUL DO
BRASIL**

BELIZE RODRIGUES LEITE

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Gertrudes Corção

Porto Alegre

Abril/2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE

**CARACTERIZAÇÃO DO RESISTOMA DE UMA LAGUNA COSTEIRA DO SUL DO
BRASIL**

Belize Rodrigues Leite

Mestre em Microbiologia Agrícola e do Meio
Ambiente.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Área de concentração: Microbiologia do Ambiente
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Gertrudes Corção

Porto Alegre, Rio Grande do Sul - Brasil

Maio/2018

CIP - Catalogação na Publicação

Leite, Belize
CARACTERIZAÇÃO DO RESISTOMA DE UMA LAGUNA COSTEIRA
DO SUL DO BRASIL / Belize Leite. -- 2018.
147 f.
Orientador: Gertrudes Corção.

Tese (Doutorado) -- 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, BR-RS, 2018.

1. Microbiologia ambiental. 2. Genes de resistência
a antimicrobianos. 3. Impacto antrópico. 4. Ambientes
costeiros. 5. Laguna Tramandaí. I. Corção, Gertrudes,
orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

“Por que pesquiso? Porque minha ignorância me insulta. Porque a mediocridade me atormenta. Porque não estou na vida a passeio. O mundo me convoca, me provoca, me desafia a buscar respostas para todos os seus/meus/nossos porquês. Pesquiso porque a miséria me ofende. Porque existe uma história sendo escrita e não gosto do que leio. Poderia fechar o livro e achar – como tantos acham – que com isso cessa minha responsabilidade na autoria dessa história. Mas não posso. Pesquiso porque me reconheço como gente no mundo. Um mundo que grita por socorro, que exige minha presença, que exige muito mais, do que simplesmente, que eu faça a minha parte, exige que eu faça parte, mesmo com todos os meus defeitos e limites. (...) O saber é minha paz e meu tormento. (...) Talvez a pesquisa não preencha todas as lacunas, as dúvidas, as angústias que o cotidiano marca em nós, mas com certeza o caminho que trilhamos em busca de nossas respostas, nos torna professores melhores para as nossas crianças, profissionais melhores para nossas escolas e sujeitos melhores para transformarmos sim, o mundo em um lugar melhor.”

Andrea Serpa

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Beatriz e Miguel, pela vida, pelo amor e tudo que me foi dado: nada do que eu escrevesse poderia expressar toda a minha gratidão. Sempre será primeiro por vocês e depois por mim!

À professora Gertrudes, pela confiança e paciência. A toda a equipe do Laboratório 166 (novo 222F), especialmente à Ana Pastore, Marina Bastos, Natália Canal, Daniel Meyer, Lúcio Amorim, Magda Chaves, Athos Topor, Laura Nunes, Aline Müller, Stefani Corrêa e Débora Ribeiro: vocês tornaram o laboratório um ambiente mais divertido e acolhedor, o que fez toda a diferença para o desenvolvimento deste trabalho. À professora Patricia Valente e aos pesquisadores Luiz Gustavo e Caroline Pisseti: pela disponibilidade em contribuir com este trabalho. À pesquisadora Adriana Giongo, por redimensionar ideias, inspirar a pesquisa colaborativa e oportunizar novos saberes. Às técnicas Cacinele Rocha, Amanda Domingues, Crhis Krebs, Sílvia Barbosa, Louise Jank e Letícia Marconatto, ao técnico Fabiano Barreto e ao amigo Rafael Mastracusa: a contribuição de vocês foi fundamental para a realização de diversas etapas deste trabalho. Às colegas Danielle Pagani, Raíssa Nunes e Sílvia Lentz: sou extremamente grata por ter tido a parceria de vocês em minha trajetória acadêmica.

Aos demais amigos (se citar nomes arrisco esquecer alguém), que se mantiveram ao meu lado partilhando alegrias e me dando suporte emocional ao longo destes quatro anos. Aos irmãos felino (Bem) e canino (Bob), que silenciosamente me acompanharam e tornaram menos dura a solidão da escrita deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

CARACTERIZAÇÃO DO RESISTOMA DE UMA LAGUNA COSTEIRA DO SUL DO BRASIL

Autor: Belize Rodrigues Leite. Orientadora: Prof^a. Dr^a. Gertrudes Corção.

RESUMO

A maior parte dos antimicrobianos passa inerte pelo metabolismo, podendo contaminar corpos hídricos receptores de efluentes. Tanto o mau uso destes fármacos quanto a degradação de habitats naturais contribuem significativamente para a evolução de genes de resistência. O efeito das atividades antrópicas sobre a veiculação destes genes tem sido pouco pesquisado em ecossistemas costeiros brasileiros. Este estudo pesquisou a presença dos genes *bla*_{CTX-M} (grupos 1, 2, 8, 9 e 25), *bla*_{GES-like}, *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-51}, *bla*_{SHV-like}, *bla*_{SPM-1}, *bla*_{TEM-like}, *bla*_Z, *mecA*, *mcr-1*, *tetA*, *tetB*, *acrA*, *acrB*, *tolC*, *adeB*, *adeR*, *adeS*, *mexB*, *mexD*, *mexF*, *mexY* e genes de segmentos conservados de integrons de classe I (5'CS/3'CS) em amostras de água de pontos diferentemente impactados da laguna Tramandaí, situada no Litoral Norte do Rio Grande do Sul. Os genes foram analisados no DNA total das amostras e em 392 isolados de 10 espécies diferentes (*Alcaligenes faecalis*, *Bacillus* sp., *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. pumilus*, *Escherichia coli*, *Enterobacter asburiae*, *E. kobei*, *E. cloacae* e *Pseudomonas aeruginosa*). As amostras foram isentas de quantidades detectáveis de antimicrobianos, mas exibiram populações de bactérias resistentes quando expostas *in vitro* a ácido nalidíxico, ceftazidima, imipenem e tetraciclina. Os genes *tet*, de integrons de classe I e *bla* foram detectados respectivamente em 48.5%, 37.75% e 33.18% dos isolados obtidos; sendo mais frequentes em *P. aeruginosa*. Os produtos de PCR positivos para os genes pesquisados foram analisados através da plataforma *Ion Torrent* (PGM), identificando-se 31 genes relacionados a diferentes fenótipos resistentes - alguns ainda reportados somente no ambiente hospitalar. Estes dados qualificam a laguna analisada como um reservatório de bactérias resistentes e genes de resistência, os quais se distribuem no local de acordo com as espécies isoladas, o impacto das atividades de zonas urbanas e de plantio e a variabilidade entre as temporadas avaliadas.

¹ Tese de Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (161 p.) Abril, 2018.

CHARACTERIZATION OF THE RESISTOME OF A COASTAL LAGOON FROM SOUTH OF BRAZIL

Author: Belize Rodrigues Leite. Advisor: Prof^a. Dr^a. Gertrudes Corção.

ABSTRACT

Most consumed antimicrobials pass inert by metabolism, which can contaminate the effluent-receiving water bodies. Both the misapplication of these drugs and the degradation of natural habitats contribute significantly to the evolution of resistance genes. The effect of the anthropic activities on the propagation of these genes has been little researched in Brazilian coastal ecosystems. This study investigated the presence of the genes *bla*_{CTX-M} (groups 1, 2, 8, 9 and 25), *bla*_{GES-like}, *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-51}, *bla*_{SHV-like}, *bla*_{SPM-1}, *bla*_{TEM-like}, *bla*_Z, *mecA*, *mcr-1*, *tetA*, *tetB*, *acrA*, *acrB*, *tolC*, *adeB*, *adeR*, *adeS*, *mexB*, *mexD*, *mexF*, *mexY* and genes from conserved segments of class I integrons (5'CS / 3'CS) in water samples of differently impacted points from the Tramandaí Lagoon, aquatic system located in North Coast from Rio Grande do Sul State. These genes were analyzed in the total DNA of the samples and in 392 bacterial isolates of 10 different species (*Alcaligenes faecalis*, *Bacillus* sp., *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. pumilus*, *Escherichia coli*, *Enterobacter asburiae*, *Ent. kobei*, *Ent. cloacae* and *Pseudomonas aeruginosa*). The samples had no detectable concentrations of antimicrobials, but exhibited populations of resistant bacteria when exposed *in vitro* to nalidixic acid, ceftazidime, imipenem and tetracycline. Among the cultured bacteria, *tet*, class I integron and *bla* genes were detected respectively in 48.5%, 37.75% and 33.18% of the isolates; which were more frequent in *P. aeruginosa*. The positive PCR products for the genes evaluated were analyzed by the *Ion Torrent* (PGM) platform, identifying 31 genes related to different resistant phenotypes - some of them still reported only in the hospital environment. These data qualify the analyzed Lagoon as a reservoir of resistant bacteria and resistance genes, which are distributed *in situ* according to the isolated species, the impact from the urban and rural areas and the variability between the evaluated seasons.

¹ Doctoral Dissertation in Agricultural and Environmental Microbiology – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (161 p.) April, 2018.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
2.	OBJETIVOS	3
2.1	Objetivo Geral	3
2.2	Objetivos Específicos.....	3
3.	REVISÃO DA LITERATURA	4
3.1	Antibióticos.....	4
3.2	Resistência a antibióticos.....	9
3.3	Outros mecanismos associados à resistência a antibióticos.....	16
3.4	Resistoma ambiental.....	19
3.5	Sequenciamento de alto desempenho.....	21
4.	MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1	Área de estudo.....	23
4.2	Amostragem e coleta de amostras de água.....	23
4.3	Caracterização das amostras de água.....	25
4.4	Contagem de bactérias resistentes.....	28
4.5	Cultivo, isolamento e identificação	28
4.6	Extração de DNA e PCR.....	29
4.7	Sequenciamento através da plataforma <i>Ion Torrent</i>	30
5.	ARTIGOS	31
5.1.	Artigo 1.....	31
5.2.	Artigo 2.....	55
5.3.	Artigo 3.....	76
5.4.	Artigo 4.....	95
6.	DISCUSSÃO GERAL	115
7.	CONCLUSÃO	119
8.	REFERÊNCIAS	120

LISTA DE QUADROS E TABELAS

	Página
Quadro 1. Antimicrobianos avaliados nas amostras da Laguna.....	26
Quadro 2. Compostos orgânicos avaliados nas amostras da Laguna.....	27
Tabela 1. Referência dos oligonucleotídeos utilizados, tamanho esperado dos produtos de amplificação, concentração de MgCl ₂ e dNTPs (mM) e temperatura de anelamento das reações de PCR.....	29
ARTIGO 1	
Tabela 1.1. Características físico-químicas em quatro pontos de amostragem da Laguna Tramandaí.....	37
Tabela 1.2. Caracterização microbiológica das amostras de água em quatro pontos da Laguna Tramandaí.....	38
Tabela 1.3. Genes presentes (+) em pelo menos uma das amostras de água da Laguna Tramandaí.....	39
ARTIGO 2	
Tabela 2.1. Presença dos genes de bomba de efluxo e integrons de classe I no DNA total de amostras de água superficial da Laguna Tramandaí.....	60
Tabela 2.2. Espécies e quantidade de isolados nos pontos e temporadas....	61
Tabela 2.3. Espécies isoladas (número de isolados de cada espécie), número de isolados carreadores de genes <i>tet</i> e segmentos conservados....	63
Tabela 2.4. Frequência* de detecção dos genes com relação ao número de isolados de diferentes pontos da Laguna e temporadas avaliadas.....	63
ARTIGO 3	
Tabela 3.1. Distribuição dos isolados que apresentaram pelo menos um dos genes avaliados entre as espécies, pontos de coleta e temporadas.....	81
Tabela 3.2. Número de isolados obtidos que apresentou o gene <i>bla</i> _{CTX-M} (grupos 1, 2, 8, 25 e 9).....	82
Tabela 3.3. Distribuição dos genes <i>bla</i> _{GES-like} , <i>bla</i> _{SHV-like} , <i>bla</i> _{TEM-like} e <i>bla</i> _{SPM-1} ao longo das espécies isoladas e das temporadas analisadas.....	84
ARTIGO 4	
Tabela 4.1. Presença dos genes pesquisados nas amostras de diferentes pontos da Laguna.....	101
Tabela 4.2. Genes de resistência encontrados nas águas da Laguna	102

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Estrutura química do anel β -lactâmico.....	5
Figura 2. Estrutura química das principais tetraciclinas.....	7
Figura 3. Estrutura química das principais quinolonas.....	8
Figura 4. Estrutura química da polimixina B.....	9
Figura 5. Estrutura geral de integrons de classe I.....	18
Figura 6. Área de estudo.....	24
ARTIGO 1	
Figure 1.1. Contagens de bactérias resistentes presentes nas amostras da Laguna Tramandaí.....	41
Figura 1.2. Análise de componente principal (PCA) entre as variáveis físico-químicas e microbiológicas e as contagens de bactérias resistentes das amostras de água da Laguna Tramandaí.....	43
ARTIGO 2	
Figura 2.1. Presença dos genes <i>tetA</i> , <i>tetB</i> e segmentos conservados de integrons de classe I (5'CS/3'CS) nos diferentes pontos da Laguna.....	63
Figura 2.2. Presença dos genes <i>mexB</i> , <i>mexD</i> , <i>mexF</i> e <i>mexY</i> nos diferentes pontos da Laguna.....	64
ARTIGO 3	
Figura 3.1. Número de isolados que apresentaram os diferentes grupos do gene <i>bla</i> _{CTX-M} (grupos 1, 2, 8, 25 e 9) nos diferentes pontos da Laguna.....	83
Figura 3.2. Número de isolados que apresentaram os genes <i>bla</i> _{GES-like} , <i>bla</i> _{SHV-like} , <i>bla</i> _{TEM-like} e <i>bla</i> _{SPM-1} nos diferentes pontos da Laguna.....	85

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CARD	<i>“The Comprehensive Antibiotic Resistance Database”</i>
CECLIMAR	Centro de Estudos Costeiros, Limnológicos e Marinhos
CIM	Concentração inibitória mínima
DNA	<i>“Deoxyribonucleic acid”</i>
dNTP	<i>“Deoxyribonucleotide triphosphate”</i>
EDTA	<i>“Ethylenediamine tetraacetic acid”</i>
ESBLs	<i>“Extended Spectrum Beta-Lactamases”</i>
HRM	<i>“High resolution melting”</i>
INTEGRALL	<i>“The Integron Database”</i>
LANAGRO	Laboratório Nacional Agropecuário
LC-MS/MS	<i>“Liquid Chromatograph - Mass Spectrometer/Mass Spectrometer”</i>
MALDI-TOF	<i>“Matrix Associated Laser Desorption-Ionization - Time of Flight”</i>
MAPA	Ministério da Agricultura e Pecuária
MRSA	<i>“Methicillin-resistant Staphylococcus aureus”</i>
Mex	<i>“Multidrug efflux pump”</i>
NADPH	<i>“Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate”</i>
NGS	<i>“Next generation sequencing”</i>
PBPs	<i>“Penicillin-binding proteins”</i>
PCA	<i>“Plate Count Agar”</i>
PCR	<i>“Polymerase chain reaction”</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
RNA	<i>“Ribonucleic acid”</i>
SCCmec	<i>“Staphylococcal Cassette Chromosome mec”</i>
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
RNA_t	RNA transportador
WHO	<i>“World Health Organization”</i>

1. INTRODUÇÃO

A descoberta da penicilina por Alexander Fleming foi certamente um dos maiores marcos científicos da história. Em 1945 o pesquisador foi agraciado com o Nobel de Medicina pelo feito, porém seu discurso era um alerta sobre a necessidade de cautela no uso dos antimicrobianos, pois em seu laboratório era possível perceber o crescimento de linhagens resistentes.

O uso de antimicrobianos é essencial no sucesso de tratamentos clínicos de infecções bacterianas (humano e animal). Estes medicamentos também atuam como promotores de crescimento animal, possibilitando o aumento da produtividade em setores como pecuária e aquacultura. Visto o risco de resistência cruzada em humanos e a necessidade de acompanhar políticas internacionais de combate a infecções resistentes, a legislação brasileira vem restringindo o uso destes fármacos no setor de produção animal nos últimos 30 anos.

A maior parte dos antimicrobianos passa inerte pelo metabolismo e por sistemas tradicionais de tratamento de efluentes, podendo atingir os corpos hídricos receptores. Além disso, esta carga poluidora pode conter populações de bactérias resistentes que representam fonte de pressão seletiva no ecossistema em que se inserem. Assim, ambientes aquáticos podem ser comparados a reatores biológicos, onde ocorre a interação entre compostos químicos, nutrientes, microrganismos e genes de fontes diversas.

Sabe-se que bactérias resistentes a antimicrobianos ocorrem no ambiente desde a era pré-antibiótica e, no presente, mesmo em locais preservados de distúrbios antrópicos como glaciares e oceanos profundos. Contudo, parece ser consenso que o uso indiscriminado de antimicrobianos bem como a poluição decorrente das atividades humanas vem contribuindo significativamente para a evolução dos genes de resistência. Uma vez que bactérias apresentam diferentes mecanismos de permuta de genes e têm um curto tempo de geração, os genes de resistência podem ser positivamente selecionados em determinado contexto ambiental e disseminados ao longo da comunidade microbiana local. Humanos podem entrar em contato com bactérias resistentes veiculadas pela água de modo direto ou através da cadeia alimentar, expondo sua microbiota normal a estes genes.

Historicamente, as margens dos cursos d'água representam áreas propícias ao desenvolvimento das civilizações e centros urbanos. A maior parte da

população mundial vive a menos de 100 km do litoral. A crescente pressão demográfica impacta diretamente os ambientes aquáticos, porém ainda há poucos estudos que investiguem a relação entre este impacto e a veiculação de genes de resistência nestas áreas.

A pesquisa na área de resistência a antimicrobianos é tradicionalmente voltada a isolados de origem clínica. Entretanto, a análise sistemática de bactérias ambientais permite o monitoramento de genes de resistência antes mesmo de representarem quaisquer riscos à saúde humana. O reconhecimento de reservatórios naturais de genes de resistência é importante para a elaboração de estratégias de prevenção de infecções por bactérias resistentes. Visto a escassez de informações sobre o papel do impacto antrópico na seleção, transferência e dispersão destes genes no ambiente, o objetivo deste estudo é identificar a presença de genes de resistência a antimicrobianos, bombas de efluxo e integrons de classe I em bactérias de uma laguna costeira sobre diferentes tipos de impacto antrópico.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Pesquisar a presença de genes associados a mecanismos de resistência a antimicrobianos e genes de integrons de classe I em uma laguna costeira do sul do Brasil utilizando métodos independentes e dependentes de cultivo.

2.2 Objetivos Específicos

- 2.2.1 Coletar e comparar amostras de pontos com distintos graus de impacto antrópico, nos períodos de inverno e de verão, caracterizando-as quanto a variáveis físicas, químicas e biológicas.
- 2.2.2 Caracterizar as amostras quanto à quantidade de bactérias cultiváveis resistentes a antimicrobianos de distintas classes.
- 2.2.3 Isolar e identificar bactérias de diferentes grupos taxonômicos, caracterizando-as quanto à presença de genes de resistência, bombas de efluxo e integrons de classe I.
- 2.2.4 Caracterizar a presença de genes de resistência, bombas de efluxo e integrons de classe I utilizando métodos independentes de cultivo.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Antibióticos

Antibióticos são agentes que inibem o crescimento de microrganismos, conferindo vantagens adaptativas ao organismo produtor em determinados contextos ambientais. Uma variedade de organismos é capaz de produzir substâncias com atividade antibiótica, de bactérias e plantas a mamíferos (Davies e Davies, 2010). O primeiro antibiótico foi descoberto em 1929 por Alexander Fleming, o qual constatou em seu laboratório que o crescimento de um cultivo de *Staphylococcus aureus* foi interrompido pela presença de um fungo contaminante (*Penicillium notatum*) (Kümmerer, 2009). A substância produzida pelo fungo foi extraída, purificada, identificada e nomeada de penicilina. Esta descoberta possibilitou o tratamento de quadros clínicos que anteriormente levariam a óbito e foi certamente um dos maiores marcos da história da ciência.

O termo antibiótico refere-se originalmente a compostos produzidos por organismos vivos, mas também é empregado a compostos com atividade antimicrobiana (antibacteriana, antifúngica ou antiparasítica), mesmo que quimicamente sintetizados em laboratório. Atualmente, a maioria dos fármacos utilizados na prática clínica é derivada de microrganismos do solo (Torres-Cortes et al., 2011). No Brasil, a ANVISA tem registrada e recomenda para prescrição médica uma lista contendo 128 antimicrobianos (RDC N° 68) (ANVISA, 2014).

Antibióticos são classificados pela origem, estrutura química e mecanismo de ação, sendo geralmente moléculas complexas que apresentam diferentes funcionalidades no metabolismo do organismo produtor (Kümmerer, 2009). Os antibióticos de origem natural e semissintética compreendem a maioria dos antibióticos, podendo ser classificados em β -lactâmicos (penicilinas, cefens, penems e monobactâmicos), tetraciclina, aminoglicosídeos, macrolídeos, peptídicos cíclicos (glicopeptídeos e lipopeptídeos), estreptograminas, entre outros (lincosamidas, cloranfenicol, rifamicinas, etc). Os antibióticos de origem sintética são classificados em sulfonamidas, fluoroquinolonas e oxazolidinonas (Guimarães et al. 2010).

3.1.1 β -lactâmicos

Os β -lactâmicos estão entre as drogas antimicrobianas mais prescritas em todo o mundo. A estrutura composta por um anel β -lactâmico é a característica que agrupa estas moléculas (**Figura 1**). As drogas deste grupo bloqueiam as proteínas ligantes de penicilina (PBP, do inglês *Penicillin-Binding Protein*), que catalisam as reações de transpeptidação formadoras das ligações cruzadas entre os peptídeos da parede celular. Assim, a síntese da parede das células em crescimento é inibida, gerando espaços pelos quais entra água na célula, que colapsa por lise osmótica (Kohanski et al., 2010).

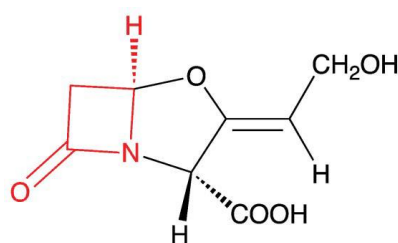


Figura 1. Estrutura química do anel β -lactâmico.

Fonte. Mehta e Sharma (2016).

Após a descoberta das penicilinas e a popularização de seu uso, sucessivas gerações de β -lactâmicos foram descobertas, aprimoradas e até mesmo sintetizadas, aumentando-se o espectro de atividade destes antimicrobianos. A partir da penicilina natural foram produzidas as penicilinas semissintéticas, como a amoxicilina e ampicilina - penicilinas acrescidas de um radical amino na cadeia lateral. As penicilinas de espectro ampliado incluem as carboxipenicilinas (carbenicilina e ticarcilina) e as ureidopenicilinas (piperacilina), antibióticos usados quase que exclusivamente no tratamento de infecções adquiridas no ambiente hospitalar. Estes fármacos também foram combinados com inibidores de β -lactamases, enzimas que rompem a estrutura do anel β -lactâmico e estão comumente relacionadas à resistência de diversas espécies (Andrade e Darini, 2017). Os inibidores de β -lactamases mais usados na prática clínica são: ácido clavulânico (clavulanato) e sulbactam ou tazobactam. Estes componentes geralmente não tem ação antimicrobiana, apenas inibem as enzimas bacterianas para que o antibiótico exerça seu efeito (Prescott, 2000).

As cefalosporinas são β -lactâmicos semissintéticos estruturalmente similares às penicilinas, porém apresentam determinada resistência às β -lactamases. A atividade destes compostos depende da capacidade de penetração pela membrana externa, da estabilidade à presença de β -lactamases e da afinidade para as enzimas-alvo. Caracterizam-se em primeira, segunda, terceira e quarta geração, de acordo com o espectro de ação que apresentam (Bush e Jacoby, 2010; Davies e Davies, 2010). As cefalosporinas de primeira geração (por exemplo, cefalotina e cefalexina) foram pioneiras no mercado de medicamentos, mas atualmente apresentam fraca atividade contra bactérias Gram-negativas. As cefalosporinas de segunda geração (por exemplo, a cefoxitina) apresentam alguma atividade contra Enterobactérias e algumas bactérias produtoras de β -lactamases, enquanto as cefalosporinas de terceira geração (por exemplo, a cefotaxima e a ceftazidima) são mais ativas contra estas bactérias, tendo também atividade contra algumas bactérias produtoras de AmpC (β -lactamase de origem cromossomal) (Dunn, 1982).

As cefalosporinas de quarta geração (por exemplo, a cefepima) têm atividade contra bacilos Gram-negativos produtores de β -lactamases de espectro estendido ("*Extended Spectrum Beta-Lactamases*", ESBLs) e AmpC. As cefalosporinas de quinta geração (ceftaroline e ceftobiprole) possuem atividade contra estafilococos metilina e oxacilina-resistentes, porém não agem sobre *Pseudomonas* (Bazan et al., 2009). Monobactâmicos (por exemplo, aztreonam) e carbapenêmicos (por exemplo, imipenem) também são alternativas de β -lactâmicos estáveis a maior parte das β -lactamases (Prescott, 2000).

3.1.2 Tetraciclinas

A estrutura química de antimicrobianos do grupo das tetraciclinas consiste em quatro anéis cíclicos fundidos (**Figura 2**), os quais formam complexos estáveis com íons metálicos que determinam as propriedades do fármaco. Os principais representantes do grupo são oxitetraciclina, doxiciclina e minociclina.

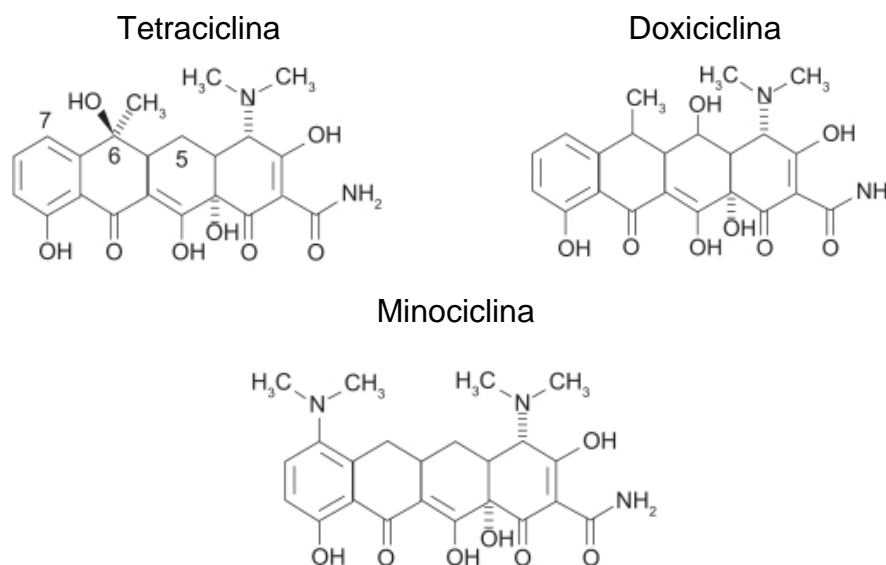


Figura 2. Estrutura química das principais tetraciclinas.

Fonte. Valentín e colaboradores (2009).

O mecanismo de ação das tetraciclinas consiste no impedimento da ligação do RNAt ao ribossomo, interferindo na síntese proteica bacteriana. Estes antimicrobianos associam-se a íons carregados positivamente, geralmente magnésio, e atravessam a membrana externa de bactérias Gram-negativas através de canais de porinas (OmpF e OmpC). O fármaco acumula-se no periplasma, dissocia-se dos íons e, em função de suas propriedades lipofílicas, difunde-se através da bicamada lipídica da membrana interna para o citoplasma bacteriano. Liga-se de modo reversível à subunidade 30S do ribossomo, o que explica sua atividade bacteriostática (Chopra, 2002).

Tetraciclinas apresentam amplo espectro de ação, possuindo atividade tanto contra bactérias Gram-negativas quanto Gram-positivas, clamídias, micoplasmas, rickettsias e protozoários. Caracterizam-se pela baixa toxicidade, baixo custo e podem ser administradas por via oral na maioria dos casos, sendo usados extensivamente na medicina (Chopra e Roberts, 2001; Speer et al., 1992). Ainda que o aparecimento de resistência venha limitando o uso das tetraciclinas, estes fármacos ainda têm sido usados no tratamento de diversos tipos de infecção. Tigeciclina e minociclina, por exemplo, têm sido indicadas no tratamento de MRSA (*S. aureus* resistente à meticilina), sendo um dos poucos antibióticos ativos contra essa linhagem disponíveis atualmente (Jones;

Petersen, 2009). Além do uso em humanos, as tetraciclinas têm importante uso veterinário e, no Brasil, até 2009, eram também empregados como promotores de crescimento na produção animal, principalmente na aquacultura (IN N° 26) (BRASIL, 2009).

3.1.3 Quinolonas

A estrutura química que caracteriza este grupo de antimicrobianos é a presença do anel 4-quinolona (**Figura 3**). Os representantes deste grupo são o ácido nalidíxico e as fluoroquinolonas (por exemplo, norfloxacin e ciprofloxacina). As quinolonas atuam inibindo as enzimas DNA girase e topoisomerase do tipo IV, o que resulta na estabilização da estrutura do DNA e impede o superenrolamento da dupla hélice durante a divisão celular bacteriana.

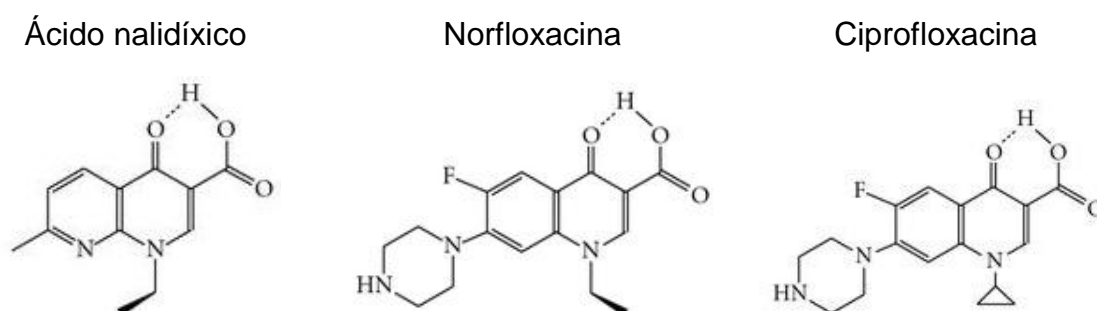


Figura 3. Estrutura química das principais quinolonas.

Fonte. Bivián-Castro e colaboradores (2009).

O ácido nalidíxico foi identificado em 1962, como subproduto da cloroquina, e representa a primeira geração desta classe de antimicrobianos, caracterizada pelo espectro de ação restrito a bactérias Gram-negativas que infectam o trato urinário. Ao longo da década de 1980 a indústria farmacêutica adicionou radicais fluorados à estrutura básica das quinolonas produzindo as fluoroquinolonas. Estas variantes revelaram maior espectro de ação que as quinolonas, agindo sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, incluindo *Chlamydia* e *Mycoplasma*. Fármacos deste grupo apresentam reconhecida eficácia no combate a patógenos de peixes (Samuelsen; Bergh, 2004).

3.1.4 Polimixinas

As polimixinas - polimixina B e polimixina E (colistina) - são antibióticos lipopeptídicos cíclicos (**Figura 4**) aplicados no tratamento de bacilos Gram-negativos multirresistentes. Interagem com os íons de cálcio e magnésio que mantêm a organização dos fosfolípidios da membrana externa, desestabilizando a estrutura da célula até o ponto de destruí-la (Yu et al., 2015).

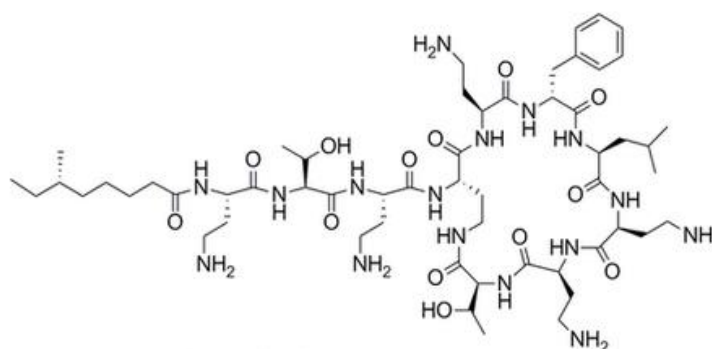


Figura 4. Estrutura química da polimixina B.

Fonte. Rabanal e colaboradores (2015).

Lançados nos anos 50, estes antibióticos apresentaram efeito tóxico ao sistema renal e foram gradativamente substituídos por fármacos com toxicidade mais baixa. Contudo, na década de 90 as polimixinas foram reintroduzidas na prática clínica como alternativa ao combate de linhagens de bacilos Gram-negativos resistentes à maioria dos antimicrobianos disponíveis no mercado (Zavascki et al., 2007).

3.2 Resistência a antibióticos

A resistência ocorre quando microrganismos apresentam mecanismos que tornam ineficaz o uso de determinadas drogas. Resistência antimicrobiana é o termo mais amplo aplicado à resistência em diferentes microrganismos e abrange resistência a drogas antibacterianas, antivirais, antiparasitárias e antifúngicas. Bactérias resistentes à maioria dos antibióticos são comumente chamadas de “superbactérias”, as quais, inclusive, podem levar pacientes hospitalizados a óbito, representando enormes gastos em saúde pública (WHO,

2017).

Os organismos podem apresentar três diferentes tipos de fenótipos resistentes: suscetibilidade, resistência intrínseca ou resistência adquirida. A suscetibilidade aos antibióticos resulta da ausência de mecanismos de resistência que possibilitem a sobrevivência das bactérias na presença de determinados compostos (Blair et al., 2015). A resistência intrínseca é a resistência existente desde a origem do organismo, presente em todos os exemplares de determinada espécie. Por exemplo, *Enterobacter* é naturalmente resistente à cefoxitina, devido à produção constitutiva da enzima β -lactamase AmpC (oriunda de genes cromossomais) (Santiago et al., 2016). A resistência adquirida pode originar-se através da mutação de genes reguladores ou estruturais, da aquisição de genes de resistência veiculados por elementos genéticos móveis ou da combinação de ambos os mecanismos. Este fenótipo será exibido apenas em alguns dos indivíduos da espécie, os quais tenham derivado de uma linhagem suscetível a determinado antibiótico (Blair et al., 2015).

Os mecanismos de resistência aos antibióticos incluem a inativação do antibiótico através da produção de enzimas que modifiquem a estrutura da droga (por exemplo, β -lactamases), a redução da concentração intracelular da droga (por alteração da permeabilidade da membrana externa ou por expressão diferencial de bombas de efluxo) e a alteração do sítio ativo da droga na célula. Genes envolvidos com estes mecanismos podem fazer parte do genoma *core* mesmo de bactérias não patogênicas, abrangendo elementos genéticos não expressos e precursores que codificam proteínas relacionadas à resistência moderada - a qual pode se tornar efetiva em contextos favoráveis (Wright, 2007). O conceito de resistoma refere-se ao conjunto de genes presente em um determinado organismo ou ambiente, incluindo genes de bactérias patogênicas e não patogênicas e de microrganismos produtores de antibióticos, direta ou indiretamente associados à resistência a antibióticos (Perry et al., 2014).

3.2.1 Resistência a β -lactâmicos

A resistência a β -lactâmicos pode ocorrer através de distintos mecanismos celulares. Algumas espécies de bactérias podem alterar a estrutura do alvo dos β -lactâmicos, as PBPs, o que reduz a afinidade pelo alvo e, conseqüentemente, o efeito bactericida do fármaco. Esse mecanismo é frequentemente relatado em isolados de *S. aureus* meticilina resistentes (MRSA). Este tipo de resistência é condicionada à presença de *mecA*, gene inserido em um elemento genético móvel denominado SCCmec (“Staphylococcal Cassette Chromosome mec”) que codifica em uma variante alterada de PBP, a PBP 2A (Enright et al., 2002).

A redução da permeabilidade da membrana externa é outro mecanismo de resistência a β -lactâmicos observado em bactérias Gram-negativas. A bactéria passa a expressar porinas com estrutura defeituosa ou mesmo cessa a expressão destas proteínas, resultando respectivamente em permeabilidade seletiva ou até mesmo impermeabilidade da célula a determinados β -lactâmicos (Delcour, 2009).

Contudo, o principal mecanismo de resistência consiste na produção de β -lactamases, enzimas que hidroxilam a ligação amida do anel beta-lactâmico de modo irreversível e geram compostos sem atividade antimicrobiana (Bush e Jacob, 2010). Estima-se que as β -lactamases tenham se originado há mais de 2 bilhões de anos (Jacoby, 2009). Apesar de terem sido descritas em cepas de *Escherichia coli* já em 1940 (Abraham e Chain, 1940), as β -lactamases vêm sendo selecionadas e se diversificando paralelamente à introdução de novos fármacos no mercado. Atualmente somam mais de 2400 variantes conhecidas, categorizadas em 32 famílias distintas (Andrade e Darini, 2017).

Os esquemas de Ambler e de Bush, Jacoby e Medeiros são tradicionalmente utilizados na classificação das β -lactamases. Ambler divide estas enzimas em quatro grupos (de A à D) de acordo com sua estrutura molecular (Ambler, 1991). As enzimas das classes A, C e D contêm serina em seu sítio ativo (serina- β -lactamases); enquanto aquelas da classe B contêm um metal, geralmente zinco (metalo- β -lactamases). Bush, Jacoby e Medeiros categorizam estas enzimas conforme seus substratos e inibidores (grupos de 1 a 4, com subdivisões) (Bush et al., 1995).

As β -lactamases são codificadas por genes designados “bla”, que podem ser cromossomais bem como estar inseridos em elementos genéticos móveis. A nomenclatura das β -lactamases geralmente contém informações sobre a bactéria ou plasmídeo no qual a enzima foi descoberta, o nome da cidade ou do paciente do qual a bactéria resistente foi isolada, ou ainda as propriedades da enzima (ponto isoelétrico, estrutura, especificidade, etc.). β -lactamases TEM foram detectadas pela primeira vez na paciente grega Temoneira; as SHV são variáveis ao reagente sulfidril (do inglês Sulfhydryl reagent variable); as CTX-M são ativas sobre cefotaxima e foram descritas em Munique, na Alemanha; as OXA são ativas sobre a oxacilina; as GES foram descobertas na Guiana, apresentando espectro estendido; as NDM foram descobertas em Nova Déhli e as SPM-1 em São Paulo, sendo ambas metalo- β -lactamases (Paterson e Bonomo, 2005).

3.2.1.1 Cefalosporinases

As cefalosporinases são β -lactamases de espectro restrito, capazes de degradar penicilinas e cefalosporinas de primeira e segunda geração. Podem se manifestar através de genes cromossomais - nativos ou mutados - e plasmidiais, ocorrendo na maioria dos bacilos Gram-negativos. Os tipos mais comuns de cefalosporinases são TEM-1, TEM-2 e SHV-1. Estas enzimas podem ser inibidas quando expostas a inibidores de β -lactamases (Bradford et al., 2001).

3.2.1.2 β -lactamases de espectro estendido

Na década de 1980, a pressão seletiva decorrente do uso massivo de cefalosporinas de terceira geração (amplo espectro) influenciou na ascensão de tipos de β -lactamases capazes de degradar estes fármacos. Genes até então associados à resistência a cefalosporinas de segunda geração (*bla*_{TEM-1}, *bla*_{TEM-2} e *bla*_{SHV-1}) acumularam mutações e produziram variantes de β -lactamases como TEM-3 e SHV-2, capazes de inativar cefalosporinas de terceira e quarta gerações (Kliebe et al., 1985). Estas enzimas foram denominadas de β -lactamases de espectro estendido (ESBLs) e resultam em linhagens resistentes à maior parte dos β -lactâmicos: penicilinas, cefalosporinas de primeira, segunda

e terceira gerações e aztreonam. O tipo CTX-M foi relatado posteriormente, caracterizando-se pela capacidade de hidrolisar cefotaxima (cefalosporina de terceira geração) (Kitzis et al., 1989). Os genes *bla*_{CTX-M} originaram-se de genes cromossomais de *Kluyvera* spp.. Este tipo de ESBL constitui um grupo complexo de enzimas, comumente divididas nos grupos CTX-M-1 (que inclui, por exemplo, CTXM-15), CTX-M-2, CTX-M-9, CTX-M-8 e CTX-M-25 (Cantón et al., 2012).

O fenótipo de ESBL é mais comumente associado a β -lactamases dos tipos TEM, SHV e CTX-M, sendo estes dois últimos tipos os mais frequentes na América Latina. O tipo CTX-M é o tipo mais frequente no Brasil (Silva; Lincopan, 2012; Poirel et al., 2012). Apesar de haver exceções, a maior parte das ESBLs pertence à classe A de Ambler e ao grupo funcional 2be de Bush, Jacoby e Medeiros (Bush, 2010). Predominam em bactérias Gram-negativas (Bush; Jacoby, 2010; Rawat & Nair, 2011), mas também ocorrem em bactérias Gram-positivas (Henriques et al., 2006).

3.2.1.3 Carbapenemases

Os β -lactâmicos carbapenêmicos emergiram como alternativas ao combate a bactérias produtoras de ESBLs e AmpC. Contudo, algumas bactérias passaram a produzir carbapenemases, enzimas com potencial para hidrolisar praticamente todos os β -lactâmicos disponíveis. Os genes que codificam estas enzimas podem ter origem tanto cromossomal quanto plasmidial (Queenan; Bush, 2007). As carbapenemases do tipo serina- β -lactamases pertencem à classe A de Ambler (1991) e ao grupo funcional 2f de Bush, Jacoby e Medeiros (1995) (exceto o tipo OXA). A serina carbapenemase do tipo KPC (“*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase”) é a mais frequente no Brasil, enquanto os tipos GES e OXA aparecem com menor representatividade (Sampaio; Gales, 2016). As carbapenemases do tipo metalo- β -lactamases pertencem à classe B de Ambler (1991) e ao grupo funcional 3a de Bush, Jacoby e Medeiros (1995). A metalo carbapenemase do tipo SPM-1, produzida por *P. aeruginosa*, foi descoberta em São Paulo e é considerada endêmica do Brasil (Toleman et al., 2002). As metalo carbapenemases podem ser inibidas por EDTA (agente que sequestra metais), o que não ocorre para as serina carbapenemases (Queenan; Bush, 2007).

3.2.2 Resistência a tetraciclinas

A resistência a tetraciclinas pode ocorrer através do efluxo ou inativação do antimicrobiano e da alteração do alvo ribossomal. O mecanismo de inativação enzimática da tetraciclina é atribuído ao gene *tetX* e pouco frequente, ocorrendo apenas em bactérias aeróbicas pois requer presença de oxigênio e NADPH (Ng et al., 2001; Chopra, 2002). O mecanismo de alteração do alvo consiste na produção de proteínas que se ligam à subunidade 30S do ribossomo e alteram a sua estrutura, impedindo o efeito inibitório das tetraciclinas. Os genes associados à modificação de sítios ribossomais são *tetM*, *tetO*, *tetP*, *tetQ* e *tetS* (Ng et al., 2001).

O efluxo é o principal mecanismo de resistência a tetraciclinas, relacionado principalmente à presença dos genes *tet*. Estes genes codificam em proteínas que se associam à membrana celular e bombeiam ativamente moléculas de tetraciclina para o exterior da célula, impedindo que estas alcancem o alvo (ribossomo). Os genes de resistência envolvidos com o efluxo de tetraciclina são *tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetD*, *tetE*, *tetG*, *tetI*, *tetM* e *tetK*. Estes genes ocorrem tanto em bactérias Gram-positivas quanto em Gram-negativas e são frequentes em linhagens multirresistentes (Ng et al., 2001).

Cerca de 40 genes de resistência à tetraciclina vêm sendo identificados em uma ampla variedade de espécies nos últimos 50 anos. Uma vez que podem estar inseridos em plasmídeos, transposons e integrons de classe 1 e ser transferidos de forma horizontal entre bactérias, estes genes ocorrem mesmo em espécies com origem filogenética distante. No Brasil, estudos que relatam a presença de genes *tet* estão restritos aos campos da microbiologia clínica (Scaletsky et al., 2010; Cergole-Novella et al., 2011) e da cadeia produtiva de alimentos, especialmente associados a animais de corte (Santin et al., 2017).

3.2.3 Resistência a quinolonas

A resistência a quinolonas pode ocorrer principalmente através de mutações nos genes que codificam as enzimas alvo destes antimicrobianos, DNA girase e topoisomerase IV (Hopkins et al., 2005; Giraud et al., 2006). Mutações pontuais no gene *gyrA* podem ser suficientes para gerar altos níveis

de resistência a ácido nalidíxico, por exemplo. No entanto, são necessárias mutações adicionais para que ocorra redução da suscetibilidade a fluoroquinolonas. Linhagens previamente resistentes ao ácido nalidíxico podem requerer menor exposição às quinolonas para que sua suscetibilidade seja alterada (Hopkins et al., 2005). Mutações nos genes *gyrB*, *parC* e *parE* também estão relacionadas à resistência a este grupo de antimicrobianos (Hopkins et al., 2005; Giraud et al., 2006). Além destas mutações, pode ocorrer redução da concentração do antimicrobiano no interior da célula devido à hiperexpressão de sistemas de efluxo.

3.2.4 Resistência a polimixinas

Na maior parte das bactérias Gram-negativas a resistência às polimixinas ocorre através de modificações na estrutura química do componente LPS das células, o que altera a carga da superfície bacteriana e conseqüentemente reduz ou impede a interação da droga com o seu alvo. Essas alterações são reguladas pelos componentes PhoP/Q e PmrAB, que, no geral, respondem a baixas concentrações de antimicrobianos, escassez de Mg^{+2} e Ca^{+2} , e ao excesso de Fe^{+3} e Al^{+3} (Trimble et al, 2016). Em *P. aeruginosa* o lócus *pmrAB* modula a adição de aminoarabinose ao lipídeo A enquanto em *Acinetobacter baumannii* o gene *pmrC* modula a adição de fosfoetanolamina, por exemplo (Olaitan et al., 2014).

Diferente destes mecanismos, os quais são determinados por genes cromossomais, o gene *mcr-1* (“*mobile colistin resistance-1*”) é um gene plasmidial identificado em 2015 em *E. coli* (Liu et al., 2015). Este gene provoca a ligação de uma molécula de fosfoetanolamina ao lipídeo A, modificando a configuração da LPS. Os plasmídeos que codificam *mcr-1* são altamente transmissíveis por transferência horizontal entre *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Salmonella* spp., o que justifica a sua ocorrência global. Esta resistência é alarmante, pois pode levar ao aumento das bactérias panresistentes (Smith et al., 2017).

3.3 Outros mecanismos associados à resistência a antibióticos

O efluxo é um mecanismo natural de excreção de substâncias resultantes do metabolismo bacteriano, o qual é desempenhado por sistemas proteicos localizados na membrana celular das bactérias. No geral, estes sistemas atuam na manutenção da homeostase da célula, realizando, por exemplo, a extrusão de compostos tóxicos, metais pesados, fatores de virulência e moléculas sinalizadoras de *quorum sensing* (Lupo et al., 2012). No contexto clínico, sistemas de efluxo podem atuar removendo moléculas de antimicrobiano da célula, o que impede sua ação sobre a bactéria e resulta no fenótipo resistente (Piddock et al., 2006).

Integrans são elementos genéticos que contêm determinantes de recombinação sítio-específica capazes de incorporar DNA de fontes exógenas ao seu próprio genoma. A mobilidade de cassetes de genes de um genoma a outro por transferência horizontal ocorre quando estes elementos associam-se a plasmídeos e transposons (Nardelli et al., 2012). Os integrans apresentam uma plataforma genética estável associada a uma matriz de genes com funções acessórias, onde diversos tipos de genes de resistência antimicrobianos têm sido detectados, como, por exemplo, *qacE* - determinante da resistência a compostos de quaternário de amônio, *sul* - determinante da resistência a sulfonamidas, *bla_{CTXM-2}* - determinante da resistência a cefalosporinas e monobactâmicos, e *qnr* - determinante da resistência a quinolonas (Wright et al., 2008; Nardelli et al., 2012).

3.3.1 Sistemas de efluxo

O primeiro sistema de efluxo descrito em procariotos foi o sistema *Tet*, associado à redução da sensibilidade de cepas de *E. coli* à tetraciclina (McMurry et al., 1980). Estes sistemas podem ser codificados tanto por genes plasmidiais quanto cromossomais (George e Levy, 1983). A atividade de efluxo pode ser inespecífica (atuar sobre diferentes classes de antimicrobianos) ou específica a um tipo de droga (como é o caso do sistema *Tet*), ocorrendo de modo intrínseco (independente de hiperexpressão) ou como resultado de mutações (Lupo et al., 2012).

Com base na fonte de energia utilizada, na especificidade do substrato e nas relações filogenéticas os sistemas de efluxo classificam-se em cinco famílias: MATE (“*multidrug and toxic compound extrusion*”), ABC (“*ATP binding cassette*”), MFS (“*major facilitator superfamily*”), SMR (“*small multidrug resistance*”) e RND (“*resistance-nodulation-division*”). Transportadores ABC dependem da hidrólise de ATP; transportadores MFS, RND e SMR dependem de força próton-motiva; enquanto transportadores MATE dependem do gradiente de Na^+/H^+ (Pidcock, 2006). Em bactérias Gram-negativas, estes transportadores são sistemas tripartidos, compostos por proteínas associadas inseridas no citoplasma, periplasma e na membrana externa da célula. A organização destes sistemas é mais simples em bactérias Gram-positivas (Pidcock, 2006).

O efluxo de antimicrobianos pode ocorrer em sinergia a outros mecanismos, o que aumenta significativamente os níveis e perfis de resistência e contribuí para o estabelecimento de linhagens multirresistentes. Neste contexto, os sistemas RND são os mais bem estudados, especialmente em bactérias Gram-negativas, destacando-se os sistemas Mex (“*multidrug efflux pump*”) de *Pseudomonas*, *acrAB-TolC* de *Enterobacteriaceae* e *Ade* de *Acinetobacter*. No Brasil, os sistemas *AcrAB-TolC* (Moreira et al., 2009; Singh et al., 2012) e os genes *mex* (Xavier et al., 2010; Fehlberg et al. 2012; Martins et al. 2018) têm sido reportados apenas no contexto clínico.

3.3.2 Integrons de classe I

O principal componente dos integrons é o gene *intI*, codificante da integrase. A integrase é a enzima que catalisa a excisão e a inserção de genes. O sítio de recombinação primária *attI*, contíguo a *intI*, é o local onde novos genes se integram. O grupo de genes contém um promotor denominado *Pc*. *IntI*, *attI* e *Pc* compõe a estrutura básica dos integrons, enquanto a porção variável corresponde aos cassetes de genes integrados e/ou móveis. Os cassetes apresentam uma ORF, imediatamente seguida pelo sítio de recombinação *attC*, local que é especificamente reconhecido pela *intI*. A excisão destes cassetes pela integrase leva a intermediários circulares, covalentemente fechados, sem atividade replicativa (Cambray et al., 2010).

Nove classes de integrons foram descritas até o momento presente,

porém genes de resistência a antimicrobianos vêm sendo reportados nas classes 1, 2 e 3 (Kang et al., 2005). Aqueles pertencentes à classe 1 são os maiores responsáveis pela evolução da resistência no contexto clínico, sendo prevalentes em bacilos Gram-negativos (Fluit; Schmitz, 2004) e menos frequentes em bactérias Gram-positivas (Nandi et al., 2004). Além disso, estes integrons também estão amplamente disseminados em ambientes aquáticos (Zhang et al., 2009). Estes elementos apresentam dois segmentos conservados (5'-CS e 3'-CS) (**Figura 5**) separados por um segmento variável no qual já foram descritos mais de 130 diferentes cassetes gênicos associados à resistência (Koczura et al., 2016).

Integrons de classe I reconhecem uma ampla variedade de sequências de recombinação, facilitam a transmissão de genes de uma bactéria a outra via transferência horizontal e resultam em uma rápida resposta adaptativa a mudanças do meio. Características estas que tornam estes importantes veículos de dispersão de genes de resistência em ambientes hostis (Cambray, 2010).

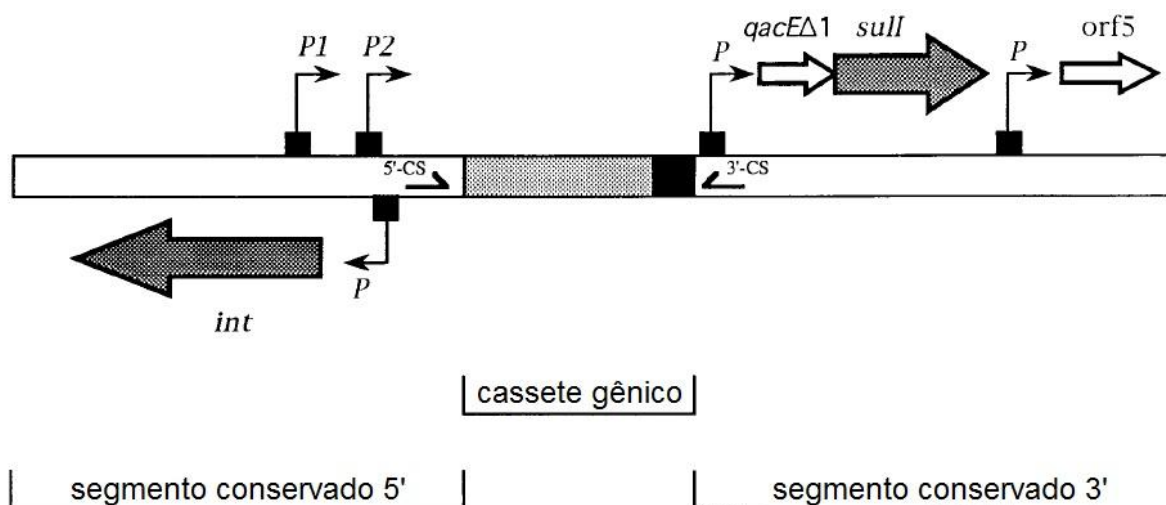


Figura 5. Estrutura geral de integrons de classe I.

Fonte. Adaptado de Levésque e colaboradores (1995).

3.4 Resistoma ambiental

Antibióticos são, em sua maioria, produzidos por microrganismos ambientais, principalmente isolados de solos (Newman and Cragg, 2016). Entretanto, a quantidade dispersa no ambiente é ínfima quando comparada à quantidade de antibióticos presentes em efluentes urbanos, por exemplo. A maior fração dos antibióticos não é metabolizada pelo organismo de quem consome e nem removida durante o processo de tratamento de efluentes. Os corpos d'água receptores destes efluentes são continuamente expostos a estas drogas, podendo favorecer a seleção positiva da resistência (Zhang et al., 2015).

Amostras de camadas congeladas de solo datadas de mais de 30 mil anos atrás revelaram a presença de antibióticos e genes de resistência significativos na atualidade (D'Costa et al., 2011). Estes elementos também são reportados em amostras de localidades geograficamente isoladas como cavernas (Bhullar et al., 2012) e mar profundo (Chen et al., 2013). Apesar disso, é consenso que as atividades antrópicas atuam como facilitadoras da evolução e disseminação da resistência (Nardelli et al., 2012; Zhang et al., 2015; Tan et al., 2017; Yang et al. 2017).

Relatos da ocorrência da resistência em ambientes aquáticos vêm aumentando consideravelmente nos últimos 30 anos (Nascimento et al., 2014). Diversas espécies de bactérias resistentes e diferentes tipos de genes de resistência vêm sendo detectados nestes ambientes (Henriques et al., 2006; Zanetti et al., 2013; Adesoji et al., 2015; Kotlarska et al., 2015; Canal et al., 2016; Chen et al., 2017).

A tetraciclina é frequentemente utilizada em sistemas de aquacultura e apresenta difícil degradação no ambiente, sendo adsorvida e retida por diversos tipos de solo (Kümmerer, 2003). O revolvimento do solo por práticas agrícolas tem demonstrado contribuir para o escoamento de genes de resistência em corpos d'água, o que está condicionado à variação climática sazonal e aos padrões de uso da terra. A temporada das chuvas normalmente apresenta níveis mais altos de erosão do solo representando em um incremento de nutrientes, coliformes fecais, partículas em suspensão e outros contaminantes como metais nos cursos d'água (Sharma et al. 2016). Todas estas variáveis são consideradas agentes de pressão seletiva sobre a comunidade microbiana.

Os resultados de Harnisz e colaboradores (2011) demonstraram que

bactérias resistentes à tetraciclina podem ser aplicadas como indicadores de resistência a antimicrobianos e da qualidade microbiológica de águas superficiais poluídas por atividades humanas. A maioria dos genes *tet* encontrada no ambiente codifica sistemas de efluxo. As variantes *tetA* e *tetB* são as mais bem estudados em bactérias Gram-negativas de ambientes aquáticos (Wang et al., 2013; Adesoji et al., 2015; Stange et al., 2016; Jiang et al., 2017).

Os genes de β -lactamases são estudados, sendo pesquisados em amostras de rios (Tacão et al., 2012; Guyomard-Rabenirina et al., 2017), lagos (Zhang et al., 2015), estuários (Henriques et al., 2006; Pereira et al., 2013), oceanos (Wang et al., 2008; Marávic et al., 2014) e glaciares (Segawa et al., 2013). No Brasil, estes genes vêm sendo detectados em diversos reservatórios naturais ao longo da última década (Pontes et al., 2009; Fontes et al., 2011; Turano et al., 2016; Paschoal et al., 2017; Sellera et al., 2017). *Enterobacteriaceae* é a família mais estudada, sendo *bla_{TEM}* o gene mais frequente em isolados de ambientes aquáticos (Balsalobre et al., 2010; Montezzi et al., 2015; De Oliveira et al., 2017). Os genes *bla_{GES}* e *bla_{SHV}* também têm sido reportados nestes ambientes, porém com menor representatividade (Chagas et al., 2011; de Araujo et al., 2016; De Oliveira et al., 2017).

O relevante papel das comunidades naturais como reservatório e fonte de integrons de classe I vem sendo destacado nas últimas duas décadas (Nandi et al., 2004; Nemergut et al., 2004; Stokes et al., 2006). Assume-se que 2.65% das células eucarióticas de ambientes não clínicos apresentem integrons de classe I (Hardwick et al., 2007). Integrons oriundos de ambientes marinhos apresentam alta diversidade de genes *intl* (Gillings et al., 2008; Rodríguez-Minguela et al., 2009). Estes elementos contribuem para a diversidade genética de bactérias marinhas (Hall, 2012). O significado biológico dos integrons tem sido demonstrado por sua capacidade de adquirir e expressar genes adaptativos que podem auxiliar no enfrentamento ao estresse do ambiente marinho e consequente especialização de nicho (Koenig et al., 2009; Elsaied et al., 2011).

A distribuição de integrons de classe I tem sido reportada em ambientes aquáticos com diferentes graus de distúrbio antrópico (Goldstein et al., 2001; Nandi et al., 2004; Nemergut et al., 2004; Gaze et al., 2005; Stokes et al., 2006; Hardwick et al., 2007; Wright et al., 2008; Rosewarne et al., 2010; Sá et al., 2010; Elsaied et al., 2011; Gaze et al., 2011; Kristiansson et al., 2011; Nardelli et al., 2012; Spindler et

al., 2012; Zanetti et al., 2013; Gillings et al., 2015; Paiva et al., 2015; Canal et al., 2016; Koczura et al., 2016; Yang et al., 2017). Contudo, fatores envolvendo a distribuição destes elementos em cepas ambientais permanecem pouco claros.

Abordagens metagenômicas possibilitam a análise de todo o material genético ou vários genomas de uma amostra sem a necessidade de isolamento prévio dos microrganismos (Thomas et al., 2012). Essas abordagens vêm permitindo o acesso à diversidade do resistoma de um determinado local, incluindo microrganismos ainda não cultiváveis pelos métodos de cultivo conhecidos. A elucidação dos mecanismos de resistência presentes nos ambientes naturais é essencial para a formulação de planos de ação contra a disseminação de infecções resistentes.

3.5 Sequenciamento de alto desempenho

O sequenciamento de alto desempenho (“*Next generation DNA sequencing*”, NGS) é uma tecnologia de sequenciamento de genomas que dispensa etapas de clonagem ou eletroforese em gel de acrilamida, possibilitando o processamento concomitante e automatizado de muitas amostras. Plataformas deste tipo de sequenciamento começaram a ser comercializadas em 2005 e desde então avançaram rapidamente (Metzker, 2010).

Comparadas ao sequenciamento de Sanger, as plataformas de NGS destacam-se por gerar informação sobre milhões de pares de bases em uma única corrida, com uma grande economia de tempo e custo por base sequenciada (Ji et al. 2011). A praticidade ofertada por estas tecnologias refletiu diretamente em experimentos científicos, uma vez que análises passaram a ser realizadas em um curto período de tempo, em larga escala e com objetivos muito diversificados.

As aplicações do sequenciamento de alto desempenho são inúmeras: sequenciamento de genomas *de novo*, metagenomas e resistomas; análise de RNA-seq, exomas, RNAs não codificantes, pequenos RNAs, *amplicons*, bibliotecas enriquecidas com fragmentos-alvo; entre diversas outras utilizações (Metzker, 2010). Algumas das plataformas de NGS são 454 FLX, da Roche; Solexa, HiSeq e MiSeq, da Illumina; *SOLiD System*, da *Applied Biosystems*; *Ion Torrent Personal Genome Machine* (PGM), da Thermo Fisher Scientific; e o *Heliscope True Single Molecule Sequencing* (tSMS), da Helicos (Mardis, 2008).

A plataforma *Ion Torrent* baseia-se no sequenciamento por síntese, mas é associada ao sequenciamento por semicondutores, que avalia a variação de pH a cada nucleotídeo incorporado na fita-molde e dispensa o uso de fluoróforos (Rusk, 2011). Esta tecnologia tem sido utilizada para representar a diversidade bacteriana de ambientes aquáticos (Shaw et al., 2015; Xiong et al., 2014; Xiong et al., 2015 a, b; Aydin et al., 2016) e menos frequentemente para caracterizar plasmídeos (Li et al., 2015 a) e genomas completos de cepas resistentes (Hendriksen et al., 2013; Daum et al., 2014).

Considera-se que apenas entre 1 e 10% dos microrganismos podem de ser isolados através de métodos tradicionais de cultivo (Hugenholtz, 2002). Portanto, a avaliação da resistência a antibióticos em comunidades microbianas que se baseia unicamente em bactérias cultiváveis, irá gerar resultados tendenciosos e não representativos do ambiente (Riesenfeld et al., 2004). Abordagens metagenômicas fornecem uma alternativa robusta e independente de cultura para caracterizar a base genética da resistência dentro das comunidades microbianas.

A pesquisa na área de resistência a antimicrobianos é tradicionalmente voltada a isolados de origem clínica. Entretanto, a análise sistemática de bactérias ambientais permite o monitoramento de genes de resistência antes mesmo de estes representarem quaisquer riscos à saúde humana. O reconhecimento de reservatórios naturais de genes de resistência é importante para a elaboração de estratégias de prevenção de infecções resistentes. Visto a escassez de informações sobre o papel das atividades humanas na seleção, transferência e dispersão destes genes no ambiente, o objetivo deste estudo é identificar a presença de genes de resistência a antimicrobianos, bombas de efluxo e integrons de classe I em bactérias de uma laguna costeira sobre diferentes tipos de impacto antrópico.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Área de estudo

O estudo realizou-se na Laguna Tramandaí, situada na porção norte da Planície Costeira do Rio Grande do Sul, entre as coordenadas 29°55'49" S e 30°00'56" S e 50°06'21" W e 50°11'20" W. Trata-se de uma zona de estuário, utilizada para alimentação, repouso, reprodução e berçário de diversas espécies (Farion, 2007). Além da riqueza paisagística e natural, a área é importante para o desenvolvimento de atividades que subsidiam a economia local, tais como a pesca, a agricultura, o turismo e a exploração mineral.

A Laguna Tramandaí conecta as águas da Bacia Hidrográfica do Rio Tramandaí, uma unidade geográfica que percorre e abastece outras 17 cidades vizinhas (**Figura 6B**). As flutuações populacionais sazonais são uma peculiaridade da região, que atrai muitos turistas durante a alta temporada de veraneio (de dezembro à fevereiro), o que pode representar um incremento de até cinco vezes a população local (Zuanazzi e Bartels, 2016). Não obstante, o turismo é a atividade econômica básica da região, juntamente à pesca. Dentre os principais usos das águas da Laguna Tramandaí encontram-se a irrigação de lavouras de arroz, atividades recreacionais de contato, abastecimento público e diluição de esgotos doméstico e industrial (Loitzenbauer, Mendes, 2012).

4.2 Amostragem e coleta das amostras de água

Como a demografia regional é bastante variável entre as estações do ano, a fim de se avaliar possíveis relações entre a intensidade das atividades antrópicas e a distribuição dos genes de resistência, bombas de efluxo e integrons de classe I, realizou-se uma amostragem na baixa temporada (inverno, em Agosto de 2014) e outra na alta temporada (verão, em Janeiro de 2015). Amostras de água superficial foram coletadas em quatro pontos da Laguna Tramandaí (P1, P2, P3 e P4), distantes cerca de 2 km um do outro, mas com paisagens e tipos de distúrbios distintos nas margens (**Figura 6C**). O grau de impacto antrópico foi mensurado de acordo com estudos pretéritos (Nardelli et al., 2012), avaliando-se a densidade de construções e a quantidade de ruas num raio de 1 km do ponto de coleta.

Ponto 1 (29°58'34.7" S; 50°07'18.8" W) (alto impacto): ponto mais próximo do mar, tem margens intensamente urbanizadas e apresenta um terminal de exploração marítima e transporte de derivados de petróleo, com trânsito diário de embarcações operantes (**Figura 6C**). Ponto 2 (29°58'10.4" S; 50°08'20.7" W) (alto impacto): também é densamente urbanizado e situado próximo à saída de um condomínio residencial horizontal que recebe moradores principalmente na alta temporada (**Figura 6C**). Ponto 3 (29°58'12.2" S; 50°09'19.7" W) (baixo impacto): está no centro da laguna, não havendo distúrbios diretos sobre o local, que é ponto de confluência com as águas que fluem de outras partes da Bacia Hidrográfica no qual a laguna está inserida (**Figura 6C**). Ponto 4 (29°57' 05.8 S, 50°10'41.7" W) (baixo impacto): não é urbanizado e apresenta focos de mata nativa, porém há uso das áreas adjacentes para o plantio de arroz (**Figura 6C**).

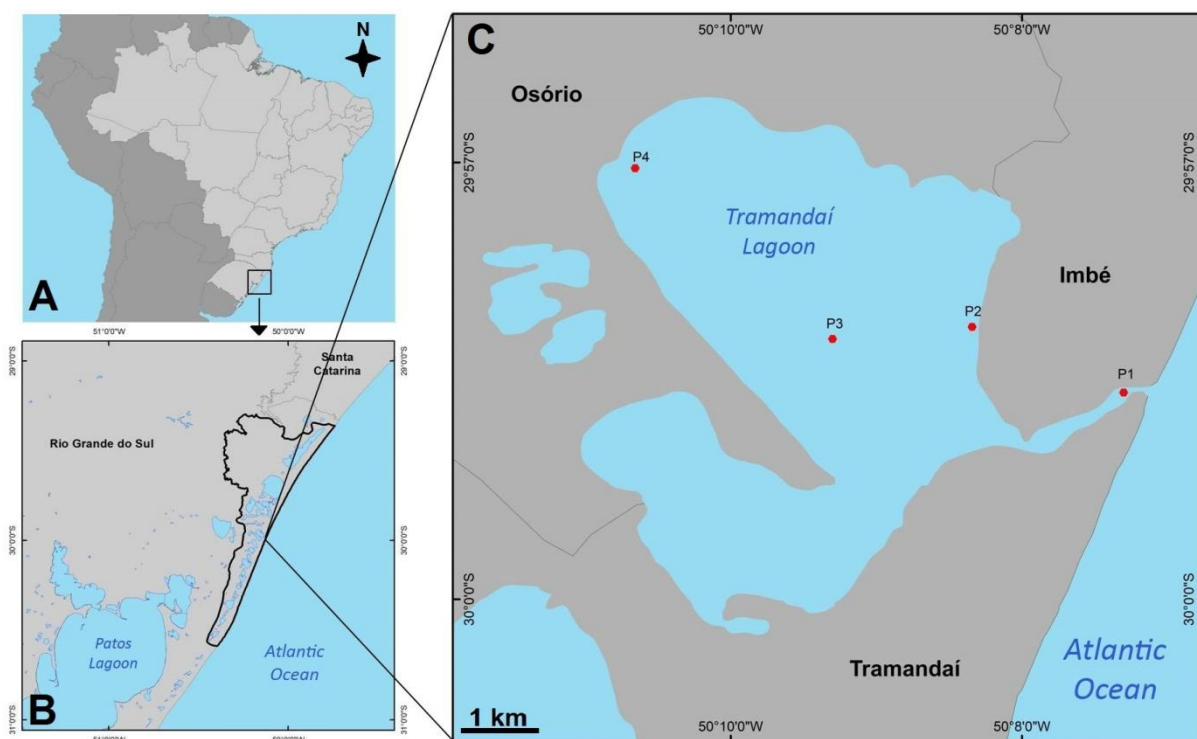


Figura 6. Área de estudo. Localização da Laguna no sul do Brasil (A), na Bacia Hidrográfica do Rio Tramandaí (B), bem como o posicionamento dos pontos de coleta (P1: Ponto 1; P2: Ponto 2; P3: Ponto 3; P4: Ponto 4) (C).

Os pontos de coleta foram acessados com o auxílio de uma embarcação de pequeno porte e técnicos do Centro de Estudos Costeiros, Limnológicos e Marinhos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CECLIMAR, UFRGS). As amostras foram coletadas em triplicata, consistindo cada uma em um *pool* de subamostras obtidas com o lançamento de frascos estéreis (2L) à superfície (menos de 1m de profundidade) em cinco pontos distintos ao redor da embarcação. As mesmas foram mantidas a 4°C até o processamento, que ocorreu dentro de 24h.

4.3 Caracterização das amostras de água

As amostras de água da Laguna foram caracterizadas quanto à temperatura e turbidez, quanto aos níveis de salinidade, oxigênio dissolvido, fósforo e nitrogênio totais, nitrato, nitrito, nitrogênio amoniacal e sólidos totais e quanto à quantidade de heterotróficos totais, coliformes totais e coliformes termotolerantes. Além disso, as amostras também foram caracterizadas quanto à presença de resíduos de antimicrobianos. O método foi adaptado de Jank e colaboradores (2014), sendo pesquisados 45 tipos de antimicrobianos, representantes de oito classes distintas (**Quadro 1**). Adicionalmente, uma metodologia analítica qualitativa foi aplicada para detectar a presença de pesticidas nas amostras, baseando-se em um banco de dados contendo o perfil de 171 compostos (**Quadro 2**) (Diaz et al., 2013). A análise foi realizada com o apoio do Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO, sede Rio Grande do Sul). O equipamento utilizado para esta finalidade foi um cromatógrafo líquido da série 1100 (*Agilent Technologies*) acoplado a um espectrômetro de massas triplo quadrupolo API 5000 (*Applied Biosystems*) usando uma sonda de eletropulverização (ESI) em modo positivo como fonte de ionização (LC-MS/MS).

Quadro 1. Antimicrobianos avaliados nas amostras da Laguna Tramandaí.

Penicilinas
Penicilina G (PNG), Ampicilina (AMP), Cloxacilina (CLX), Oxacilina (OXA), Dicloxacilina (DCX).
Cefalosporinas
Cefalexina (CFX), Cefapirina (CFAP), Cefalona (CFN), Ceftiofur (CFT), Cefoperazona (CFOP), Cefquinoma (CFQ).
Sulfonamidas
Sulfatiazol (STZ), Sulfamerazina (SMR), Sulfametazina (SMZ), Sulfaquinoxalina (SQX), Sulfaclopiridazina (SCP), Sulfadoxina (SDX), Sulfadimetoxina (SDMX), Sulfisoxazol (SFX), Sulfametoxazol (SMA), Sulfadiazina (SDZ).
Tetraciclínas
Tetraciclina (TC), Oxitetraciclina (OTC), Clortetraciclina (CTC), Doxiciclina (DOXI).
Fluoroquinolonas
Ácido nalidíxico (NALID), Sarafloxacina (SARA), Difloxacina (DIFLO), Danofloxacina (DANO), Ciprofloxacina (CIPRO), Enrofloxacina (ENRO), Flumequina (FLU), Norfloxacina (NOR).
Macrolídeos
Eritromicina (ERT), Azitromicina (AZT), Tilosina (TIL), Clindamicina (CLN), Tilmicosina (TLM), Espiramicina (SPR), Nafcilina (NAFC).
Pirimidinas
Trimetoprima (TMP).
Lincosaminas
Lincomicina (LNC).

Quadro 2. Compostos orgânicos avaliados nas amostras da Laguna Tramandaí.

Acefato, Acetamiprida, Alacloro, Aldicarb, Aldicarbessulfona, Aletrina, Azinfósetil, Azinfosmetil, Azoxistrobina, Barban, Benfuracarbe, Bentazona, Bifentrina, Bitertanol, Boscalida, Bromuconazol, Bupirimato, Carbaril, Carbendazim, Carbofenotion, Carbofurano, Ciazofamida, Cimoxanil, Cipermetrina, Ciproconazol, Clorbromuron, Clorfenvinfós, Clorimuron, Cloroxuron, Clorpirifos, Clorpirifós, Cresoximmetílico, Deltametrina, Desmedifan, Diazinon, Diclorvos, Dicrotofós, Difenoconazol, Diflubenzuron, Dimetoato, Dimetomorfe, Dimoxistrobina, Dissulfotonsulfona, Dissulfotonsulfóxido, Diuron, Dodemorfe, Epoxiconazol, Etiofencarbe sulfona, Etiofencarbe sulfoxido, Etion, Etiprole, Etirimol, Etoprofos, Etrinifós, Fempropatrina, Fenamifós, Fenamifóssulfona, Fenamifóssulfóxido, Fenarimol, Fenitrotona, Fenobucarb, Fenoxicarbe, Fentiona, Fention Sulfona, Fention sulfoxido, Fentoato, Fipronil, Fluazifopebutil, Flucitrinato-NH₄⁺, Fludioxonil-NH₄⁺, Flufenacet, Flusilazole, Flutriafol, Folpete-NH₄⁺, Foransulfuron, Forato, Foratosulfona, Foratosulfoxido, Fosadona, Fosfamidona, Fosmete, Fostiazate, Furatiocarbe, Hexaconazol, Hexitiazox, Imazapic, Imazapir, Imazalil, Imibenconazol, Imidacloprido, Iprobenfos, Iprodiona, Iprovalicarbe, Isocarbofós, Isoproturon, Lambdacialotrina, Linurom, Malaixon, Malation, Mefosfolan, Mesotriona, Mevinfós, Metalaxil, Metamidofos, Metazaclor, Metconazol, Metidationa, Metiocarbessulfona, Metiocarbe sulfóxido, Metomil, Metoxifenazida, Metoxuron, Metsulfuron metal, Miclobutanil, Monocrotófós, Monuron, Nitempiram, Nuarimol, Ometoato, Oxamil-NH₄⁺, Oxicarboxina, Oxifluorfen, Paclobutrazol, Paraoxonetil, Paraoxonmetil, Paration etil, Pencicuron, Penconazol, Permetrina, Piraclófos, Piraclóstrobina, Pirazofós, Pirifenox, Pirimifósetil, Pirimifósmetil, Piriproxifen, Procloraz, Profenofós, Promecarbe, Prometrina, Propamocarbe, Propanil, Propargito, Propiconazol, Propoxur, Prosulfuron, Pirimicarbe, Simazim, Tebuconazol, Tebufenpirade, Tepp, Terbufos, Tiacloprido, Tiametoxan, Tifensulfuron metal, Tiodicarbe, Tolilfluaniid-NH₄⁺, Triadimefon, Triadimenol, Triazofós, Triciclazole, Triclorfon, Triforina, Tiobencarbe, Tiofanatometila, Triassulfuron, Tridemorfe, Trifloxistrobina, Trifloxusulfuron, Triflumuron, metil, Trinexapaque etil.

4.4 Contagem de bactérias resistentes

As populações resistentes a antimicrobianos presentes nas águas da Laguna foram quantificadas segundo Li et al. (2011), com modificações. As amostras de água foram expostas *in vitro* aos antimicrobianos ácido nalidíxico, ceftazidima, imipenem e tetraciclina, nas concentrações de 20 mg.L⁻¹ (escolhida de acordo com os pontos de corte da CIM) (CLSI, 2014). Para esta finalidade, alíquotas das amostras de água foram cultivadas em caldo nutriente (volume 1:1, por 24h a 37°C), com e sem suplementação de antimicrobianos. Em seguida, alíquotas destes cultivos foram semeadas em PCA suplementado com o antimicrobiano correspondente (24h a 37°C). As amostras foram designadas de acordo com o tipo de tratamento: suplementação única (suplementação antimicrobiana apenas em placas de PCA) ou suplementação dupla (suplementação antimicrobiana em caldo e placa de PCA). A população total resistente foi estimada pela contagem das colônias bacterianas cultivadas na presença do antimicrobiano. Contagens de heterotróficos totais, realizadas em amostras sem suplementação de antimicrobianos, foram utilizadas como tratamento controle.

4.5 Cultivo, isolamento e identificação

Alíquotas de 100 mL das amostras foram concentradas por filtração em membrana de nitrocelulose (0,45 µm de porosidade). As membranas foram depositadas em água peptonada e caldo acetamida (seletivo para *P. aeruginosa*) e mantidas a 30°C por 24h. Alíquotas do cultivo foram serialmente diluídas, semeadas em Ágar Cetrimide e em Ágar Mac Conkey e incubadas a 37°C por 24h. Para o isolamento de *Bacillus* spp., alíquotas foram submetidas a choques térmicos de 80°C e, sequencialmente, de 4°C, semeadas em Ágar nutriente e incubadas a 37°C por 24h. As cepas de *E. coli* foram confirmadas através do crescimento diferencial em Ágar *Eosin methylene blue* (EMB) (a 37°C por 24h). Os demais isolados obtidos foram identificados através da técnica de MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation – Time of Flight*) (MALDI Microflex Biotyper 4.0, Bruker).

4.6 Extração de DNA e PCR

O DNA total das amostras foi obtido em triplicata, a partir de alíquotas de 100 mL de água concentradas por filtração em membrana de nitrocelulose (0,2 µm de porosidade). Conforme adaptado de Xue e colaboradores (2017), as membranas foram assepticamente fragmentadas e submetidas à extração com o uso do kit *Power Soil® DNA Isolation kit* (Mo Bio Laboratories, USA). O DNA das bactérias isoladas foi extraído com Chelex®, de acordo com Giraffa et. al (2000). Os genes listados na **Tabela 1** foram amplificados de amostras de DNA total e de isolados.

Tabela 1. Referência dos oligonucleotídeos utilizados, tamanho esperado dos produtos de amplificação, concentração de MgCl₂ e dNTPs (mM) e temperatura de anelamento das reações de PCR.

Referências	Genes	Tamanho (pb)	Conc. (mM)		Anel. (°C)
			MgCl ₂	dNTP	
Poirel et al. (2001)	<i>bla</i> _{CTX-M-like}	550	5.5	0.2	54
	<i>bla</i> _{CTX-M grupo 1}	688	2.5	0.2	60
	<i>bla</i> _{CTX-M grupo 2}	404	2.5	0.2	60
De Oliveira et al. (2017)	<i>bla</i> _{CTX-M grupos 8 e 25}	326	2.5	0.2	60
	<i>bla</i> _{CTX-M grupo 9}	561	2.5	0.2	60
Jeong et al. (2006)	<i>bla</i> _{GES-like}	860	4.0	0.3	58
Woodford et al. (2006)	<i>bla</i> _{OXA-23-like}	501	1.5	0.2	54
	<i>bla</i> _{OXA-51}	353	2.0	0.2	57
Talukdar et al. (2013)	<i>bla</i> _{SHV-like}	861	5.0	0.3	59
	<i>bla</i> _{TEM-like}	850	1.5	0.2	54
Fuentefria et al. (2009)	<i>bla</i> _{SPM-1}	344	3.0	0.3	54
Olsen et al. (2006)	<i>bla</i> _z	674	4.0	0.3	50
Kondo et al. (2007)	<i>mecA</i>	286	4.0	0.2	57
	<i>tetA</i>	210	3.0	0.3	55
Ng et al. (2001)	<i>tetB</i>	659	3.0	0.3	55
Lévesque et al. (1995)	<i>5'CS/3'CS</i>	variable	2.5	0.2	50
Lentz et al. (2016)	<i>mcr-1</i>	183	57	*	*
	<i>acrA</i>	187	2.5	0.3	54
Swick et al. (2011)	<i>acrB</i>	107	2.5	0.3	55
	<i>tolC</i>	100	2.5	0.3	55
	<i>adeB</i>	541	3.5	0.3	50
Beheshti et al. (2014)	<i>adeR</i>	477	3.0	0.3	52
	<i>adeS</i>	544	3.0	0.3	52
	<i>mexB</i>	244	2.5	0.3	57
Yoneda et al. (2005)	<i>mexY</i>	250	2.5	0.3	60
Xavier et al. (2010)	<i>mexD</i>	165	2.5	0.3	57
Oh et al. (2003)	<i>mexF</i>	255	2.5	0.3	60

* Foi utilizado o reagente *MeltDoctor™ HRM Master Mix* (Qiagen®, Alemanha).

Controles positivos foram incluídos em todas as reações de PCR. Cepas de *E. coli* *bla*_{CTX-M-15} (+), *Klebsiella pneumoniae* *bla*_{TEM-4} (+), *E. coli* *bla*_{TEM-9} (+) e *K. pneumoniae* *bla*_{SHV-1} e *bla*_{SHV-3} (+), do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, bem como a cepa de *P. aeruginosa* 48-8896A *bla*_{GES} (+), do Laboratório Especial de Microbiologia Clínica da Universidade Federal de São Paulo, foram gentilmente cedidas pela pesquisadora A. F. Martins. Cepas de *S. aureus* ATCC 29213 *bla*_Z (+), *S. aureus* ATCC 33591 *mecA* (+) (oriundas do Instituto Oswaldo Cruz) e *Salmonella* sp. *tetA* e *tetB* (+) (oriundas do setor de Medicina Preventiva da Universidade Federal do Rio Grande do Sul) foram cedidas pela pesquisadora C. Pisseti. Utilizaram-se também isolados previamente caracterizados por estudos prévios deste grupo de pesquisa: *Acinetobacter* sp. *ade* (+); *P. aeruginosa* *bla*_{SPM-1} (+) e *mex* (+) (Fuentefria et al., 2009); *E. coli* AcrAB-TolC (+), *mcr-1* (+) e *int1* (+) (Canal et al., 2016; Lentz et al., 2016).

4.7 Sequenciamento através da plataforma *Ion* PGM

Os produtos de amplificação obtidos por PCR foram purificados com *Agencount AMPure Beads* (Beckman Coulter). A quantidade de 100 ng foi utilizada na construção da biblioteca de DNA, utilizando o *Ion Plus Fragment Library Kit*. Sequências *barcodes* foram empregadas para identificar cada amostra. As bibliotecas foram carregadas em chips 316 v2 e sequenciadas em um *Ion Personal Genome Machine* (PGM) (*Thermo Fisher*).

As sequências geradas foram analisadas com base no *pipeline* de Bengtsson-Palme e colaboradores (2014). Entretanto, os fragmentos foram montados utilizando-se a abordagem *de novo*, através do algoritmo de *Brujin Graph* no montador *Velvet* (*k-mer* 11), o qual está disponível no pacote de plug-ins do software Geneious[®]. Os *contigs* foram identificados de acordo com as bases de dados CARD - “*The Comprehensive Antibiotic Resistance Database*” (programa *blastx*) (McArthur et al., 2013; Jia et al., 2017) e INTEGRALL “*The Integron Database*” (Moura et al., 2009). Ambas as bases de dados foram acessadas contemplando as últimas atualizações (março de 2018).

5. ARTIGOS

5.1. Artigo 1

Resistência antimicrobiana em bactérias cultiváveis de uma laguna costeira sob diferentes tipos de impacto antrópico

Belize Leite, Magda Chaves, Athos Tópor, Louise Jank, Fabiano Barreto, Gertrudes Corção

Resumo

As atividades humanas decorrentes do aumento da urbanização geram resíduos contendo diferentes tipos de compostos recalcitrantes, os quais podem atingir e contaminar as fontes de água que abastecem a população. Ao entrar em contato com estes ambientes, entre outras implicações, estes compostos podem favorecer a seleção de bactérias resistentes a antibióticos. Como a maior parte dos aglomerados urbanos concentra-se ao longo da zona costeira, torna-se importante investigar as consequências do impacto antrópico nos corpos d'água adjacentes aos centros urbanos. Algumas praias do sul do Brasil atraem grande quantidade de visitantes durante o período de verão (alta estação), porém o impacto dessas flutuações sazonais sobre a resistência a antibióticos nas populações de bactérias aquáticas não vem sendo determinado. O objetivo deste estudo foi avaliar a resistência antimicrobiana em bactérias cultiváveis de uma laguna costeira impactada por diferentes perturbações antrópicas. Amostras de água superficial foram coletadas nos períodos de inverno (baixa temporada) e verão (alta temporada) e caracterizadas quanto às variáveis físico-químicas (temperatura, salinidade, oxigênio dissolvido, fósforo total, nitrogênio total, nitrato, nitrito, nitrogênio amoniacal, sólidos totais e turbidez) e microbiológicas (coliformes totais heterotróficos, totais e termotolerantes). Investigou-se a presença de resíduos antimicrobianos através do método LC-MS/MS. Realizou-se um teste *in vitro* para determinar a quantidade de bactérias cultiváveis resistentes a ácido nalidíxico, ceftazidima, imipenem e tetraciclina. Não foram observados níveis detectáveis de antimicrobianos nas amostras, porém bactérias resistentes foram detectadas em quase todos os pontos, em ambas as estações e em todos os tipos de tratamentos antimicrobianos. A abordagem adotada foi eficaz em demonstrar correlações entre os efeitos da urbanização e a prevalência da resistência na laguna analisada. Algumas populações resistentes foram mais numerosas na “baixa temporada”, indicando a importância de avaliar sistematicamente a resistência em fontes d'água próximas a centros urbanos. Uma vez que há uma tendência global para o aumento da urbanização nas regiões costeiras, favorecendo o acúmulo de poluentes e a pressão sobre os recursos aquáticos, torna-se fundamental a realização de estudos que caracterizem potenciais reservatórios de fatores de resistência e bactérias resistentes a antibióticos nestes locais.

Introdução

Bactérias resistentes a antimicrobianos representam um grave problema de saúde pública em escala global, sendo este tema tradicionalmente estudado sob a perspectiva clínica. As bactérias podem ser intrinsecamente resistentes a substâncias químicas ou adquirir determinantes de resistência por meio de mutações no DNA, transformação por incorporação de DNA exógeno, transdução mediada por fagos, ou conjugação (Blair et al., 2015). Os ambientes aquáticos são especialmente suscetíveis à pressão seletiva oriunda das atividades antropogênicas. Compostos recalcitrantes como antimicrobianos, metais e biocidas podem atingir os corpos d'água, favorecendo a seleção de bactérias nativas resistentes (Petit et al., 2014). Além disso, o esgoto introduz altas cargas de nutrientes no meio ambiente, levando a alterações nas propriedades da água, bem como a mudanças em atributos ecológicos das populações microbianas (biomassa, riqueza e diversidade), que podem influenciar na persistência da resistência antimicrobiana na natureza (Aminov, 2011).

Alguns estudos já demonstraram que bactérias de ambientes naturais podem apresentar determinantes de resistência de grande relevância clínica (Perry & Wright, 2013). O gene *bla*_{GES-5} (determinante de resistência a carbapenems), por exemplo, é até mesmo considerado ubíquo em ambientes aquáticos (Manageiro et al., 2014). Os genes *qnrA* e *bla*_{OXA-181}, relacionados à resistência a quinolonas e carbapenems, respectivamente, são derivados de espécies de bactérias aquáticas (Poirel et al., 2005; Potron et al., 2011). Embora os ecossistemas aquáticos pareçam desempenhar um papel fundamental na manutenção da resistência antimicrobiana na natureza, pouca atenção tem sido dada à influência das atividades humanas sobre a prevalência da resistência nesses ambientes (Pruden et al., 2012; Czekalski et al., 2015, Yang et al., 2017).

Cerca de 39% da população mundial vive a menos de 100 km do litoral (Kummu et al., 2016) e uma tendência de crescimento populacional é prevista para essas áreas num futuro próximo (Gaw et al., 2015), implicando diretamente em superprodução de resíduos e aumentando a exposição dos recursos hídricos a poluentes. Os antimicrobianos são amplamente utilizados na medicina, já tendo sido também aplicados na agricultura e pecuária, e são considerados contaminantes em potencial, uma vez que não são completamente metabolizados nem facilmente

removidos pelos sistemas tradicionais de tratamento de esgoto (Kümmerer, 2009). Níveis de contaminação por antimicrobianos já foram detectados em ambientes aquáticos do Brasil (Quadra et al., 2016), mas a resistência bacteriana tem sido pouco estudada nesses ambientes (Nascimento; Araújo, 2014; da Costa Andrade, 2015; Monteiro et al., 2016; Oliveira et al., 2016).

Algumas praias do sul do Brasil atraem muitos visitantes durante o verão (de dezembro à fevereiro), período em que as populações de algumas cidades litorâneas pode aumentar até cinco vezes (Zuanazzi e Bartels, 2016). A Bacia Hidrográfica do Rio Tramandaí tem uma população estimada em 220.296 habitantes; no entanto, pode atingir até 580.000 habitantes no verão (SEMA, 2017). Esta área é composta por um conjunto de muitas lagoas costeiras que deságuam na Laguna Tramandaí antes de alcançar o Oceano Atlântico. A Laguna é de grande importância para o abastecimento das populações locais, bem como para o turismo regional; no entanto, estudos que descrevam os efeitos biológicos das atividades humanas existentes no entorno lagoa não têm sido realizados.

Este estudo teve como objetivo avaliar se a resistência antimicrobiana em bactérias cultiváveis de águas superficiais da Laguna Tramandaí varia de acordo com a presença de diferentes distúrbios antrópicos. As amostras de água foram caracterizadas com base em algumas variáveis físico-químicas e biológicas e na presença de genes de resistência a antimicrobianos. Bactérias resistentes a ácido nalidíxico, ceftazidima, imipenem e tetraciclina foram quantificadas. Observou-se se as contagens de bactérias resistentes variou de acordo com 1) o tipo de antimicrobiano, 2) as atividades humanas presentes no ponto de coleta da amostra, e 3) o aumento da população local durante a alta temporada.

Material e métodos

Área de estudo

Conforme descrito no **subitem 4.1** do Material e métodos (corpo da Tese).

Coleta das amostras

Conforme descrito no **subitem 4.2** do Material e métodos (corpo da Tese).

Caracterização das amostras de água

Conforme descrito no **subitem 4.3** do Material e métodos (corpo da Tese).

Contagem de bactérias resistentes

Conforme descrito no **subitem 4.4** do Material e métodos (corpo da Tese).

Análise da presença de genes de resistência a antimicrobianos

As amostras de água foram concentradas e o DNA total das mesmas foi extraído; analisando-se a presença dos genes *bla*_{CTX-M-like}, *bla*_{GES-like}, *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-51}, *bla*_{SHV-like}, *bla*_{TEM-like}, *bla*_{SPM-1}, *bla*_Z, *mecA*, *tetA*, *tetB*, 5'CS/3'CS (amplificam genes de segmentos conservados de integrons de classe I), *acrA*, *acrB*, *tolC*, *adeB*, *adeR*, *adeS*, *mexB*, *mexD*, *mexF* e *mexY*. Os procedimentos adotados encontram-se descritos no **subitem 4.6** do Material e métodos (corpo da Tese).

Análises estatísticas

Os valores das contagens (bactérias heterotróficas totais, coliformes totais e termotolerantes e bactérias resistentes a antimicrobianos) foram transformados para a base logarítmica \log_{10} e avaliados por análise de variância (ANOVA). O teste *post hoc* de Tukey foi aplicado para comparar os valores obtidos nas diferentes estações (alta e baixa) e nos diferentes pontos da Laguna. O teste *post hoc* de Dunnett foi usado para comparar os valores das contagens oriundas dos tratamentos antimicrobianos com aquelas do respectivo controle. Arbitrou-se a significância de $P < 0,05$. As variáveis ambientais e microbiológicas e as contagem de bactérias resistentes foram correlacionadas através do coeficiente de correlação de Pearson. Um método multivariado de projeção estatística (*Principal Component Analysis* - PCA) também foi aplicado para reduzir a dimensionalidade dos dados e analisá-los.

Resultados

Caracterização das amostras de água

Durante a amostragem da “baixa temporada”, a Laguna Tramandaí estava sob a maré vazante; enquanto durante a amostragem da “alta temporada” estava sob a maré cheia. No que se refere às características físico-químicas, observou-se maior variabilidade entre os pontos na “baixa temporada” (Tabela 1.1). Nesta amostragem, a maré vazante parece ter influenciado os altos teores de sólidos totais e os menores valores de salinidade e visibilidade (exceto no “Ponto 4”) (Tabela 1.1), uma vez que o influxo das águas dos rios à montante podem reduzir a salinidade, ressuspender o sedimento de fundo e transportar partículas decorrentes dos processos de erosão.

Na amostragem da “baixa temporada”, as águas da Laguna apresentaram maiores teores de nitrogênio total e amoniacal no “Ponto 1”; maior teor de fósforo total no “Ponto 2”; níveis mais baixos de nutrientes no “Ponto 3”; e maior teor de oxigênio dissolvido e visibilidade no “Ponto 4” (Tabela 1.1). Já na amostragem da “alta temporada”, o “Ponto 1” apresentou maiores níveis de salinidade, oxigênio dissolvido e fósforo total; o “Ponto 2” apresentou maiores teores de nitrato, nitrogênio total e amoniacal; o “Ponto 3” apresentou maior visibilidade; e o “Ponto 4” apresentou menores teores de fósforo total e nitrogênio (contrapondo-se aos pontos mais urbanizados “1” e “2”, respectivamente) (Tabela 1.1). Em relação à temperatura da água, em ambas as estações avaliadas, o “Ponto 3” apresentou valores mais baixos, enquanto o “Ponto 4” apresentou valores mais altos (Tabela 1.1).

A Laguna Tramandaí é um ambiente de alta dinamicidade; contudo, tais variáveis permitiram avaliar as condições *in situ* no momento da amostragem. A presença de urbanização pareceu estar relacionada principalmente às concentrações de nutrientes, mesmo na “baixa temporada”, quando a quantidade detectável de nitrato foi confirmada no “Ponto 2”, por exemplo (Tabela 1.1). Isto sugere que a urbanização presente nos pontos “1” e “2” seja um distúrbio independente da intensificação das atividades humanas no período da “alta temporada”.

Tabela 1.1. Características físico-químicas em quatro pontos de amostragem da Laguna Tramandaí em ambas as estações avaliadas (“baixa”, em agosto de 2014, e “alta”, em janeiro de 2015).

Pontos	1	2	3	4	Média ± Desvio	Amplitude
Temperatura (°C)						
<i>Baixa estação</i>	15.7	16.2	15.5	17.2	16.15 ± 0,66	1.1
<i>Alta estação</i>	24.8	26.5	24.6	25.1	25.25 ± 0,74	1.07
Salinidade (ppm)						
<i>Baixa estação</i>	9.22	0.1	10.05	12.11	7.87 ± 4.6	121.1
<i>Alta estação</i>	64.98	31.42	22.36	11.97	32.68 ± 19.87	5.42
Oxigênio dissolvido (mg.L⁻¹)						
<i>Baixa estação</i>	10.32	9.16	9.99	10.44	9.97 ± 0.5	1.13
<i>Alta estação</i>	7.9	7.5	7.3	7.1	7.45 ± 0.29	1.11
Fósforo total (mg.L⁻¹)						
<i>Baixa estação</i>	0.08	0.12	0.06	0.06	0.08 ± 0.02	2
<i>Alta estação</i>	0.08	0.07	0.07	0.06	0.07 ± 0.01	1.33
Nitrogênio total (mg.L⁻¹)						
<i>Baixa estação</i>	5.3	3.99	1.37	1.44	3.02 ± 1.68	3.86
<i>Alta estação</i>	2.08	9.63	2.6	2.08	4.09 ± 3.2	4.62
Nitrato (mg.L⁻¹)						
<i>Baixa estação</i>	ND	1,02	ND	ND	*	*
<i>Alta estação</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Nitrito (mg.L⁻¹)						
<i>Baixa estação</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Alta estação</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Nitrogênio amoniacal (mg.L⁻¹)						
<i>Baixa estação</i>	4.3	3.7	0.07	0.16	2.05 ± 1.95	61.42
<i>Alta estação</i>	0.78	2.34	2.21	1.56	1.72 ± 0.62	3
Sólidos totais (mg.L⁻¹)						
<i>Baixa estação</i>	5018	122	5548	6319	4251.75 ± 2428.8	51.8
<i>Alta estação</i>	37.99	17.69	13.03	6.98	18.92 ± 11.64	5.44
Visibilidade (cm)						
<i>Baixa estação</i>	50	40	40	70	50 ± 12.24	1.75
<i>Alta estação</i>	60	60	80	60	65 ± 10	1.33

ND: não detectado. Limite de detecção: nitrato (0.03 mg.L⁻¹), nitrito (0.04 mg.L⁻¹).

* *Dados obtidos são insuficientes para calcular a referida medida.*

Com relação às variáveis microbiológicas, o “Ponto 3” destacou-se por exibir a maior contagem de heterotróficos totais, especialmente na “baixa estação”, enquanto o “Ponto 2” apresentou altas contagens em ambas as estações avaliadas (Tabela 1.2). A contagem de heterotróficos totais diferiu entre as amostragens no “Ponto 3. Como esse ponto está no centro da Laguna, provavelmente foi mais afetado pela maior carga de nutrientes presente nas águas que fluem dos rios à montante. No entanto, este ponto também demonstrou a menor quantidade de

coliformes termotolerantes na “baixa temporada” (Tabela 1.2), o que indica menor impacto pontual ou mesmo a diluição de contaminantes de origem fecal.

Tabela 1.2. Caracterização microbiológica das amostras de água em quatro pontos da Laguna Tramandaí, em ambas as estações avaliadas (“baixa”, em agosto de 2014, e “alta”, em janeiro de 2015).

	<i>Baixa estação</i>	<i>Alta estação</i>
Heterotróficos totais		
Ponto 1	3.74 ± 0.17 ^A	2.82 ± 1.04 ^B
Ponto 2	2.73 ± 0.46^{A, C}	4.45 ± 0.25^A
Ponto 3	4.37 ± 0.05^{A, B}	2.25 ± 0.24^{B, C}
Ponto 4	2.91 ± 0.44 ^{A, C}	3.49 ± 0.88 ^{A, B, C}
Coliformes totais		
Ponto 1	3 ± 0.14 ^A	2.45 ± 0.59 ^B
Ponto 2	2.4 ± 0.46^A	4.29 ± 0.25^A
Ponto 3	3.02 ± 0.04 ^A	2.43 ± 0.1 ^B
Ponto 4	3.03 ± 0.48 ^A	2.4 ± 0.1 ^B
Coliformes termotolerantes		
Ponto 1	2.47 ± 0.45^A	0.88 ± 0.32^C
Ponto 2	2.5 ± 0.24^A	4.24 ± 0.21^A
Ponto 3	2 ± 0.1 ^B	1.84 ± 0.25 ^B
Ponto 4	2.64 ± 0.19^A	1.44 ± 0.18^{B, C}

Média das unidades formadoras de colônia contabilizadas ± desvio padrão (log₁₀-transformed). Valores significativamente diferentes estão marcados em negrito (comparação entre as estações) ou apresentam letras diferentes (comparação entre os pontos) (p<0.05, ANOVA de dois fatores seguida pelo Teste de Tukey).

A quantidade de coliformes totais não apresentou variação entre as estações e os pontos de amostragem (exceto no “Ponto 2”). O “Ponto 2” foi o único em que todas as variáveis microbiológicas avaliadas (heterotrófico totais, coliformes totais e coliformes termotolerantes) variaram entre as estações (Tabela 1.2). Além disso, o “Ponto 2” destacou-se na “alta temporada” por apresentar quantidades de coliformes

totais e termotolerantes significativamente diferentes dos demais pontos (Tabela 1.2), indicando que a urbanização presente neste ponto pode estar relacionada com a maior carga de poluentes de origem fecal, especialmente neste período de alta populacional.

Análise da presença de genes de resistência a antimicrobianos

Nove dos 23 genes analisados amplificaram em pelo menos uma das amostras analisadas (Tabela 1.3). Entre as β -lactamases, apenas o *bla*_{GES}-like foi encontrado, em ambas as estações e em quase todos os pontos da Laguna (Tabela 1.3). Entre os genes que codificam sistemas de efluxo, foram encontrados *tetB*, *acrA*, *acrB*, *toIC*, *adeS*, *mexB* e *mexF* - sendo *mexB* o mais frequente (Tabela 1.3). Os genes de segmentos conservados de integrons de classe I foram presentes em ambas as estações.

Na baixa temporada, os genes analisados foram mais frequentes nos pontos urbanizados (1 e 2) (Tabela 1.3); enquanto na alta temporada, esses genes distribuíram-se mais uniformemente na Laguna (destaque para o Ponto 4) (Tabela 1.3). O “Ponto 3” pareceu ser mais sensível à variabilidade temporal, pois na baixa temporada apresentou apenas os genes de segmentos conservados de integrons de classe I, enquanto na alta temporada outros genes também foram encontrados (Tabela 1.3).

Tabela 1.3. Genes presentes (+) em pelo menos uma das amostras de água da Laguna Tramandaí. As amostras nas quais os genes não amplificaram estão assinaladas com o sinal de negativo (-).

Genes	Baixa estação				Alta estação			
	Point 1	Point 2	Point 3	Point 4	Point 1	Point 2	Point 3	Point 4
<i>bla</i> _{GES}	+	+	-	+	+	+	+	+
5'- 3'CS	+	-	+	-	+	+	+	+
<i>tetB</i>	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>acrA</i>	+	+	-	-	+	-	+	+
<i>acrB</i>	+	+	-	+	-	-	+	+
<i>toIC</i>	+	-	-	+	+	-	+	-
<i>adeS</i>	-	+	-	-	-	+	-	+
<i>mexB</i>	+	+	-	-	+	+	+	+
<i>mexF</i>	+	+	-	-	+	+	-	+

Níveis de antimicrobianos acima de 400ng.L^{-1} não foram observados, o que não exclui a possibilidade de contaminação em níveis inferiores ao limite de detecção. Por outro lado, os resíduos de Tiametoxan, Triciclazole e Propoxur (dos 171 pesticidas avaliados) foram detectados em todos os locais de amostragem.

Bactérias resistentes às quatro classes de antimicrobianos foram observadas nas águas da Laguna de Tramandaí nas duas estações e em quase todos os pontos avaliados. As contagens de bactérias resistentes foram maiores quando as amostras receberam dupla adição de antimicrobianos (Figura 1.1). As resistências à imipenem e tetraciclina foram detectadas na “alta temporada” somente após a dupla suplementação (Figura 1.1), a qual pode ser importante para avaliar bactérias cultiváveis resistentes em amostras de ambientes aquáticos. Observaram-se contagens superiores de bactérias resistentes a ácido nalidíxico e à tetraciclina (Figura 1.1). Os pontos “2” e “4” evidenciaram maiores contagens em ambas as estações e para quase todos os tipos de suplementação antimicrobiana (Figura 1.1).

As contagens dos controles representam a quantidade de bactérias cultiváveis totais sob enriquecimento não seletivo, incluindo bactérias nativas sensíveis e resistentes. Algumas amostras se destacaram por apresentar contagens de bactérias resistentes equivalentes àquelas aferidas no controle: suplementação simples com ácido nalidíxico (amostras dos pontos “1”, “3” e “4” na alta estação); suplementação dupla com ácido nalidíxico (amostras dos pontos “3” e “4” na baixa estação e de todos os pontos na alta estação); suplementação simples e dupla com ceftazidima (amostras dos pontos “1” e “2” na alta estação); e suplementação dupla com tetraciclina (amostras dos pontos “1”, “2” e “4” na baixa estação e dos pontos “1”, “2” e “3” na alta estação). Embora as contagens de resistência fossem geralmente maiores na “baixa temporada”, as contagens equivalentes aos controles foram mais frequentes na “alta temporada” (Figura 1.1), quando as atividades antropogênicas são mais frequentes na região. Além disso, 50% das amostras da “alta temporada” apresentaram contagem bacteriana que não diferiu estatisticamente entre suplementação simples e dupla (dados não mostrados). Outros fatores além da pressão do medicamento, como outros poluentes, podem influenciar localmente a dinâmica de resistência na “alta temporada”. A resistência total ao ácido nalidíxico e ao imipenem nos pontos “1” e “4” pareceu variar mais entre as estações do que outros (valores significativamente diferentes entre as estações estão assinalados em **negrito** na Figura 1.1).

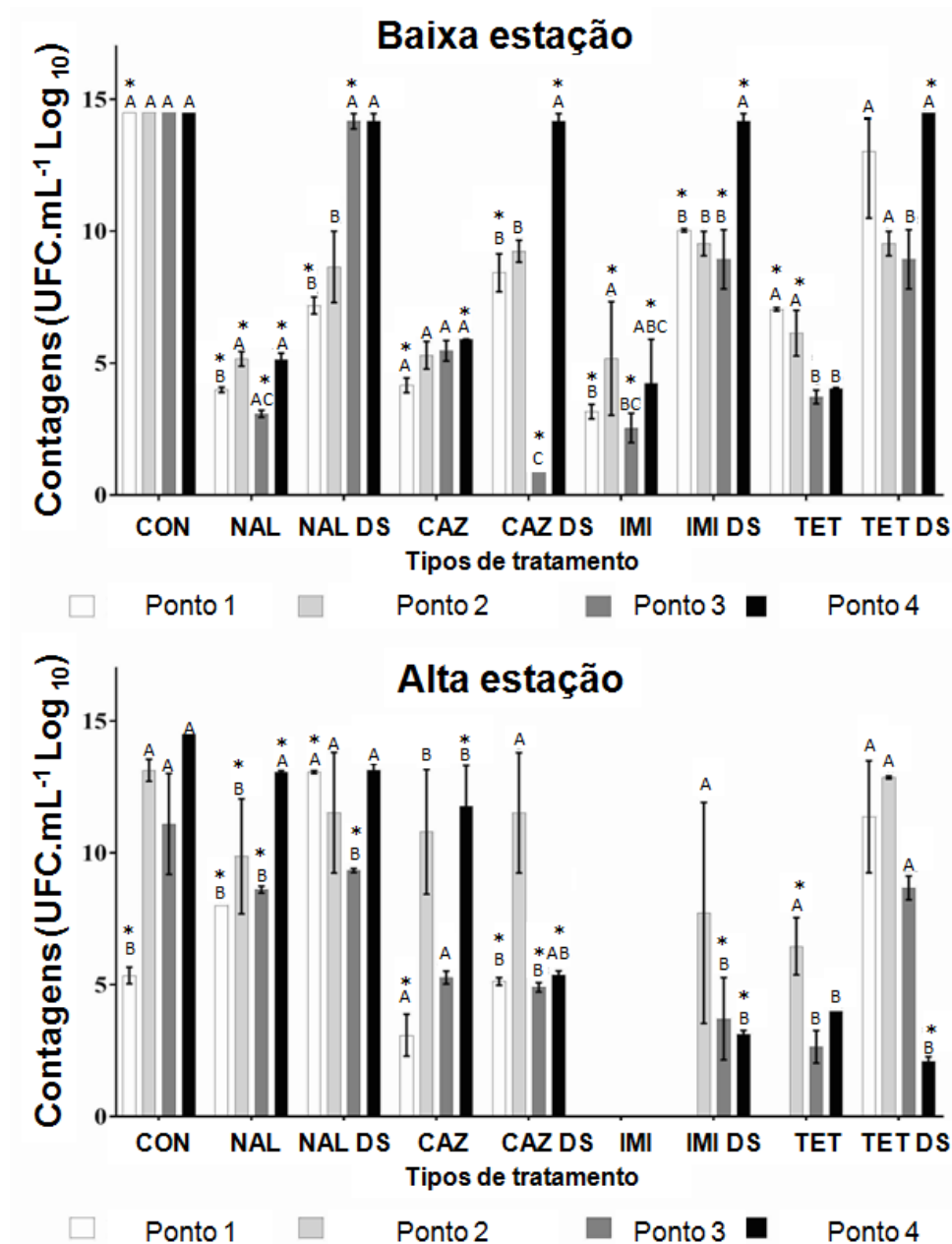


Figura 1.1. Contagens de bactérias resistentes presentes nas amostras da Laguna Tramandaí. Valores significativamente diferentes entre os pontos (na mesma estação) apresentam letras diferentes e entre as estações apresentam um asterisco (*) ($p < 0,05$, ANOVA de dois fatores, seguido do teste post hoc de Tukey). Tratamentos: COM = controles. NAL = suplementação simples com ácido nalidíxico. NAL SD = suplementação dupla com ácido nalidíxico. CAZ = suplementação única com ceftazidima. CAZ SD = suplementação dupla com ceftazidima. IMI = suplementação única com imipenem. IMI SD = suplementação dupla com imipenem. TET = suplementação única com tetraciclina. TET SD = suplementação dupla com tetraciclina.

Correlação e análise de componente principal

O agrupamento dos dados de contagens de bactérias resistentes (incluindo os respectivos controles) com os dados das variáveis físico-químicas e microbiológicas através da abordagem multivariada (PCA) evidenciou algumas correlações importantes (Figura 1.2). As estações foram avaliadas isoladamente; o eixo X explicou 51.59% da variabilidade na “baixa estação” e 43.74% na “alta estação”, enquanto o eixo Y explicou um adicional de 29.24% da variabilidade na “baixa estação” e 33.18% na “alta estação” (Figura 1.2). Uma vez que as contagens foram agrupadas pelos pontos amostrados (Figura 1.2), as condicionantes ambientais pareceram ser mais importantes para as variações observadas nas contagens de bactérias resistentes do que o tipo de antimicrobiano utilizado no teste *in vitro*.

Na “baixa estação”, as contagens de bactérias resistentes no “Ponto 1” foram relacionadas com as mesmas variáveis dos pontos “2” e “3” - os quais não apresentaram interações similares entre si (Figure 1.2). As contagens de bactérias resistentes do “Ponto 4” tiveram fraca correlação com as contagens obtidas nos outros pontos da Laguna (Figura 1.2). Por outro lado, as contagens de bactérias resistentes dos pontos “3” e “4” tiveram forte correlação entre si, enquanto aquelas dos pontos “1” e “2” tiveram fraca correlação entre si e foram influenciadas por diferentes variáveis (Figura 1.2).

Em ambas as estações, as contagens de bactérias resistentes das amostras do “Ponto 2” foram explicadas por alguns dos nutrientes avaliados, bem como pelas contagens de coliformes termotolerantes (cuja correlação é ainda mais alta na alta estação”) (Figura 1.2). Logo, a variância na contagem de bactérias resistentes no ponto urbanizado aparentou ser influenciada por contaminantes de origem fecal, especialmente na alta estação - o que pode ser um possível efeito da intensificação da urbanização no local neste período.

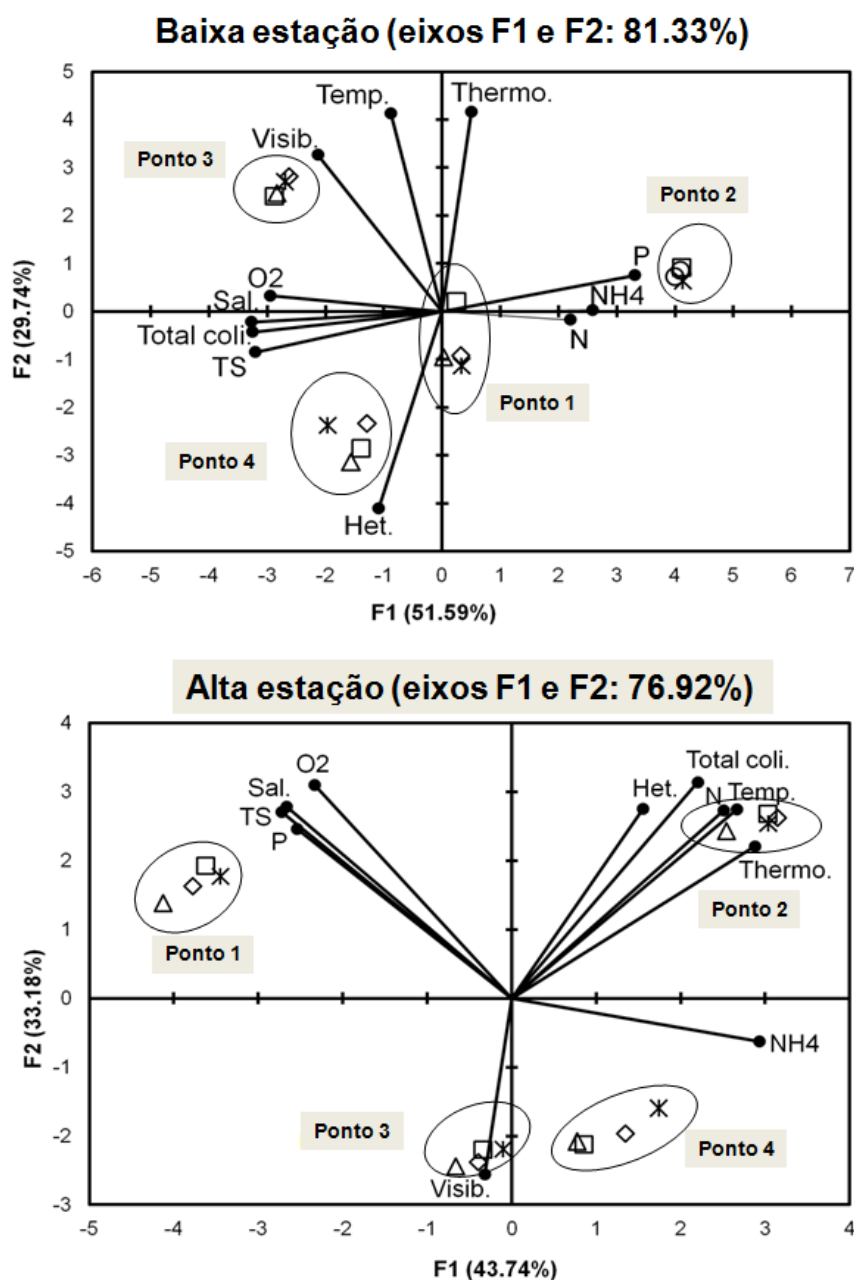


Figura 1.2. Análise de componente principal (PCA) entre as variáveis físico-químicas e microbiológicas e as contagens de bactérias resistentes das amostras de água da Laguna Tramandaí. Os dados das contagens de bactérias resistentes a diferentes antimicrobianos são ilustrados pelos símbolos: * tratamentos com ácido nalidíxico; □ tratamentos com ceftazidima; △ tratamentos com imipenem; ◇ tratamentos com tetraciclina. Abreviaturas: *Temp.* = temperature; *Sal.* = Salinidade; *O2* = oxigênio dissolvido; *P* = fósforo total; *N* = nitrogênio total; *NH4* = nitrogênio amoniacal; *TS* = sólidos totais; *Visib.* = visibilidade; *Het.* = heterotróficos totais; *Total coli.* = coliformes totais; *Thermo.* = coliformes termotolerantes.

Discussão

Independente da estação, e conseqüentemente do regime de maré vigente no ato da amostragem, os pontos urbanizados (“1” e “2”) demonstraram características as quais são usualmente atribuídas ao impacto por atividades de origem antropogênica, como altas concentrações de nutrientes e maiores valores para as variáveis microbiológicas, especialmente para coliformes termotolerantes (Tabelas 1.1 e 1.2). De acordo com a legislação ambiental vigente no Brasil (CONAMA Resolução nº357, BRASIL, 2005), águas salobras balneáveis apresentam níveis de fósforo abaixo de 0.124 mg.L^{-1} e de nitrogênio amoniacal abaixo de 0.40 mg.L^{-1} , indicando que a Laguna estava saturada destes elementos no momento da coleta, especialmente nos pontos urbanizados (“1” and “2”) (Tabela 1.2). As contagens de coliformes termotolerantes no “Ponto 2” (Tabela 1.2), assim como a correlação desta variável com as contagens de bactérias resistentes (Figura 1.2), possivelmente estejam correlacionadas à concentração de atividades humanas nessa zona da Laguna. Adicionalmente, as contagens de resistentes variaram menos entre as temporadas avaliadas neste ponto (Figura 1.1), sugerindo a influência de fatores locais atuando para manutenção das linhagens resistentes. Alterações na paisagem oriundas da urbanização têm sido associadas a mudanças na comunidade bacteriana, incluindo o aumento na quantidade de coliformes termotolerantes (Garbossa et al., 2017) e de bactérias resistentes (Wang et al. 2016; Yang et al. 2017).

Mesmo baixas concentrações de antimicrobianos também podem contribuir para a seleção da resistência em populações nativas suscetíveis (Gullberg et al., 2011). Os antimicrobianos raramente ocorrem em concentrações letais fora dos ambientes clínicos e principalmente em ambientes altamente diluídos, como cursos d’água. A presença de níveis antimicrobianos acima de 400 ng.L^{-1} não foi observada nas amostras de água superficial avaliadas. Contudo, diferentes estudos já detectaram níveis de antimicrobianos abaixo deste limiar em amostras de ambientes aquáticos (Kummerer, 2009). Uma vez que foram utilizadas concentrações de antimicrobianos superiores à CIM (CLSI, 2014) na técnica de suplementação e mesmo assim foram selecionadas quantidades de bactérias resistentes similares às presentes nos controles (bactérias resistentes mais suscetíveis), pode-se sugerir que as águas da Laguna Tramandaí têm previamente sido expostas a concentrações

muito baixas dos fármacos testados. Entre os pesticidas encontrados, o Triciclazol é um fungicida de amplo espectro usado para controlar doenças de plantas em cereais e frutas (Padovani et al., 2006). O Tiametoxan é um neoticotinóide e o Propoxur é um carbamato, ambos são inseticidas que atuam no sistema nervoso central de insetos e são usados para controlar pragas agrícolas (Martins et al., 2012). Apesar de haver muitas lacunas no conhecimento sobre a ação destes pesticidas em bactérias, sabe-se que tanto compostos orgânicos quanto metais podem influenciar na persistência da resistência a determinados antimicrobianos (Kamanavalli e Ninnekar, 2000; Piddock et al., 2006).

Observou-se que as bactérias cultiváveis resistentes à quinolona e tetraciclina foram as mais numerosas nas amostras da Laguna Tramandaí (Figura 1.1). Entre os antimicrobianos avaliados, apenas a tetraciclina tem origem biológica. Um estudo que avaliou diferentes ambientes aquáticos da costa dos Estados Unidos sugeriu que a resistência a antimicrobianos sintéticos pode ser uma evidência direta da interferência de efluentes contaminados por estes fármacos, uma vez que as bactérias não experimentariam essas moléculas em interações célula-célula naturais (Hatosy; Martiny, 2015). Então, a prevalência de bactérias resistentes a ácido nalidíxico (Figura 1.1) pode ser um reflexo de distúrbios antrópicos, mesmo na baixa temporada. Contudo, o aumento da resistência à tetraciclina em bactérias isoladas de cursos d'água também tem sido atribuído ao uso excessivo deste antimicrobiano na aquicultura (Young et al., 2013) e na agricultura (Winkworth-Lawrence; Lange, 2016). Uma grande parte da área da Bacia do Rio Tramandaí é composta de áreas de plantio, principalmente de arroz (Loitzenbauer e Mendes, 2012), o que provavelmente impacta as bactérias nativas dos pontos adjacentes. As amostras do “Ponto 4”, adjacentes às áreas de cultivo, revelaram altas contagens de bactérias resistentes na “baixa temporada” (Figura 1.1). Estes resultados sugerem que o manejo da agricultura bem como a presença de urbanização podem impactar na resistência das bactérias nativas da Laguna, e que a baixa temporada representa um período tão crítico para a expressão da resistência a antimicrobianos quanto a alta temporada. Apesar da resistência à tetraciclina ter sido observada nas bactérias cultivadas sob estresse antimicrobiano e ser comumente disseminada em ambientes aquáticos (Harnisz et al., 2015), o gene *tetB* foi identificado apenas na baixa estação, no “Ponto 2”.

Embora as contagens de resistência a imipenem e à ceftazidima tenham sido mais baixas, a seleção dessas resistências tem sido raramente documentada em ambientes naturais (Montezzi et al., 2015; Malik et al., 2015; Kittinger et al., 2016). Entre os genes de β -lactamases analisados, o *bla*_{GES} foi o único encontrado nas águas da Laguna. Recentemente, foi demonstrado que uma variante deste gene, o *bla*_{GES-5}, é frequentemente transportado por isolados de *Enterobacteriaceae*, bactérias onipresentes no meio aquático (Manageiro et al., 2014). No Brasil, este gene também foi detectado em isolados de *Klebsiella* sp. e *Enterobacter* sp. em águas de uso recreativo (Paschoal et al., 2017) e de ambientes aquáticos urbanos (de Araujo et al., 2016). A presença do gene *bla*_{GES} nas amostras pode estar relacionada à expressão da resistência a imipenem observada nas populações de bactérias. Já a presença de integrons de classe 1 pode ser resultante do impacto das atividades antrópicas desenvolvidas no entorno da Laguna, o que já vem sendo reportado em estudos em outras localidades (Abella et al., 2015; Gillings et al., 2015). Estes elementos foram encontrados em ambas as estações e em amostras de quase todos os pontos de coleta, e podem ser importantes para disseminar diferentes tipos de resistência a antimicrobianos no meio ambiente (Stalder et al., 2012).

A detecção de bactérias resistentes em meio de cultivo suplementado com antimicrobiano é uma ferramenta tradicionalmente utilizada para avaliar a presença destas bactérias em diferentes ambientes aquáticos (Harnisz et al., 2015; Mao et al., 2015). De certo modo, o enriquecimento prévio das amostras simula uma situação de estresse ambiental, pois introduz nutrientes e, a partir da adição do antimicrobiano, seleciona bactérias nativas resistentes presentes na amostra. Na amostragem realizada no verão foi possível detectar populações resistentes a imipenem e tetraciclina somente após a dupla suplementação com os antimicrobianos (não sendo observadas populações resistentes em suplementação única) (Figura 1.1). Uma vez que no meio aquático tanto as células microbianas quanto os nutrientes encontram-se altamente diluídos (Xu et al., 2016), assume-se que a resistência bacteriana a antimicrobianos tem sido subestimada nestes ambientes. Embora apresente algumas limitações (tais como estimativa indireta da resistência, origem desconhecida dos mecanismos de resistência e desconhecimento de atributos como diversidade e riqueza de espécies presentes nas amostras), a abordagem utilizada é uma alternativa de baixo custo que permitiu categorizar a Laguna de Tramandaí

como um reservatório natural de bactérias resistentes e genes de resistência a antimicrobianos.

De acordo com um levantamento realizado por Nascimento e Araújo (2014), o estudo da resistência a antimicrobianos em ambientes aquáticos brasileiros tem focado principalmente na análise de sistemas de água doce (em sua maioria tanques de aquacultura), sendo a técnica de disco difusão a principal metodologia utilizada. Isto sugere uma demanda para estudos da resistência antimicrobiana em ambientes naturais, principalmente costeiros (marinhos). A metodologia adotada neste estudo permitiu realizar inferências sobre a distribuição da resistência no ambiente, contribuindo para reduzir o tempo e o custo da análise em comparação aquelas que dependem de isolamento em culturas puras ou do uso de discos de antibiótico. A resistência a antimicrobianos tem sido pobremente explorada em reservatórios aquáticos da costa sul do Brasil (Canal et al., 2016). Como os estuários são sistemas altamente dinâmicos e complexos, faz-se necessário avaliar a variabilidade das populações bacterianas em uma maior escala de tempo a fim de prevenir, detectar ou mesmo mitigar a veiculação de linhagens resistentes e, conseqüentemente, de surtos de infecções de difícil tratamento.

Conclusão

Este estudo demonstrou que a Laguna Tramandaí pode ser um reservatório de fatores de resistência, incluindo aqueles que são clinicamente relevantes (especialmente a resistência à ceftazidima e a imipenem), mesmo na ausência de quantidades detectáveis de antimicrobianos nas amostras. A presença de populações de bactérias resistentes ocorreu mesmo na amostragem da baixa temporada, sugerindo a necessidade de ações mitigatórias sistemáticas, de modo independente da estação do ano. Esses dados afirmam a importância da realização de mais estudos em habitats naturais, a fim de identificar fontes de contaminação, bem como a resposta das populações de bactérias nativas ao estresse por antimicrobianos. Como a zona costeira é globalmente pressionada pela urbanização, o impacto dos efeitos antrópicos na persistência da resistência a antimicrobianos em ambientes costeiros transcende a relevância regional deste estudo.

Referências

1. Abella, J., Bielen, A., Huang, L., Delmont, T. O., Vujaklija, D., Duran, R., & Cagnon, C. (2015). Integron diversity in marine environments. *Environmental Science and Pollution Research*, <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5085-3>.
2. Aminov, R. I., 2011. Horizontal gene exchange in environmental microbiota. *Frontiers in Microbiology*, <http://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00158>.
3. Beheshti, M., Talebi, M., Ardebili, A., Bahador, A., & Lari, A. R. (2014). Detection of AdeABC efflux pump genes in tetracycline-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from burn and ventilator-associated pneumonia patients. *Journal of pharmacy & bioallied sciences*, <http://doi.org/10.4103/0975-7406.142949>.
4. Blair, J. M., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O., Piddock, L. J. (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology*, <http://doi.org/10.1038/nrmicro3380>.
5. BRASIL. Resolução CONAMA 357, de 17 de março de 2005. Conselho Nacional de Meio Ambiente. <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf> (accessed 29 August 2017).
6. Calliari, L. J., Winterwerp, J. C., Fernandes, E., Cuchiara, D., Vinzon, S. B., Sperle, M., & Holland, K. T. (2009). Fine grain sediment transport and deposition in the Patos Lagoon–Cassino beach sedimentary system. *Continental Shelf Research*, <http://doi.org/10.1016/j.csr.2008.09.019>.
7. Canal, N., Meneghetti, K. L., Almeida, C. P. D., Bastos, M. D. R., Otton, L. M., & Corção, G. (2016). Characterisation of the variable region in the class 1 integron of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* isolated from surface water. *Brazilian Journal of Microbiology*, <http://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.01.015>.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2014. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 24th informational supplement. CLSI document M100-S24. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
9. Czekalski, N., Sigdel, R., Birtel, J., Matthews, B., & Bürgmann, H. (2015). Does human activity impact the natural antibiotic resistance background? Abundance of antibiotic resistance genes in 21 Swiss lakes. *Environment international*, <http://doi.org/10.1016/j.envint.2015.04.005>.
10. da Costa Andrade, V., Zampieri, B. D. B., Ballesteros, E. R., Pinto, A. B., & De Oliveira, A. J. F. C. (2015). Densities and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolated from marine waters and beach sands. *Environmental Monitoring and Assessment*, <http://doi.org/10.1007/s10661-015-4573-8>.
11. de Araujo, C. F. M., Silva, D. M., Carneiro, M. T., Ribeiro, S., Fontana-Maurell, M., Alvarez, P., ... & Carvalho-Assef, A. P. D. A. (2016). Detection of carbapenemase genes in aquatic environments in Rio de Janeiro, Brazil. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, <http://doi.org/10.1128/AAC.02753-15>.

12. Diaz, R., Ibáñez, M., Sancho, J. V., & Hernández, F. (2013). Qualitative validation of a liquid chromatography–quadrupole-time of flight mass spectrometry screening method for organic pollutants in waters. *Journal of Chromatography A*, <http://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.12.030>.
13. Fuentefria, D. B., Ferreira, A. E., Gräf, T., & Corção, G. (2009). Spread of Metallo- β -lactamases: screening reveals the presence of a BLA SPM-1 gene in hospital sewage in southern Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, <http://doi.org/10.1590/S1517-838220090001000013>.
14. Garbossa, L. H., Souza, R. V., Campos, C. J., Vanz, A., Vianna, L. F., & Rupp, G. S. (2017). Thermotolerant coliform loadings to coastal areas of Santa Catarina (Brazil) evidence the effect of growing urbanisation and insufficient provision of sewerage infrastructure. *Environmental Monitoring and Assessment*, <http://doi.org/10.1007/s10661-016-5742-0>.
15. Gaw, S., Thomas, K., & Hutchinson, T. H., 2015. Pharmaceuticals in the marine environment. In *Pharmaceuticals in the Environment* (pp. 70-91).
16. Gillings, M. R., Gaze, W. H., Pruden, A., Smalla, K., Tiedje, J. M., & Zhu, Y. G. (2015). Using the class 1 integron-integrase gene as a proxy for anthropogenic pollution. *The ISME journal*, <http://doi.org/10.1038/ismej.2014.226>.
17. Gullberg, E., Cao, S., Berg, O. G., Ilbäck, C., Sandegren, L., Hughes, D., & Andersson, D. I. (2011). Selection of resistant bacteria at very low antibiotic concentrations. *PLoS pathogens*, <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002158>.
18. Harnisz, M., Korzeniewska, E., Ciesielski, S., & Gołaś, I. (2015). tet genes as indicators of changes in the water environment: Relationships between culture-dependent and culture-independent approaches. *Science of the Total Environment*, <http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.10.048>.
19. Hatosy, S. M., & Martiny, A. C. (2015). The ocean as a global reservoir of antibiotic resistance genes. *Applied and Environmental Microbiology*, <http://doi.org/10.1128/AEM.00736-15>.
20. Jank, L., Hoff, R. B., Costa, F. J. D., & Pizzolato, T. M. (2014). Simultaneous determination of eight antibiotics from distinct classes in surface and wastewater samples by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography–electrospray ionisation mass spectrometry. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, <http://dx.doi.org/10.1080/03067319.2014.914184>.
21. Jeong, S. H., Bae, I. K., Park, K. O., An, Y. J., Sohn, S. G., Jang, S. J., ... & Lee, S. H. (2006). Outbreaks of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing carbapenemases in Korea. *The Journal of Microbiology*, PMID: 16953178.
22. Kondo, Y., Ito, T., Ma, X. X., Watanabe, S., Kreiswirth, B. N., Etienne, J., & Hiramatsu, K. (2007). Combination of multiplex PCRs for staphylococcal cassette chromosome mec type assignment: rapid identification system for mec, ccr, and

- major differences in junkyard regions. Antimicrobial agents and chemotherapy, <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00165-06>.
23. Kümmerer, K. (2009). Antibiotics in the aquatic environment—a review—part I. Chemosphere, <http://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.11.086>.
 24. Kumm, M., De Moel, H., Salvucci, G., Viviroli, D., Ward, P. J., & Varis, O. (2016). Over the hills and further away from coast: global geospatial patterns of human and environment over the 20th–21st centuries. Environmental Research Letters, <http://doi.org/10.1088/1748-9326/11/3/034010>.
 25. Levesque, C., Piche, L., Larose, C., & Roy, P. H. (1995). PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. Antimicrobial agents and chemotherapy, <http://doi.org/10.1128/AAC.39.1.185>.
 26. Kittinger, C., Lipp, M., Baumert, R., Folli, B., Koraimann, G., Toplitsch, D., ... & Zarfel, G. (2016). Antibiotic resistance patterns of *Pseudomonas* spp. isolated from the River Danube. Frontiers in microbiology, <http://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00586>.
 27. Li, D., Qi, R., Yang, M., Zhang, Y., & Yu, T. (2011). Bacterial community characteristics under long-term antibiotic selection pressures. Water Research, <http://doi.org/10.1016/j.watres.2011.09.002>.
 28. Loitzenbauer, E., & Mendes, C. A. B. (2012). Salinity dynamics as a tool for water resources management in coastal zones: An application in the Tramandaí River basin, southern Brazil. Ocean & Coastal Management, <http://doi.org/10.1016/j.ocecoaman.2011.10.011>.
 29. Malik, A., Khan, F., Rizvi, M., Shukla, I., Afaq, S., & Sultan, A. (2015). Trends in Antimicrobial Resistance of Bacterial Isolates Circulating in Sewage Waters of Aligarh Region over a Period of 14 Years. Asian Journal of Water, Environment and Pollution, 12(1), 69-74.
 30. Manageiro, V., Ferreira, E., Caniça, M., & Manaia, C. M. (2014). GES-5 among the β -lactamases detected in ubiquitous bacteria isolated from aquatic environment samples. FEMS Microbiology Letters, <http://doi.org/10.1111/1574-6968.12340>.
 31. Mao, D., Yu, S., Rysz, M., Luo, Y., Yang, F., Li, F., ... & Alvarez, P. J. J. (2015). Prevalence and proliferation of antibiotic resistance genes in two municipal wastewater treatment plants. Water Research, <http://doi.org/10.1016/j.watres.2015.09.010>.
 32. Medeanic, S. (2006). Freshwater algal palynomorph records from Holocene deposits in the coastal plain of Rio Grande do Sul, Brazil. Review of Palaeobotany and Palynology, <http://doi.org/10.1016/j.revpalbo.2006.03.012>.
 33. Monteiro, M. A., Spisso, B. F., dos Santos, J. R. M. P., da Costa, R. P., Ferreira, R. G., Pereira, M. U., ... & d'Avila, L. A. (2016). Occurrence of antimicrobials in river water samples from rural region of the State of Rio de Janeiro,

34. Montezzi, L. F., Campana, E. H., Corrêa, L. L., Justo, L. H., Paschoal, R. P., da Silva, I. L. V. D., ... & Picão, R. C. (2015). Occurrence of carbapenemase-producing bacteria in coastal recreational waters. *International journal of antimicrobial agents*, <http://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2014.10.016>.
35. Nascimento, E. D. D., & Araújo, M. F. F. D. (2014). Antimicrobial resistance in bacteria isolated from aquatic environments in Brazil: a systematic review. *Revista Ambiente & Água*, <http://doi.org/10.4136/ambi-agua.1343>.
36. Ng, L. K., Martin, I., Alfa, M., & Mulvey, M. (2001). Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes. *Molecular and cellular probes*, <http://doi.org/10.1006/mcpr.2001.0363>.
37. Oliveira, S. S. A., Sorgine, M. H. F., Bianco, K., Pinto, L. H., Barreto, C., Albano, R. M., ... & Clementino, M. M. (2016). Detection of human faecal contamination by nifH gene quantification of marine waters in the coastal beaches of Rio de Janeiro, Brazil. *Environmental Science and Pollution Research*, <http://doi.org/10.1007/s11356-016-7737-3>.
38. Olsen, J. E., Christensen, H., & Aarestrup, F. M. (2006). Diversity and evolution of bla_Z from *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, <http://doi.org/10.1093/jac/dki492>.
39. Paschoal, R. P., Campana, E. H., Corrêa, L. L., Montezzi, L. F., Barreto, L. R., da Silva, I. R., ... & Picão, R. C. (2017). Concentration and variety of carbapenemase producers in recreational coastal waters showing distinct levels of pollution. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, <http://doi.org/10.1128/AAC.01963-17>.
40. Perry, J., & Wright, G. (2013). The antibiotic resistance “mobilome”: searching for the link between environment and clinic. *Frontiers in Microbiology*, <http://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00138>.
41. Petit, F., Berthe, T., Budzinski, H., Leclercq, R., Cattoir, V., Andremont, A., ... & Denamur, E. (2014). Vulnerability and Resilience of Estuaries to Contamination by Antibiotics and Antibiotic-Resistant Bacteria: A Challenge for the Next Decade. *Vulnerability of Coastal Ecosystems and Adaptation*, <http://doi.org/10.1002/9781119007739.ch2>.
42. Poirel, L., Naas, T., Le Thomas, I., Karim, A., Bingen, E., & Nordmann, P. (2001). CTX-M-type extended-spectrum β -lactamase that hydrolyzes ceftazidime through a single amino acid substitution in the omega loop. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, <http://doi.org/10.1128/AAC.45.12.3355-3361.2001>.
43. Poirel, L., Rodriguez-Martinez, J. M., Mammeri, H., Liard, A., & Nordmann, P. (2005). Origin of plasmid-mediated quinolone resistance determinant QnrA. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49(8), 3523-3525. <http://doi.org/10.1128/AAC.49.8.3523-3525.2005>.

44. Potron, A., Poirel, L., & Nordmann, P. (2011). Origin of OXA-181, an emerging carbapenem-hydrolysing oxacillinase, as a chromosomal gene in *Shewanella xiamenensis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, <http://doi.org/10.1128/AAC.00681-11>.
45. Pruden, Amy; Arabi, Mazdak; Storteboom, Heather N. (2012). Correlation between upstream human activities and riverine antibiotic resistance genes. *Environmental science & technology*, <http://doi.org/10.1021/es302657r>.
46. Quadra, G. R., de Souza, H. O., dos Santos Costa, R., & dos Santos Fernandez, M. A. (2016). Do pharmaceuticals reach and affect the aquatic ecosystems in Brazil? A critical review of current studies in a developing country. *Environmental Science and Pollution Research*, <http://doi.org/10.1007/s11356-016-7789-4>.
47. SEMA - Secretaria do Ambiente e Desenvolvimento Sustentável, 2017. <http://www.sema.rs.gov.br/bacia-hidrografica-do-rio-tramandai/> (accessed 29 August 2017).
48. Stalder, T., Barraud, O., Casellas, M., Dagot, C., & Ploy, M. C. (2012). Integron involvement in environmental spread of antibiotic resistance. *Frontiers in microbiology*, <http://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00119>.
49. Swick, M. C., Morgan-Linnell, S. K., Carlson, K. M., & Zechiedrich, L. (2011). Expression of multidrug efflux pump genes *acrAB-tolC*, *mdfA*, and *norE* in *Escherichia coli* clinical isolates as a function of fluoroquinolone and multidrug resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, <http://doi.org/10.1128/AAC.00996-10>.
50. Tabajara, L.L. & Dillenburg, S. R. (1997). *Batimetria e Sedimentos de Fundo da Laguna de Tramandaí - RS. Notas Técnicas*, 10: 21-33.
51. Tacão, M., Correia, A., & Henriques, I. S. (2015). Low prevalence of carbapenem-resistant bacteria in river water: resistance is mostly related to intrinsic mechanisms. *Microbial Drug Resistance*, <http://doi.org/10.1089/mdr.2015.0072>.
52. Talukdar, P. K., Rahman, M., Rahman, M., Nabi, A., Islam, Z., Hoque, M. M., ... & Islam, M. A. (2013). Antimicrobial resistance, virulence factors and genetic diversity of *Escherichia coli* isolates from household water supply in Dhaka, Bangladesh. *Plos one*, <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0061090>.
53. Tomazelli, L.J. & Villwock, J.A. (1991). *Geologia do Sistema Lagunar Holocênico do Litoral Norte do Rio Grande do Sul, Brasil. Pesquisas*, 18(1): 13-24.
54. Wang, P., Chen, B., Yuan, R., Li, C., & Li, Y. (2016). Characteristics of aquatic bacterial community and the influencing factors in an urban river. *Science of the Total Environment*, <http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.06.130>.
55. Winkworth-Lawrence, C., & Lange, K. (2016). Antibiotic resistance genes in freshwater biofilms may reflect influences from high-intensity agriculture. *Microbial Ecology*, <http://doi.org/10.1007/s00248-016-0740-x>.

56. Woodford, N., Ellington, M. J., Coelho, J. M., Turton, J. F., Ward, M. E., Brown, S., ... & Livermore, D. M. (2006). Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *International journal of antimicrobial agents*, <http://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2006.01.004>.
57. Würdig, N.L. (1987). Alguns dados físicos e químicos do sistema lagunar de Tramandaí, Rio Grande do Sul. *Pesquisas*, 20:49-74.
58. Xu, Y., Guo, C., Luo, Y., Lv, J., Zhang, Y., Lin, H., ... & Xu, J. (2016). Occurrence and distribution of antibiotics, antibiotic resistance genes in the urban rivers in Beijing, China. *Environmental Pollution*, <http://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.03.054>.
59. Yang, Y., Xu, C., Cao, X., Lin, H., & Wang, J. (2017). Antibiotic resistance genes in surface water of eutrophic urban lakes are related to heavy metals, antibiotics, lake morphology and anthropic impact. *Ecotoxicology*, <http://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.03.054>.
60. Yoneda, K., Chikumi, H., Murata, T., Gotoh, N., Yamamoto, H., Fujiwara, H., Nishino, T., Shimizu, E. (2005). Measurement of *Pseudomonas aeruginosa* multidrug efflux pumps by quantitative real-time polymerase chain reaction. *FEMS Microbiology Letters*, <http://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.11.048>.
61. Young, S., Juhl, A., & O'Mullan, G. D. (2013). Antibiotic-resistant bacteria in the Hudson River Estuary linked to wet weather sewage contamination. *Journal of Water and Health*, <http://doi.org/10.2166/wh.2013.131>.
62. Xavier, D. E., Picão, R. C., Girardello, R., Fehlberg, L. C., & Gales, A. C. (2010). Efflux pumps expression and its association with porin down-regulation and β -lactamase production among *Pseudomonas aeruginosa* causing bloodstream infections in Brazil. *BMC microbiology*, <http://doi.org/10.1186/1471-2180-10-217>.
63. Zuanazzi, P. T.; Bartels, M. Estimativas para a população flutuante do Litoral Norte do RS. Porto Alegre: FEE, 2016. <http://www.fee.rs.gov.br/wp-content/uploads/2016/07/20160711relatorio-populacao-flutuante-do-litoral-norte.pdf/> (accessed 26 October 2017).

5.2. Artigo 2

Deteção de genes de bomba de efluxo e de integrons de classe I em bactérias de uma laguna costeira sob diferentes tipos de pressão antrópica

Belize Leite, Laura Souza, Stefani Corrêa, Débora Ribeiro, Gertrudes Corção

Resumo

Efluentes oriundos de atividades antrópicas transportam poluentes, microrganismos e determinantes de resistência a antimicrobianos capazes de impactar e desestabilizar as comunidades microbianas de ecossistemas aquáticos. Zonas de praia estão vulneráveis a diversos tipos de distúrbios ambientais, especialmente na temporada em que ocorre um aumento populacional nestes locais. Este estudo teve como objetivo detectar genes de bomba de efluxo e de integrons de classe I em ambas as frações cultivável e não cultivável do microbioma de amostras de uma laguna costeira sob diferentes tipos de pressão antrópica e observar se a variação populacional sazonal existente interfere na disseminação destes genes. As espécies isoladas foram: *Alcaligenes faecalis*, *Bacillus* sp., *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. pumilus*, *Escherichia coli*, *Enterobacter asburiae*, *Ent. kobei*, *Ent. cloacae* e *Pseudomonas aeruginosa*. Nas bactérias não cultiváveis foi possível identificar os genes *tetB*; *acrA*, *acrB* e *tolC*; *adeS*; *mexB* e *mexF*; e genes correspondentes a integrons de classe I. Nas bactérias cultiváveis foram encontrados todos os genes pesquisados, exceto os genes *ade*. Genes *tet* foram encontrados em todos os pontos e espécies avaliadas. Integrons de classe I foram encontrados em toda a área da Laguna, porém concentraram-se nos pontos urbanizados. As espécies *P. aeruginosa* e *E. coli* destacaram-se quanto à presença dos genes *tet* e de integrons de classe I. Tanto a urbanização quanto as atividades agrícolas desenvolvidas na região influenciaram na distribuição dos genes avaliados, o que não foi observado para a sazonalidade. Estudos como estes podem ser úteis ao entendimento de como as atividades humanas interferem na ocorrência e disseminação de genes de resistência em ambientes aquáticos impactados.

Introdução

A resistência a antimicrobianos representa um grave problema de saúde pública em escala global, estimando-se cerca de 700.000 pessoas morrem anualmente em decorrência de infecções causadas por bactérias resistentes (O'Neill, 2014). Este problema é comumente pesquisado no ambiente clínico, porém se reconhece que ambientes naturais atuam tanto como reservatórios quanto como veículos de dispersão de determinantes de resistência e bactérias resistentes (Zhang et al., 2009). Entretanto, uma vez que a maior parte dos antimicrobianos consumidos não é metabolizada e nem removida durante o processo de tratamento de efluentes, estes fármacos podem atingir corpos d'água e impactar as comunidades microbianas mesmo em baixas concentrações (Gullberg et al., 2011).

A seleção do fenótipo resistente é favorecida pela presença de poluentes como metais e por alterações nas características físico-químicas decorrentes do impacto sobre estes ambientes (Yang et al. 2017). Humanos podem se infectar com bactérias resistentes veiculadas pela água através do contato direto ou da cadeia alimentar, o que aumenta os riscos de sua microbiota normal adquirir distintos determinantes de resistência a antimicrobianos (Rolain, 2013).

Apesar de antimicrobianos e determinantes de resistência serem ubíquos na natureza, considera-se que as atividades antrópicas são as maiores facilitadoras da evolução da resistência a antimicrobianos (Tan et al., 2017). Aproximadamente 39% da população global vive em áreas costeiras (Kummu et al., 2016). A crescente pressão demográfica sobre estas áreas impacta diretamente os ecossistemas aquáticos associados, mas poucos têm sido os estudos voltados a investigar a influência das atividades antrópicas na veiculação de determinantes de resistência nestes locais (Nardelli et al., 2012; Yang et al. 2017). Alguns estudos têm demonstrado que genes de resistência às tetraciclínas (*tet*) e integrons de classe 1 são mais abundantes e diversos em ambientes aquáticos impactados (Harnisz et al., 2015; Nardelli et al., 2012), sugerindo-se sua utilização como marcadores de resistência e indicadores de estresse ambiental (Harnisz et al., 2015; Gillings, 2017).

Os genes *tetA* e *tetB* estão envolvidos com o efluxo de tetraciclina e são os mais bem estudados em bactérias Gram-negativas de ambientes aquáticos (Wang et al., 2013; Stange et al., 2016; Jiang et al., 2017). O efluxo ativo desta e de outras drogas tem um importante papel tanto na resistência intrínseca quanto

adquirida, podendo ocorrer junto a outros mecanismos de resistência, o que aumenta significativamente os níveis e perfis de resistência (Piddock et al., 2006). Baseando-se na fonte de energia utilizada, na especificidade do substrato e nas relações filogenéticas, os sistemas de efluxo classificam-se em cinco famílias: ABC (“ATP binding cassette”), MFS (“major facilitator superfamily”), SMR (“small multidrug resistance”), MATE (“multidrug and toxic compound extrusion”) e RND (“resistance-nodulation-division”) (Piddock et al., 2006). Os sistemas Mex (“multidrug efflux pump”) de *Pseudomonas*, acrAB-TolC de Enterobacteriaceae e Ade de *Acinetobacter* pertencem à família RND e são os mais bem estudados no contexto clínico. Contudo, os estudos que avaliem estes determinantes de resistência em ambientes naturais são inexistentes ou mesmo raros (Braz et al., 2016).

Integrans são plataformas genéticas capazes de capturar, incorporar utilizar e transportar cassetes de genes exógenos que codificam uma ampla gama de funções adaptativas, incluindo a resistência a antimicrobianos (Cambray et al., 2010). Apresentam dois segmentos conservados (5'-CS e 3'-CS) separados por um segmento variável no qual já foram reportados mais de 130 diferentes cassetes gênicos associados à resistência (Koczura et al., 2016). Como geralmente se localizam em elementos genéticos móveis, os integrans facilitam a transferência horizontal de determinantes de resistência e têm potencial para dispersá-los em toda a extensão de uma dada comunidade bacteriana (Cambray, 2010). Apesar da importância para a evolução da resistência no contexto clínico, integrans também estão amplamente disseminados em ambientes aquáticos (Zhang et al., 2009).

O presente estudo teve como objetivo pesquisar a presença dos genes associados aos segmentos conservados de integrans de classe I (5'-3' CS) e de *tetA*, *tetB*, *mexB*, *mexD*, *mexY*, *mexF*, *acrA*, *acrB*, *tolC*, *adeA*, *adeB*, *adeR* e *adeS* tanto em bactérias cultiváveis de grupos taxonômicos representativos quanto na fração não cultivável do microbioma de pontos de uma laguna costeira sob diferentes tipos de impacto antrópico. Visto que na área de estudo a população cresce até cinco vezes mais durante a alta temporada, buscou-se também investigar se a frequência destes genes é de algum modo influenciada por esta variação sazonal. Para este fim, estes genes foram detectados por PCR convencional a partir de DNA total de amostras de água e de bactérias de diferentes grupos (*Alcaligenes faecalis*, *Bacillus* sp., *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. pumilus*, *Escherichia coli*, *Enterobacter asburiae*, *Ent. kobei*, *Ent. cloacae* e *Pseudomonas aeruginosa*).

Material e métodos

Área de estudo

Conforme descrito no **subitem 4.1** do Material e métodos (corpo da Tese).

Coleta das amostras

Conforme descrito no **subitem 4.2** do Material e métodos (corpo da Tese).

Isolamento e identificação de bactérias

Conforme descrito no **subitem 4.5** do Material e métodos (corpo da Tese).

Análise da presença de genes de resistência a antimicrobianos

Tanto o DNA das amostras de água quanto dos isolados foi obtido e analisado conforme descrito no **subitem 4.6** do Material e métodos (corpo da Tese). Avaliou-se a presença dos genes *tetA*, *tetB*, 5'CS/3'CS (genes de segmentos conservados de integrons de classe I), *acrA*, *acrB*, *tolC*, *adeB*, *adeR*, *adeS*, *mexB*, *mexD*, *mexF* e *mexY*.

Resultados

A análise da comunidade microbiana total permitiu detectar no DNA total das amostras de água da Laguna a presença de 8 dos 13 genes pesquisados: *tetB*, *acrA*, *acrB*, *toIC*, *adeS*, *mexB*, *mexF* e o fragmento 5'CS/3'CS (**Tabela 2.1**). A incidência destes genes foi maior na alta temporada, exceto no Ponto 2. Na baixa temporada, estes genes concentraram-se nas populações de bactérias dos pontos mais urbanizados (1 e 2), enquanto na alta temporada os mesmos distribuíram-se independentemente do grau de urbanização (**Tabela 2.1**).

Tabela 2.1. Presença dos genes de bomba de efluxo e integrons de classe I (5'-3' CS) no DNA total de amostras de água superficial da Laguna Tramandaí.

Genes	Baixa temporada				Alta temporada			
	Pontos				Pontos			
	1	2	3	4	1	2	3	4
<i>tetB</i>	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>acrA</i>	+	+	-	-	+	-	+	+
<i>acrB</i>	+	+	-	+	-	-	+	+
<i>toIC</i>	+	-	-	+	+	-	+	-
<i>adeS</i>	-	+	-	-	-	+	-	+
<i>mexB</i>	+	+	-	-	+	+	+	+
<i>mexF</i>	+	+	-	-	+	+	-	+
5'CS/3'CS	+	-	+	-	+	+	+	+

Através das técnicas tradicionais de cultivo, obtiveram-se 392 isolados de bactérias, cujos dados de representatividade e distribuição das espécies estão dispostos na **Tabela 2.2**. A quantidade de isolados não variou significativamente entre os diferentes pontos e temporadas ou entre as espécies isoladas. Apenas o grupo de *Bacillus* sp., com 25 isolados, não foi identificado em nível de espécie (score entre 1.7 e 1.9). Ambas as temporadas apresentaram 8 espécies cada uma (do total de 9 espécies encontradas) (**Tabela 2.2**). *B. pumilus* foi detectado apenas na baixa temporada, enquanto *B. subtilis* somente na alta temporada (**Tabela 2.2**).

Tabela 2.2. Espécies e quantidade de isolados nos pontos e temporadas analisadas.

	Baixa temporada					Alta temporada				
	Pontos				Total	Pontos				Total
	1	2	3	4		1	2	3	4	
<i>A. faecalis</i> (24)	2	2	3	3	10	2	4	4	4	14
<i>P. aeruginosa</i> (114)	13	17	8	7	45	20	17	17	15	69
<i>E. coli</i> (95)	5	18	13	9	45	22	16	2	10	50
<i>E. kobei</i> (11)	0	2	7	0	9	1	0	1	0	2
<i>E. asburiae</i> (10)	0	2	3	3	8	1	0	1	0	2
<i>E. cloacae</i> (7)	1	0	0	2	3	0	1	3	0	4
<i>Bacillus</i> sp. (25)	3	3	4	8	18	3	1	0	3	7
<i>B. cereus</i> (92)	13	13	11	9	46	13	7	14	12	46
<i>B. subtilis</i> (13)	0	0	0	0	0	0	8	2	3	13
<i>B. pumilus</i> (1)	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
Total (392)	37	57	50	41	185	62	54	44	47	207

A avaliação da distribuição dos genes na fração cultivável da comunidade microbiana foi mais robusta que na fração não cultivável, uma vez que foi detectado um maior número de genes nos isolados (10): *tetA*, *tetB*, *mexB*, *mexD*, *mexF*, *mexY*, *acrA*, *acrB*, *toIC* e 5'-3' CS. Estes genes foram observados em isolados de ambas as temporadas e ponto de coleta. Uma vez que não se obtiveram isolados de *Acinetobacter* (**Tabela 2.2**), os genes *ade* não foram pesquisados. A presença dos genes *tetA* e/ou *tetB* foi verificada em 48.50% dos isolados obtidos, sendo mais frequentes em *E. coli*, *P. aeruginosa* e *Bacillus* spp. (**Tabela 2.3**). A detecção do gene *tetB* foi prevalente em relação à *tetA* (**Figura 2.1**). A maior parte dos isolados apresentou ambos os genes *tetA* e *tetB* (23.47%), enquanto isoladamente *tetA* ocorreu em 9.43% e *tetB* em 20.66% dos isolados (**Figura 2.1**). Os segmentos de integrons de classe I foram detectados em 37.75% dos isolados. A distribuição destes elementos variou significativamente entre as espécies ($p= 0,0046$) (*dados não mostrados*), que foram prevalentes em *P. aeruginosa* e raros em *Bacillus* spp. (**Tabela 2.3**).

Tabela 2.3. Espécies isoladas (número de isolados de cada espécie), número de isolados carreadores de genes *tet* e segmentos conservados de integrons de classe I (5'CS/3'CS) e respectiva frequência destes genes sobre o número total de isolados da espécie (F).

Espécie (número de isolados)	Isolados <i>tet</i> +			Isolados 5'CS/3'CS +		
	Temporada		F (%)	Temporada		F (%)
	Baixa	Alta		Baixa	Alta	
<i>A. faecalis</i> (24)	6	5	45.83	8	7	62.50
<i>P. aeruginosa</i> (114)	23	38	50.00	31	43	64.91
<i>E. coli</i> (95)	33	40	76.84	25	24	49.00
<i>Enterobacter</i> spp. (28)	3	0	10.71	6	3	32.14
<i>Bacillus</i> spp. (131)	35	27	47.33	0	1	0.8
Total (392)	80	110	48.50	70	78	37.75

A frequência dos genes avaliados foi similar entre as temporadas, sendo ligeiramente maior nos isolados da baixa temporada (**Tabela 2.4**). Com relação à distribuição espacial na Laguna, no geral estes genes foram mais frequentes em isolados oriundos dos pontos urbanizados da (1 e 2) (**Tabela 2.4**).

Tabela 2.4. Frequência* de detecção dos genes com relação ao número de isolados de diferentes pontos da Laguna e temporadas avaliadas (valores expressos em porcentagem).

Genes	Baixa temporada					Alta temporada				
	Pontos					Pontos				
	1 (37)	2 (57)	3 (50)	4 (41)	Total (185)	1 (62)	2 (54)	3 (44)	4 (47)	Total (207)
<i>tet</i>	59.4	54.3	50	53.6	54.0	54.8	53.7	36.3	65.9	53.1
5'CS/3'CS	40.5	45.6	40	21.9	37.8	61.3	25.9	25	29.8	37.7
<i>mex</i>	53.8	70.6	75.0	57.1	64.4	80.0	88.2	70.6	66.6	62.3
acrAB-ToIC	100	95.4	86.9	71.4	90.8	95.8	100	57.14	100	93.1

* O cálculo da frequência dos genes *tet* e de integrons de classe I (5'CS/3'CS) baseou-se na quantidade total de isolados. Os genes *mex* foram pesquisados em *P. aeruginosa* e os genes do sistema AcrAB-ToIC foram pesquisados em isolados de *Enterobacteriaceae* (*E. coli* e *Enterobacter* spp.), portanto a frequência destes genes baseou-se no número de isolados destas espécies.

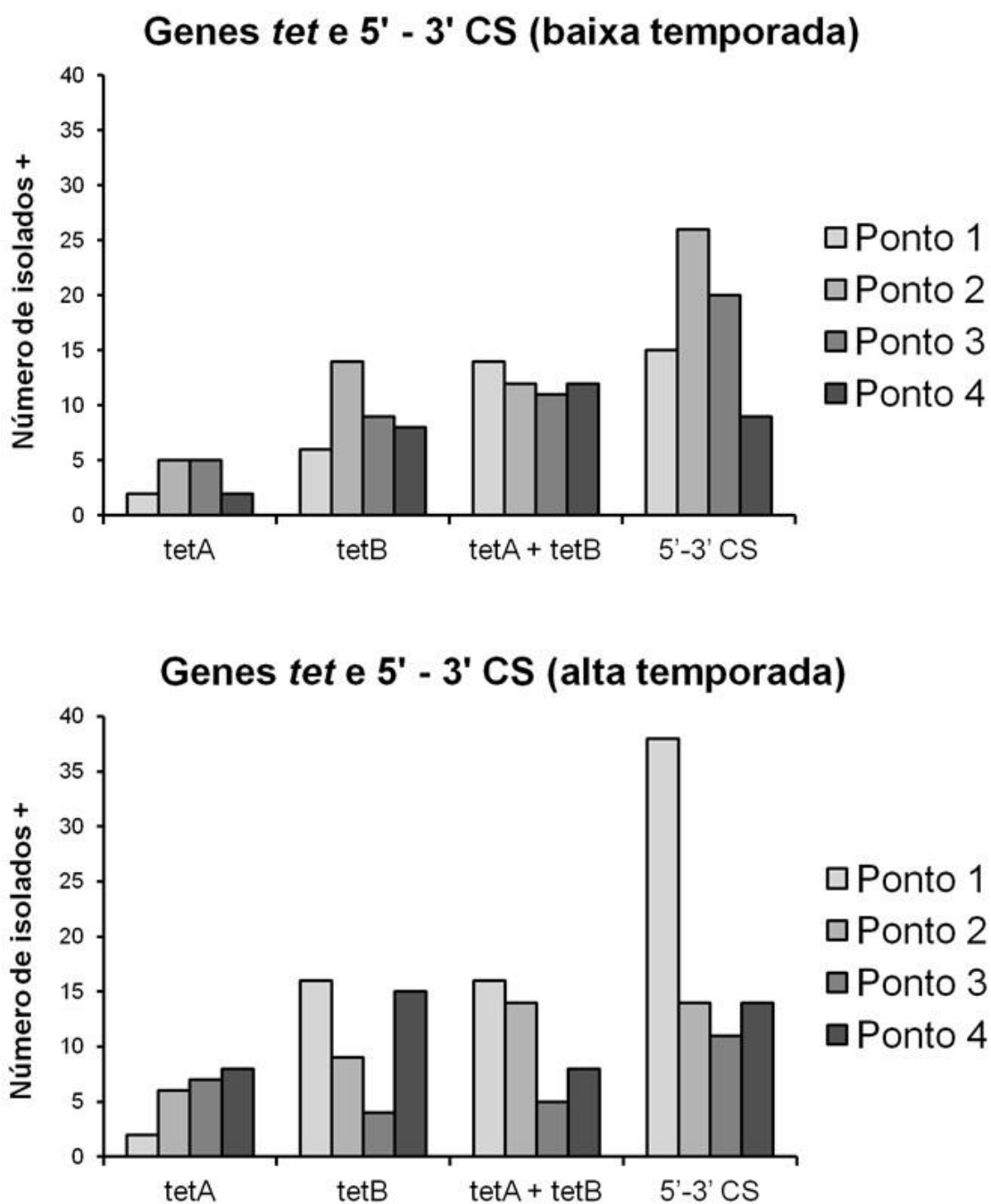


Figura 2.1. Presença dos genes *tetA*, *tetB* e segmentos conservados de integrons de classe I (5'CS/3'CS) nos diferentes pontos da Laguna.

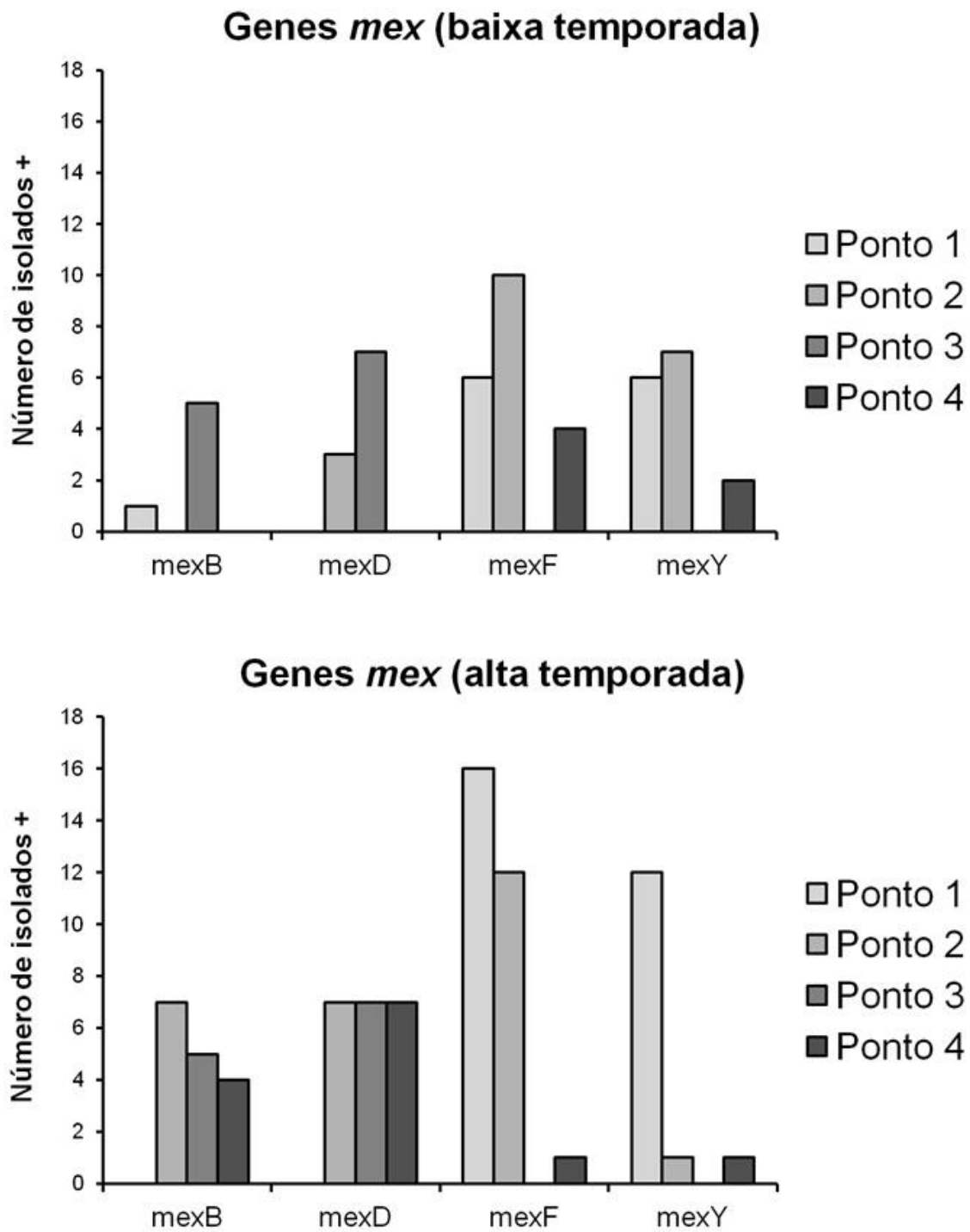


Figura 2.2. Presença dos genes *mexB*, *mexD*, *mexF* e *mexY* nos diferentes pontos da Laguna.

Na baixa temporada, o Ponto 2 agrupou a maior parte dos isolados carreando o gene *tetB* e genes dos segmentos de integrons; enquanto na alta temporada isso ocorreu no Ponto 1 (**Figura 2.1**). Isolados oriundos dos pontos não urbanizados destacaram-se quanto à frequência dos genes *mex* (no Ponto 3, na baixa temporada) e dos genes *tet* e do sistema *acrAB-TolC* (no Ponto 4, na alta temporada (**Tabela 2.4**). Na baixa temporada, os genes *mexB* e *mexD* foram prevalentes no Ponto 3, enquanto os genes *mexF* e *mexY* o foram nos pontos urbanizados (1 e 2). Na alta temporada, os genes *mexB* e *mexD* estiveram ausentes no Ponto 1, enquanto os genes *mexF* e *mexY* foram prevalentes nestes pontos (**Figura 2.2**).

Observou-se grande variabilidade na quantidade e tamanho dos fragmentos de integrons de classe I: estes apresentaram de 1 a 10 fragmentos, com tamanho de 200 a 3000 pb (*dados não mostrados*). A maior variabilidade destes fragmentos (mais de 5 fragmentos com tamanhos diferentes) foi observada em isolados oriundos da alta temporada e de pontos urbanizados (1 e 2). Isso indica que o ambiente esteja favorecendo a diversificação de integrons nesta temporada e nestes pontos.

Discussão

Sabe-se que cerca de 10% dos microrganismos ambientais pode ser isolada através de técnicas tradicionais de cultivo (Hugenholtz, 2002). Deste modo, utilizar abordagens independentes de cultivo é um pressuposto para obter dados mais fidedignos à cena ambiental. No entanto, os resultados oriundos da análise de genes nas amostras de água da Laguna Tramandaí (**Tabela 2.1**) revelaram menor representatividade e variedade de genes de bombas de efluxo e de integrons de classe I em comparação às bactérias isoladas. Uma vez que ambientes aquáticos exibem uma carga diluída de nutrientes e microrganismos, é plausível que isto também ocorra para o *pool* de genes desse meio. Além disso, amostras ambientais podem conter compostos que inibem a reação de amplificação (Volkman et al., 2007), o que pode interferir na análise direta de amostras de DNA total.

E. coli e *P. aeruginosa* são espécies cuja resistência é melhor descrita em cursos d'água (Nardelli et al., 2012; Zanetti et al., 2013; Kotlarska et al., 2015; Chen et al., 2017; Canal et al., 2016). A resistência de *Enterobacter* é reportada em ecossistemas costeiros, porém os genes *tet* não têm sido pesquisados em espécies do gênero (Zhang et al., 2009). *A. faecalis* é bastante relatada no meio aquático, principalmente pelo potencial de produzir enzimas de interesse e degradar poluentes, porém genes *tet* e integrons raramente têm sido pesquisados nesta espécie (Zhang et al., 2009; Adesoji et al., 2015). *Bacillus* é frequentemente isolado no ambiente marinho e aparenta ser dominante entre Gram-positivos neste meio (Bright Singh et al., 2013), mas de um modo geral pouco se tem pesquisado sobre sua resistência (Glenwright et al., 2017).

Os genes *tetA* e *tetB* são comumente analisados em amostras de água de vários países (Yang et al., 2017; Jiang et al., 2017; Tan et al., 2017). No presente estudo estes genes foram frequentes em 48.50% dos isolados (**Tabela 2.3**). Em *Enterobacteriaceae*, estes genes vêm sendo reportados com frequência entre 4 a 72% (Stange et al., 2016; Wang et al., 2013). A dominância destes genes no ambiente aquático varia de acordo com atributos inerentes à comunidade microbiana bem como conforme a região geográfica analisada. Nossos dados indicam que bactérias Gram-positivas tais como *Bacillus*, pouco pesquisadas em ambientes naturais, podem ser importantes vetores destes genes no meio aquático (**Tabela 2.3**) e necessitam de maiores estudos. No Brasil os genes *tet* não vêm sendo

pesquisados em ambientes aquáticos.

Poluentes como metais pesados e solventes podem atuar como substrato de alguns sistemas de efluxo (Piddock et al., 2006). Metais, por exemplo, atuam como cofatores enzimáticos e devem ser mantidos em concentrações compatíveis ao bom funcionamento das células. Mesmo concentrações subinibitórias de antimicrobianos podem causar a superexpressão de bombas de efluxo, o que contribui para a disseminação de linhagens multirresistentes em ambientes degradados (Breidenstein et al., 2011). Enquanto na baixa temporada os genes *mex* ocorreram com frequência similar em pontos com e sem urbanização, respectivamente Pontos 2 e 3, na alta temporada estes genes concentraram-se principalmente em pontos urbanizados (1 e 2) (**Figura 2.2**). As atividades oriundas da urbanização possivelmente geram poluentes que favorecem a manutenção destes genes nestes locais.

Sistemas dependentes da expressão de *mexB* e *mexF* relacionaram-se com a redução da suscetibilidade a fluoroquinolonas e carbapenêmicos em isolados de origem clínica (Neves et al., 2011). A relação dos genes *mex* com a o fenótipo resistente de linhagens ambientais só vêm recentemente sendo avaliada. No Brasil, a superexpressão dos sistemas MexXY e MexAB foi observada em isolados de aves migratórias (Martins et al. 2018) e de solos de diferentes regiões, nos quais influenciaram no aumento da resistência à aztreonam (Braz et al., 2016). O sistema AcrAB-TolC é constitutivamente expresso em isolados de *Enterobacteriaceae*, porém a superexpressão de genes deste sistema também tem sido associada à resistência a carbapenêmicos e fluoroquinolonas em isolados clínicos (Singh et al., 2012). No presente estudo, estes genes estiveram presentes em 98% e 71.43% dos isolados de *E. coli* e *Enterobacter spp.*, respectivamente (*dados não mostrados*). No ecossistema aquático, tanto os genes *mex* quanto do sistema AcrAB-TolC podem estar associados a fenótipos resistentes diferentes dos já descritos para outros ambientes e necessitam maiores estudos.

Sabe-se que integrons de classe I beneficiam a célula quanto à habilidade de adquirir cassetes gênicos que conferem vantagens adaptativas para a sobrevivência em ambientes hostis (Cambray et al., 2010). A abundância de genes associados a estes elementos pode mudar rapidamente em resposta a mudanças ambientais. Integrons de classe I ampliaram largamente sua distribuição ao longo dos últimos 100 anos, assemelhando-se a espécies invasoras que prosperam sobre

o impacto de atividades humanas (Gillings, 2017). Graças a essa característica, diversos estudos indicam que integrons de classe I são bons marcadores para monitorar os efeitos da poluição ambiental, principalmente aquela oriunda de atividades antropogênicas (Nardelli et al., 2012; Gillings, 2017; Yang et al., 2017).

A frequência de integrons de classe I em isolados de bactérias Gram-negativas de origem hospitalar é de 41.5% no Brasil (Fonseca et al., 2005), 43% na Europa (Martinez-Freijo et al., 1998) e até 85% na China (Chang et al., 2000). A frequência em isolados de *E. coli* proveniente de ambientes aquáticos tem variado entre 10% a 41% dos isolados pesquisados (Kotlarska et al., 2015; Stange et al. 2016). No Brasil, estes elementos têm sido reportados em diferentes tipos de ambientes aquáticos, apresentando frequência de 3.22% em isolados de *P. aeruginosa* (Zanetti et al., 2011) e de 55% em amostras de DNA total de lodo ativado (Paiva et al., 2015). No presente estudo, integrons de classe I ocorreram em 37.75% dos isolados (**Tabela 2.3**). Foram mais bem representados em *P. aeruginosa*, com frequência de 64.91% dos isolados, enquanto em *E. coli* a frequência foi de 49.00% (**Tabela 2.3**). *A. faecalis* também demonstrou ser importante para veicular estes elementos nas águas da Laguna, espécie em que ocorreram em 62.50% dos isolados (**Tabela 2.3**). O gene *int1* foi detectado em 14.05% de isolados de *E. coli* oriundos da Lagoa dos Patos, sistema próximo ao avaliado no presente estudo (Canal et al., 2016).

Portanto, a frequência de detecção de integrons de classe I nos isolados da Laguna foi maior do que na maioria dos estudos previamente descritos, sendo inclusive comparável aos dados referentes a ambientes clínicos (Fonseca et al., 2005). A proporção destes elementos em ambientes não clínicos pode variar em função da distância de fontes poluidoras ricas em integrons tais como, por exemplo, plantas de tratamento de efluentes; da habilidade destes elementos associarem-se a transposons; da composição da comunidade microbiana local; e da intensidade das pressões seletivas que favorecem os genes presentes nos integrons (Gillings, 2017). Embora isolados dos pontos não urbanizados (3 e 4) também tenham demonstrado veicular estes elementos, em ambas as temporadas os segmentos de integrons de classe I concentraram-se em isolados oriundos dos pontos urbanizados da Laguna (1 e 2) (**Figura 2.1**). A presença de integrons de classe I esteve associada a marcadores de origem antrópica inclusive em amostras ambientais do Ártico (Tan et al., 2017).

Os genes *tet* raramente fazem parte de integrons, sendo mais comuns em plasmídeos e transposons (Suzuki et al., 2013). Contudo, ambos os genes são reconhecidos como bons indicadores de distúrbios de origem antrópica e seleção positiva da resistência a antimicrobianos no ambiente (Harnisz et al., 2015; Gillings, 2017). Os genes *tetA* e/ou *tetB* e de integrons de classe I ocorreram simultaneamente em isolados das espécies *A. faecalis*, *P. aeruginosa* e *E. coli*, com frequência de 36.05% (*dados não mostrados*). A associação entre estes genes também foi mais comum na alta temporada e nos pontos urbanizados da Laguna (*dados não mostrados*), período e pontos da Laguna mais expostos ao efeito das atividades humanas desenvolvidas nestas áreas.

Conclusão

Os dados do presente estudo sugerem que o impacto das atividades humanas nos pontos urbanizados tem papel significativo na acumulação e proliferação de genes associados aos segmentos conservados de integrons de classe I (5'-3' CS) e de *tetA* e *tetB*, *mex* e sistema *acrAB-TolC* nas águas da Laguna. Contudo, uma vez que esta integra um sistema estuarino, caracterizado pela alta dinamicidade, sugere-se que a área seja monitorada para um maior número de genes e por um maior período de tempo. Estudos como estes podem servir para entender de que modo atividades como a intensificação do turismo, o uso recreativo do ambiente e a modificação da paisagem para cultivo ou urbanização interferem na contaminação de recursos naturais por determinantes de resistência a antimicrobianos. Informações deste tipo são cruciais para definir reservatórios naturais de resistência, bem como sua dinâmica de captação e veiculação destes elementos.

Referências

1. Baroni-Urbani, C. 1980. A statistical table for the degree of coexistence between two species. *Oecologia* 44:287-289.
2. Beheshti, M., Talebi, M., Ardebili, A., Bahador, A., & Lari, A. R. (2014). Detection of AdeABC efflux pump genes in tetracycline-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from burn and ventilator-associated pneumonia patients. *Journal of pharmacy & bioallied sciences*, 6(4), 229.
3. Braz, V. S., Furlan, J. P. R., Fernandes, A. F. T., & Stehling, E. G. (2016). Mutations in NalC induce MexAB-OprM overexpression resulting in high level of aztreonam resistance in environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS microbiology letters*, 363(16).
4. Breidenstein, E. B., de la Fuente-Núñez, C., & Hancock, R. E. (2011). *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. *Trends in microbiology*, 19(8), 419-426.
5. Calliari, L. J., Winterwerp, J. C., Fernandes, E., Cuchiara, D., Vinzon, S. B., Sperle, M., & Holland, K. T. (2009). Fine grain sediment transport and deposition in the Patos Lagoon–Cassino beach sedimentary system. *Continental Shelf Research*, 29(3), 515-529.
6. Cambray, G., Guerout, A. M., & Mazel, D. (2010). Integrons. *Annual review of genetics*, 44, 141-166.
7. Canal, N., Meneghetti, K. L., Almeida, C. P. D., Bastos, M. D. R., Otton, L. M., & Corção, G. (2016). Characterization of the variable region in the class 1 integron of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* isolated from surface water. *Brazilian journal of microbiology*, 47(2), 337-344.
8. Chang, C. Y., Chang, L. L., Chang, Y. H., Lee, T. M., & Chang, S. F. (2000). Characterisation of drug resistance gene cassettes associated with class 1 integrons in clinical isolates of *Escherichia coli* from Taiwan, ROC. *Journal of medical microbiology*, 49(12), 1097-1102.
9. Chen, Z., Yu, D., He, S., Ye, H., Zhang, L., Wen, Y., ... & Chen, S. (2017). Prevalence of Antibiotic-Resistant *Escherichia coli* in Drinking Water Sources in Hangzhou City. *Frontiers in microbiology*, 8, 1133.

10. Fonseca, É. L., Vieira, V. V., Cipriano, R., & Vicente, A. C. (2005). Class 1 integrons in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from clinical settings in Amazon region, Brazil. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, *44*(3), 303-309.
11. Gillings, M. R. (2017). Class 1 integrons as invasive species. *Current opinion in microbiology*, *38*, 10-15.
12. Glenwright, H., Pohl, S., Navarro, F., Miro, E., Jiménez, G., Blanch, A. R., & Harwood, C. R. (2017). The Identification of Intrinsic Chloramphenicol and Tetracycline Resistance Genes in Members of the *Bacillus cereus* Group (sensu lato). *Frontiers in microbiology*, *7*, 2122.
13. Grazziotin, A. L., Vidal, N. M., Palmeiro, J. K., Dalla-Costa, L. M., & Venancio, T. M. (2016). Genome Sequencing of Four Multidrug-Resistant *Enterobacter aerogenes* Isolates from Hospitalized Patients in Brazil. *Frontiers in microbiology*, *7*, 1649.
14. Gullberg, E., Cao, S., Berg, O. G., Ilbäck, C., Sandegren, L., Hughes, D., & Andersson, D. I. (2011). Selection of resistant bacteria at very low antibiotic concentrations. *PLoS pathogens*, *7*(7), e1002158.
15. Harnisz, M., Korzeniewska, E., Ciesielski, S., & Golaś, I. (2015). tet genes as indicators of changes in the water environment: Relationships between culture-dependent and culture-independent approaches. *Science of the Total Environment*, *505*, 704-711.
16. Hugenholtz, P. (2002). Exploring prokaryotic diversity in the genomic era. *Genome biology*, *3*(2), reviews0003-1.
17. Jiang, H., Zhou, R., Yang, Y., Chen, B., Cheng, Z., Zhang, M., ... & Zou, S. (2017). Characterizing the antibiotic resistance genes in a river catchment: Influence of anthropogenic activities. *Journal of Environmental Sciences*.
18. Koczura, R., Mokracka, J., Taraszewska, A., & Łopacinska, N. (2016). Abundance of class 1 integron-integrase and sulfonamide resistance genes in river water and sediment is affected by anthropogenic pressure and environmental factors. *Microbial ecology*, *72*(4), 909-916.
19. Kummu, M., De Moel, H., Salvucci, G., Viviroli, D., Ward, P. J., & Varis, O. (2016). Over the hills and further away from coast: global geospatial patterns of human and environment over the 20th–21st centuries. *Environmental Research Letters*, *11*(3), 034010.

20. Levesque, C., Piche, L., Larose, C., & Roy, P. H. (1995). PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 39(1), 185-191.
21. Loitzenbauer, E., & Mendes, C. A. B. (2012). Salinity dynamics as a tool for water resources management in coastal zones: An application in the Tramandaí River basin, southern Brazil. *Ocean & coastal management*, 55, 52-62.
22. Martinez-Freijo, P., Fluit, A. C., Schmitz, F. J., Grek, V. S., Verhoef, J. & Jones, M. E. (1998). Class I integrons in Gram-negative isolates from different European hospitals and association with decreased susceptibility to multiple antibiotic compounds. *J Antimicrob Chemother*, 42(6): 689-696.
23. Nardelli, M., Scalzo, P. M., Ramírez, M. S., Quiroga, M. P., Cassini, M. H., & Centrón, D. (2012). Class 1 integrons in environments with different degrees of urbanization. *PloS one*, 7(6), e39223.
24. Ng, L. K., Martin, I., Alfa, M., & Mulvey, M. (2001). Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes. *Molecular and cellular probes*, 15(4), 209-215.
25. Oh, H., Stenhoff, J., Jalal, S., & Wretling, B. (2003). Role of efflux pumps and mutations in genes for topoisomerases II and IV in fluoroquinolone-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Microbial Drug Resistance*, 9(4), 323-328.
26. O'Neill, Jim. "Review on antimicrobial resistance." *Antimicrobial resistance: tackling a crisis for the health and wealth of nations* (2014).
27. Paiva, M. C., Ávila, M. P., Reis, M. P., Costa, P. S., Nardi, R. M., & Nascimento, A. M. (2015). The microbiota and abundance of the class 1 integron-integrase gene in tropical sewage treatment plant influent and activated sludge. *PloS one*, 10(6), e0131532.
28. Piddock, L. J. (2006). Multidrug-resistance efflux pumps? not just for resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 4(8), 629.
29. Rolain, J. M. (2013). Food and human gut as reservoirs of transferable antibiotic resistance encoding genes. *Frontiers in microbiology*, 4, 173.
30. Simpson, E. H. 1949. Measurement of diversity. *Nature* 163:688.
31. Stange, C., Sidhu, J. P. S., Tiehm, A., & Toze, S. (2016). Antibiotic resistance and virulence genes in coliform water isolates. *International journal of hygiene and environmental health*, 219(8), 823-831.

32. Suzuki, Y., Kajii, S., Nishiyama, M., & Iguchi, A. (2013). Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* isolates collected from river water in Japan to antipseudomonal agents. *Science of the total environment*, *450*, 148-154.
33. Swick, M. C., Morgan-Linnell, S. K., Carlson, K. M., & Zechiedrich, L. (2011). Expression of multidrug efflux pump genes *acrAB-tolC*, *mdfA*, and *norE* in *Escherichia coli* clinical isolates as a function of fluoroquinolone and multidrug resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *55*(2), 921-924.
34. Tabajara, L.L. & Dillenburg, S. R., 1997. Batimetria e Sedimentos de Fundo da Laguna de Tramandaí - RS. *Notas Técnicas*, *10*: 21-33.
35. Tan, L., Li, L., Ashbolt, N., Wang, X., Cui, Y., Zhu, X., ... & Luo, Y. (2017). Arctic antibiotic resistance gene contamination, a result of anthropogenic activities and natural origin. *Science of The Total Environment*.
36. Volkmann, H., Schwartz, T., Kirchen, S., Stofer, C., & Obst, U. (2007). Evaluation of inhibition and cross-reaction effects on real-time PCR applied to the total DNA of wastewater samples for the quantification of bacterial antibiotic resistance genes and taxon-specific targets. *Molecular and cellular probes*, *21*(2), 125-133.
37. Xavier, D. E., Picão, R. C., Girardello, R., Fehlberg, L. C., & Gales, A. C. (2010). Efflux pumps expression and its association with porin down-regulation and β -lactamase production among *Pseudomonas aeruginosa* causing bloodstream infections in Brazil. *BMC microbiology*, *10*(1), 217.
38. Zanetti, M. O., Martins, V. V., Pitondo-Silva, A., & Stehling, E. G. (2013). Antimicrobial resistance, plasmids and class 1 and 2 integrons occurring in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Brazilian aquatic environments. *Water Science and Technology*, *67*(5), 1144-1149.
39. Zhang, X. X., Zhang, T., & Fang, H. H. (2009). Antibiotic resistance genes in water environment. *Applied microbiology and biotechnology*, *82*(3), 397-414.
40. Zuanazzi, P. T.; Bartels, M. Estimativas para a população flutuante do Litoral Norte do RS. Porto Alegre: FEE, 2016. Available on: <www.fee.rs.gov.br/wp-content/uploads/2016/07/20160711relatorio-populacao-flutuante-do-litoral-norte.pdf>. Access date: October 26, 2017.
41. Wang, C., Gu, X., Zhang, S., Wang, P., Guo, C., Gu, J., & Hou, J. (2013). Characterization of antibiotic-resistance genes in antibiotic resistance *Escherichia coli* isolates from a lake. *Archives of environmental contamination and toxicology*, *65*(4), 635-641.

42. Yang, Y., Xu, C., Cao, X., Lin, H., & Wang, J. (2017). Antibiotic resistance genes in surface water of eutrophic urban lakes are related to heavy metals, antibiotics, lake morphology and anthropic impact. *Ecotoxicology*, 26(6), 831-840.
43. Yoneda K, Chikumi H, Murata T, Gotoh N, Yamamoto H, Fujiwara H, Nishino T, Shimizu E: Measurement of *Pseudomonas aeruginosa* multidrug efflux pumps by quantitative real-time polymerase chain reaction. *FEMS Microbiol Lett.* 2005, 243: 125-131. 10.1016/j.femsle.2004.11.048.

5.3. Artigo 3

Pesquisa dos genes *bla*, *mecA* e *mcr-1* em bactérias de uma laguna costeira

Belize Leite, Laura Souza, Lúcio Amorim, Silvia Lentz, Andreza Martins,
Gertrudes Corção

Resumo

Relatos de bactérias resistentes a maior parte dos antimicrobianos são cada vez mais frequentes no meio clínico. Ambientes naturais podem ter papel central na diversificação e disseminação de genes de resistência. O ambiente aquático é continuamente exposto a agentes que selecionam positivamente genes de resistência, porém ainda é pouco claro como estes genes são influenciados pelas atividades humanas que incidem sobre corpos hídricos. O objetivo deste estudo foi detectar a presença dos genes *bla*_{CTX-M} (grupos 1, 2, 8, 25 e 9), *bla*_{GES-like}, *bla*_{SPM-1}, *bla*_{SHV-like}, *bla*_{TEM-like}, *bla*_Z, *mecA* e *mcr-1* em bactérias de uma laguna costeira do sul do Brasil. Analisaram-se amostras de água de pontos da laguna e temporadas sobre diferentes tipos de impacto antrópico. O DNA total das amostras revelou a presença de *bla*_{GES} em ambas as temporadas. *Pseudomonas aeruginosa* foi a espécie em que estes genes foram mais frequentes, seguida por *Escherichia coli* e *Alcaligenes faecalis*. *Bacillus* spp. veicularam *bla*_{GES-like}, *bla*_{SHV-like} e *bla*_{TEM-like}, enquanto *Enterobacter* spp. revelaram apenas o gene *bla*_{TEM-like}. No geral, estes genes foram prevalentes nos pontos mais urbanizados da laguna. A variação populacional sazonal parece ter tido maior influência sobre a distribuição dos grupos de *bla*_{CTX-M}. O monitoramento de bactérias ambientais é importante para o reconhecimento de reservatórios naturais de genes de resistência. Estudos como estes podem ser ferramentas úteis a elaboração de estratégias que visem à prevenção de infecções resistentes.

Introdução

As bactérias resistentes a antimicrobianos tornaram-se um desafio para os gestores em saúde pública. Apesar de impactar diretamente o ambiente clínico, é no compartimento ambiental que o fenótipo resistente é selecionado e veiculado (Berendock et al., 2015; Berglund, 2015). A maior parte dos antimicrobianos consumidos não é metabolizada e nem removida durante o processo de tratamento de efluentes. Estes fármacos podem atingir corpos d'água e impactar as comunidades microbianas mesmo em baixas concentrações (Gullberg et al., 2011).

β -lactâmicos foram os primeiros antimicrobianos descobertos e são os mais prescritos em todo o mundo. Ao longo do tempo, a maior exposição ambiental favoreceu a diversificação dos mecanismos de resistência a estes antimicrobianos (Tação et al., 2012). Uma ampla variedade de β -lactamases tem sido descrita desde 1980, destacando-se aquelas de espectro estendido (ESBLs), capazes de degradar a maior parte dos β -lactâmicos (à exceção das cefamicinas) (Bush e Jacoby, 2010; Davies e Davies, 2010). Entre as principais β -lactamases encontram-se os tipos TEM, SHV, CTX-M e GES, pertencentes à classe A de Ambler (1991). O tipo SPM-1 foi descoberto na cidade de São Paulo em 1997, em *Pseudomonas aeruginosa* (Toleman et al., 2002). Este tipo é considerado endêmico no país e corresponde a maior causa da resistência a carbapenêmicos da América do Sul (Hong et al., 2015).

A meticilina é um β -lactâmico que foi introduzido na prática clínica em 1959, com a finalidade de tratar infecções causadas por *Staphylococcus aureus* resistentes a penicilinas. Em 1961 foi relatado o aparecimento de cepas resistentes, fenótipo relacionado à presença do gene *mecA* (Enright et al., 2002). Este gene está inserido em um cassete móvel denominado *SSCmec* ("*staphylococcal cassette chromosome mec*") e codifica uma proteína ligante de penicilina que reduz a afinidade da meticilina pela parede da célula. *S. aureus* meticilina resistentes tornaram-se a principal causa de infecções hospitalares (Enright et al., 2002). As polimixinas são antimicrobianos polipeptídicos que também emergiram como alternativa ao combate de bactérias resistentes à maioria dos antimicrobianos. Atuam removendo moléculas de cálcio e magnésio da parede celular, aumentando a permeabilidade da membrana até que a célula colapse. O gene plasmidial *mcr-1* provoca a ligação de uma molécula de fosfoetanolamina ao lipídeo A, impedindo a atividade das polimixinas (Liu et al., 2016). Esta resistência é alarmante, pois

representa a falência dos tratamentos antimicrobianos disponíveis na atualidade.

A presença de genes de β -lactamases vem sendo descrita em uma variedade de ambientes aquáticos: rios (Fontes et al., 2011; De Araujo et al., 2016; Turano et al., 2016; De Oliveira et al., 2017), lagos (Pontes et al., 2009), praias (Montezzi et al., 2015; Paschoal et al., 2017; Sellera et al., 2017) e cavernas (Balsalobre et al., 2010). Os genes *mecA* (Sousa et al., 2017) e *mcr-1* (Fernandes et al., 2017) foram apenas documentados em praias do sudeste do Brasil. Uma vez que estes genes tenham um impacto negativo no meio clínico, que o ambiente cumpre papel fundamental na manutenção do fenótipo resistente e que existem poucas informações sobre a veiculação destes genes ao longo da costa brasileira, há uma demanda para a realização de pesquisas nestas áreas. O objetivo deste estudo foi detectar a presença dos genes *bla*_{CTX-M} (grupos 1, 2, 8, 25 e 9), *bla*_{GES-like}, *bla*_{SPM-1}, *bla*_{SHV-like}, *bla*_{TEM-like}, *bla*_Z, *mecA* e *mcr-1* em bactérias de uma laguna costeira do sul do Brasil.

Material e métodos

Área de estudo

Conforme descrito no **subitem 4.1** do Material e métodos (corpo da Tese).

Coleta das amostras

Conforme descrito no **subitem 4.2** do Material e métodos (corpo da Tese).

Isolamento e identificação de bactérias

Conforme descrito no **subitem 4.5** do Material e métodos (corpo da Tese).

Análise da presença de genes de resistência a antimicrobianos

Tanto o DNA das amostras de água quanto dos isolados foi obtido e analisado conforme descrito no **subitem 4.6** do Material e métodos (corpo da Tese). Avaliou-se a presença dos genes *bla*_{CTX-M} (grupos 1, 2, 8, 25 e 9), *bla*_{GES-like}, *bla*_{SHV-like}, *bla*_{SPM-1}, *bla*_{TEM-like} e *mcr-1*.

Resultados

A análise do DNA total das amostras de água revelou apenas a presença de *bla*_{GES}, em ambas as temporadas e em todos os pontos de coleta avaliados (exceto no Ponto 3, na baixa temporada). 33.18% dos isolados analisados (134/392) apresentou pelo menos um dos seguintes genes: *bla*_{CTX-M} (grupos 1, 2, 8, 25 e 9), *bla*_{GES-like}, *bla*_{SPM-1}, *bla*_{SHV-like} e *bla*_{TEM-like} (**Tabela 3.1**).

Tabela 3.1. Distribuição dos isolados que apresentaram pelo menos um dos genes avaliados entre as espécies, pontos de coleta e temporadas analisadas.

	Baixa temporada					Alta temporada				
	Pontos				Total	Pontos				Total
	1	2	3	4		1	2	3	4	
	(37)	(57)	(50)	(41)	(185)	(62)	(54)	(44)	(47)	(207)
<i>A. faecalis</i> (11)	2	2	2	0	6	0	1	2	2	5
<i>P. aeruginosa</i> (79)	10	13	5	4	32	17	12	8	10	47
<i>E. coli</i> (25)	2	4	3	2	11	13	0	0	1	14
<i>Enterobacter</i> spp. (7)	1	2	2	2	7	0	0	0	0	0
<i>Bacillus</i> spp. (10)	4	1	0	0	5	0	2	0	3	5
Total (134)	19	22	12	8	63	30	15	10	16	71
Frequência (%)	51.3	38.6	24.0	19.5	34.0	48.4	27.8	22.72	34.04	34.3

Considerando-se toda a área analisada, a frequência destes genes foi similar em ambas as temporadas (**Tabela 3.1**). Na baixa temporada, estes genes foram prevalentes na área urbanizada da Laguna (Pontos 1 e 2). Estes genes foram mais frequentes no Ponto 1 na alta temporada, porém neste período também se destacaram mesmo em áreas da Laguna onde a urbanização é ausente (Ponto 4) (**Tabela 3.1**). Com relação às espécies isoladas, estes genes foram mais frequentes em *P. aeruginosa* e *E. coli* (**Tabela 3.1**). Os genes *bla*_Z, *mecA* e *mcr-1* não foram encontrados.

O gene *bla*_{CTX-M} foi o mais frequente na Laguna e esteve presente em 16.58% dos isolados. Este gene foi detectado em *A. faecalis*, *P. aeruginosa* e *E. coli*, predominando durante a alta temporada (**Tabela 3.2**). *bla*_{CTX-M} dos grupos 2, 8 e 25 foram prevalentes em *A. faecalis*; enquanto os grupos 1 e 9 prevaleceram, respectivamente, em *P. aeruginosa* e em *E. coli* (**Tabela 3.2**).

Tabela 3.2. Número de isolados obtidos que apresentou o gene *bla*_{CTX-M} (grupos 1, 2, 8, 25 e 9).

	Baixa temporada	Alta temporada
<i>A. faecalis</i>	10	14
Grupo 1	2	0
Grupo 2, 8, 25	1	4
Grupos 2, 9	1	0
Grupos 1, 2, 8, 25, 9	1	0
Subtotal <i>bla</i>_{CTX-M}	5	4
<i>P. aeruginosa</i>	45	69
Grupo 1	5	8
Grupo 2	0	2
Grupos 8, 25	1	1
Grupo 9	0	1
Grupos 1, 9	1	0
Grupos 2, 8, 25	2	6
Grupos 8, 25, 9	1	0
Grupos 1, 2, 8, 25	1	0
Grupos 2, 8, 25, 9	0	3
Grupos 1, 2, 8, 25, 9	2	7
Subtotal <i>bla</i>_{CTX-M}	13	28
<i>E. coli</i>	45	50
Grupo 2	0	1
Grupo 9	4	7
Grupo 1, 9	0	1
Grupos 1, 8, 25, 9	2	0
Subtotal <i>bla</i>_{CTX-M}	5	8
Total <i>bla</i>_{CTX-M} (+)	24	41

A ocorrência dos grupos de *bla*_{CTX-M} variou de acordo com a temporada e os pontos de coleta. Na baixa temporada, *bla*_{CTX-M} foi prevalente nos pontos urbanizados (Pontos 1 e 2). Na alta temporada alguns grupos de *bla*_{CTX-M} distribuíram-se igualmente entre pontos com e sem urbanização (Pontos 3 e 4) (**Figura 3.1**). Na baixa temporada, o grupo 1 foi prevalente nos isolados dos Pontos 1 e 3, enquanto os grupos 8, 25 e 9 o foram no Ponto 2. Na alta temporada, prevaleceram os grupos 1 e 9 no Ponto 1, enquanto nos demais pontos de coleta isso ocorreu para os grupos 8, 25 e 9 (**Figura 3.1**).

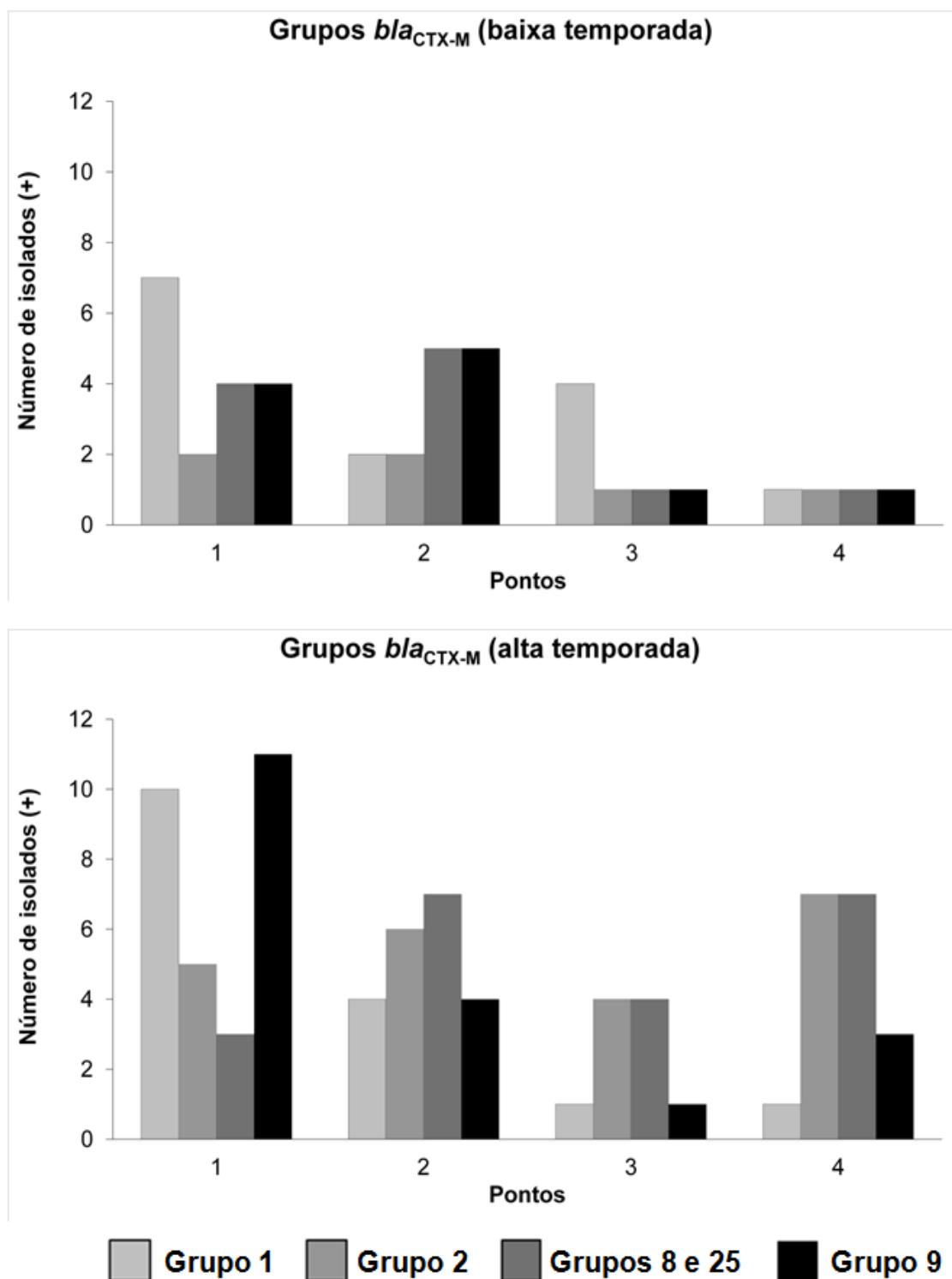


Figura 3.1. Número de isolados que apresentaram os diferentes grupos do gene *bla*_{CTX-M} (grupos 1, 2, 8, 25 e 9) nos diferentes pontos da Laguna.

O segundo gene mais frequente foi *bla*_{TEM}-like, presente em 10.46% dos isolados, principalmente em isolados oriundos da baixa temporada. Foi o único gene detectado em *Enterobacter* spp. (**Tabela 3.3**). Os genes *bla*_{SPM-1}, *bla*_{GES}-like e *bla*_{SHV}-like foram presentes respectivamente em 7.9%, 7.14% e 4.33% dos isolados (**Tabela 3.3**).

A distribuição destes genes variou de acordo com as temporadas e os pontos de coleta analisados. O gene *bla*_{TEM}-like predominou em isolados oriundos da baixa temporada, ocorrendo o inverso para os genes *bla*_{GES}-like e *bla*_{SHV}-like (predominantes na alta temporada) (**Figura 3.2**). Com relação à distribuição na área da Laguna, os pontos urbanizados (1 e 2) concentraram a maior parte destes genes. Contudo, na baixa temporada, *bla*_{SHV}-like e *bla*_{GES}-like predominaram respectivamente nos isolados dos pontos 3 e 4. Na alta temporada os isolados do Ponto 4 também se destacaram pela presença de *bla*_{TEM}-like e *bla*_{SPM-1} (**Figura 3.2**).

Tabela 3.3. Distribuição dos genes *bla*_{GES}-like, *bla*_{SHV}-like, *bla*_{TEM}-like e *bla*_{SPM-1} ao longo das espécies isoladas e das temporadas analisadas.

	Baixa temporada					Alta temporada				
	GES	SHV	TEM	SPM	Total	GES	SHV	TEM	SPM	Total
<i>A. faecalis</i>	0	0	2	NP	2 (10)	1	0	0	NP	1 (14)
<i>P. aeruginosa</i>	4	2	9	15	33 (45)	12	1	2	13	28 (69)
<i>E. coli</i>	6	1	2	NP	9 (45)	5	9	12	NP	26 (50)
<i>Enterobacter spp.</i>	0	0	7	NP	7 (20)	0	0	0	NP	0 (7)
<i>Bacillus sp.</i>	0	0	0	NP	0 (18)	0	0	1	NP	1 (7)
<i>B. cereus</i>	0	1	4	NP	5 (46)	0	3	2	NP	5 (46)
Total	10	4	24	15	56 (184)	18	13	17	13	61 (193)

NP = não pesquisado.

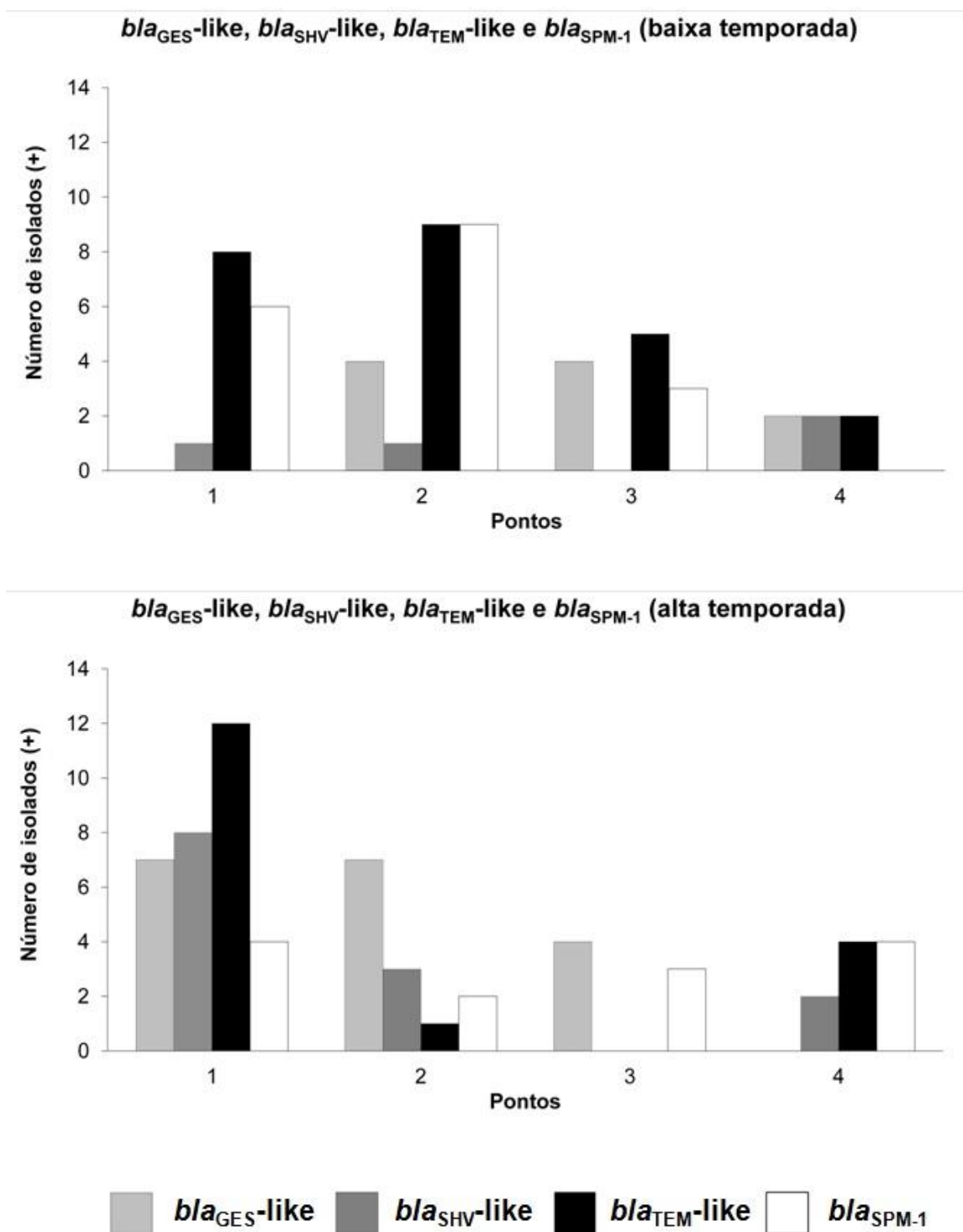


Figura 3.2. Número de isolados que apresentaram os genes *bla*_{GES}-like, *bla*_{SHV}-like, *bla*_{TEM}-like e *bla*_{SPM-1} nos diferentes pontos da Laguna.

Discussão

A emergência de bactérias resistentes em ambientes aquáticos vem aumentando consideravelmente nos últimos 30 anos (Nascimento et al., 2014). A maior parte dos estudos nacionais sobre resistência a antimicrobianos em ambientes aquáticos concentra-se na região sudeste do Brasil, dedicando-se principalmente à área da aquacultura e a fontes de água doce, ecossistemas nos quais a resistência a β -lactâmicos é prevalente (Nascimento et al., 2014). Genes de β -lactamases vêm sendo detectados em reservatórios naturais do país ao longo da última década (Pontes et al., 2009; Balsalobre et al., 2010; Fontes et al., 2011; Montezzi et al., 2015; De Araujo et al., 2016; Turano et al., 2016; De Oliveira et al., 2017; Paschoal et al., 2017; Sellera et al., 2017).

No presente estudo, detectou-se a presença de *bla*_{CTX-M}, *bla*_{GES}, *bla*_{SPM-1}, *bla*_{SHV} e *bla*_{TEM} em bactérias de uma laguna costeira. Com relação à análise do DNA total das amostras, apenas *bla*_{GES-like} foi detectado. A variante *bla*_{GES-5} é reconhecida por ser frequente em bactérias ubíquas de ambientes aquáticos (Manageiro et al., 2014).

A presença de genes de β -lactamases foi observada em 33.18% das bactérias cultivadas, ocorrendo em todas as espécies isoladas, em toda a área da Laguna e em ambos os períodos analisados (**Tabela 3.1**). Este valor é baixo quando comparado ao de outros estudos com foco no ambiente aquático, todavia os dados reportados na literatura normalmente referem-se a isolados pré-selecionados por algum β -lactâmico de interesse (Montezzi et al., 2015; Zhang et al. 2015; De Oliveira et al., 2017). Apesar de esta ser uma abordagem importante para identificar reservatórios naturais de bactérias resistentes e genes de resistência, estes dados negligenciam a fração de bactérias sensíveis capazes de veicular estes genes sem expressá-los no contexto ambiental.

A maior parte dos estudos que pesquisam genes de β -lactamases em ambientes aquáticos analisa apenas representantes de *Enterobacteriaceae* (Talukdar et al., 2013; Blaak et al., 2015; Montezzi et al., 2015). Na Laguna, entretanto, estes genes foram melhor representados em isolados de *P. aeruginosa* (**Tabela 3.1**, **Tabela 3.2** e **Tabela 3.3**). Poucos são os estudos que pesquisam genes de β -lactamases em cepas ambientais desta espécie (Tação et al., 2012; Turano et al., 2016). Outro grupo que raramente aparece nestes estudos é o das

bactérias Gram-positivas (Amos et al., 2014). Contudo, ainda que em baixa representatividade, os genes *bla*_{TEM} e *bla*_{SHV} foram detectados em isolados de *Bacillus* spp. (**Tabela 3.3**). Estas espécies podem ter papel importante no transporte destes genes e na manutenção do fenótipo resistente em ecossistemas aquáticos. Esses dados indicam que a pesquisa destes genes em distintos grupos taxonômicos torna a análise mais fiel à diversidade existente e mais informativa sobre a distribuição destes genes no ambiente.

O gene *bla*_{CTX-M} foi o mais frequente entre os isolados da Laguna (**Tabela 3.1**). Os grupos 1 e 9 foram prevalentes, respectivamente, em *P. aeruginosa* e *E. coli* (**Tabela 3.2**). Variantes de *bla*_{CTX-M} do grupo 1 já foram reportadas como dominantes em amostras de águas superficiais de rios (Blaak et al., 2015) e de efluente doméstico (Talukdar et al., 2013). Variantes do grupo 9 foram relatadas entre isolados de *Enterobacteriaceae* oriundos de praias do Rio de Janeiro selecionados por exposição a imipinem (Montezzi et al., 2015).

No Brasil, *bla*_{CTX-M} é o gene de β-lactamase mais frequente entre *Enterobacteriaceae* de origem hospitalar (Sampaio; Gales, 2016). Apesar disso, *bla*_{TEM} é reportado como o gene mais frequente em *Enterobacteriaceae* de ambientes aquáticos, tanto no Brasil (Balsalobre et al., 2010; Chagas et al., 2011; Montezzi et al., 2015; De Oliveira et al., 2017) quanto em outros países (Marávic et al., 2015). Corroborando com estes estudos, observou-se que nos isolados desta família (*E. coli* e *Enterobacter* spp.), o gene *bla*_{TEM} foi mais frequente do que *bla*_{CTX-M}. Os isolados de *E. coli* também se destacaram pela veiculação do gene *bla*_{SHV}, principalmente na alta temporada (**Tabela 3.3**).

Apesar de serem menos frequentes que *bla*_{CTX-M} e *bla*_{TEM}, os genes *bla*_{GES} e *bla*_{SHV} também já foram reportados em ambientes aquáticos do Brasil (Chagas et al., 2011; De Araujo et al., 2016; De Oliveira et al., 2017). É a primeira vez que o gene *bla*_{SPM-1} é relatado em uma laguna costeira. Apesar de já terem sido reportados em praias brasileiras, os genes *bla*_Z, *mecA* (Sousa et al., 2017) e *mcr-1* (Fernandes et al., 2017) não foram detectados no presente estudo.

A maior parte dos genes avaliados ocorreu em isolados oriundos da área urbanizada da Laguna (Pontos 1 e 2) (**Figura 3.1** e **Figura 3.2**). Uma vez que as margens destes pontos se caracterizam essencialmente pela presença de habitações e que o esgotamento sanitário ainda é incipiente nas cidades vizinhas à Laguna, é possível que os resíduos gerados nestas áreas atinjam as águas e

influenciem o fluxo de genes de β -lactamases nas comunidades microbianas locais. Os genes *bla*_{CTX-M}, *bla*_{GES-like} e *bla*_{SHV-like} foram mais frequentes na alta temporada (**Tabela 3.2** e **Tabela 3.3**), período em que a população das cidades vizinhas à Laguna aumenta consideravelmente (Zuanazzi e Bartels, 2016). A intensificação das atividades neste período parece ter tido efeito principalmente sobre *bla*_{CTX-M}, que na alta temporada distribuiu-se de modo mais uniforme entre zonas urbanizadas (Pontos 1 e 2) e não urbanizadas (Pontos 3 e 4) (**Figura 3.2**). A ocorrência bem como a diversidade de *bla*_{CTX-M} em ambientes aquáticos tem sido associada a perturbações de origem antrópica (Tacão et al., 2012; Marávic et al., 2015).

Verificou-se que a distribuição de genes de β -lactamases na Laguna Tramandaí varia de acordo com as espécies de bactérias, com a temporada do ano avaliada, bem como com o grau de impacto antrópico existente nos pesquisados. Uma vez que este sistema integra um estuário - corpo hídrico caracterizado pela alta dinamicidade - sugere-se que esta área seja monitorada para um maior número de genes e por um maior período de tempo.

Conclusão

Genes de β -lactamases de relevância clínica foram encontrados em diferentes grupos de bactérias de uma laguna costeira, inclusive em espécies consideradas ubíquas em ambientes aquáticos. A maior diversidade de espécies investigadas se refletiu na detecção de diversos tipos de genes de β -lactamases, o que dificilmente é observado em estudos que se restringem à análise de uma única espécie (geralmente *E. coli*). Os genes de β -lactamases foram menos frequentes do que em estudos prévios, porém a abordagem utilizada analisou as bactérias independentemente do fenótipo expresso, o que representa a cena ambiental de modo mais fidedigno. Percebeu-se que a ocorrência destes genes variou de acordo com a temporada analisada, com as espécies isoladas, mas principalmente com a variabilidade espacial entre os pontos analisados. As bactérias analisadas atuam como reservatório de genes de β -lactamases e podem ser amplamente veiculadas pela água, representando um risco ao surgimento de epidemias. Estudos como estes contribuem para o entendimento de como as atividades antrópicas influenciam na distribuição de genes de resistência, bem como para o reconhecimento de corpos d'água enquanto reservatórios naturais destes genes, sendo ferramentas úteis à elaboração de políticas de gestão urbana e de saúde pública.

Referências

1. Ahammad, Z. S., Sreekrishnan, T. R., Hands, C. L., Knapp, C. W., & Graham, D. W. (2014). Increased waterborne bla NDM-1 resistance gene abundances associated with seasonal human pilgrimages to the Upper Ganges River. *Environmental science & technology*, *48*(5), 3014-3020.
2. Amos, G. C. A., Zhang, L., Hawkey, P. M., Gaze, W. H., & Wellington, E. M. (2014). Functional metagenomic analysis reveals rivers are a reservoir for diverse antibiotic resistance genes. *Veterinary microbiology*, *171*(3-4), 441-447.
3. Andrade, L. N., & Darini, A. L. C. (2017). Bacilos gram-negativos produtores de beta-lactamases: que bla bla bla é esse?. *Journal of Infection Control*, *6*(1).
4. Balsalobre, L. C., Dropa, M., de Oliveira, D. E., Lincopan, N., Mamizuka, E. M., Matté, G. R., & Matté, M. H. (2010). Presence of blaTEM-116 gene in environmental isolates of *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas jandaei* from Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, *41*(3), 718-719.
5. Berendonk, T. U., Manaia, C. M., Merlin, C., Fatta-Kassinos, D., Cytryn, E., Walsh, F., ... & Kreuzinger, N. (2015). Tackling antibiotic resistance: the environmental framework. *Nature Reviews Microbiology*, *13*(5), 310.
6. Berglund, B. (2015). Environmental dissemination of antibiotic resistance genes and correlation to anthropogenic contamination with antibiotics. *Infection ecology & epidemiology*, *5*(1), 28564.
7. Blaak, H., Lynch, G., Italiaander, R., Hamidjaja, R. A., Schets, F. M., & de Roda Husman, A. M. (2015). Multidrug-resistant and extended spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in Dutch surface water and wastewater. *PLoS One*, *10*(6), e0127752.
8. De Araujo, C. F. M., Silva, D. M., Carneiro, M. T., Ribeiro, S., Fontana-Maurell, M., Alvarez, P., ... & Carvalho-Assef, A. P. D. A. (2016). Detection of carbapenemase genes in aquatic environments in Rio de Janeiro, Brazil. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *60*(7), 4380-4383.
9. De Oliveira, D. V., Nunes, L. S., Barth, A. L., & Van Der Sand, S. T. (2017). Genetic Background of β -Lactamases in Enterobacteriaceae Isolates from Environmental Samples. *Microbial ecology*, *74*(3), 599-607.

10. Enright, M. C., Robinson, D. A., Randle, G., Feil, E. J., Grundmann, H., & Spratt, B. G. (2002). The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *99*(11), 7687-7692.
11. Fernandes, M. R., Sellera, F. P., Esposito, F., Sabino, C. P., Cerdeira, L., & Lincopan, N. (2017). Colistin-resistant mcr-1-positive *Escherichia coli* on public beaches, an infectious threat emerging in recreational waters. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *61*(7), e00234-17
12. Fontes, L. C., Neves, P. R., Oliveira, S., Silva, K. C., Hachich, E. M., Sato, M. I., & Lincopan, N. (2011). Isolation of *Pseudomonas aeruginosa* coproducing metallo- β -lactamase SPM-1 and 16S rRNA methylase RmtD1 in an urban river. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *55*(6), 3063-3064.
13. Fuentefria, D. B., Ferreira, A. E., Gräf, T., & Corção, G. (2009). Spread of Metallo- β -lactamases: screening reveals the presence of a BLA SPM-1 gene in hospital sewage in southern Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, *40*(1), 82-85.
14. Gullberg, E., Cao, S., Berg, O. G., Ilbäck, C., Sandegren, L., Hughes, D., & Andersson, D. I. (2011). Selection of resistant bacteria at very low antibiotic concentrations. *PLoS pathogens*, *7*(7), e1002158.
15. Guyomard-Rabenirina, S., Dartron, C., Falord, M., Sadikalay, S., Ducat, C., Richard, V., ... & Talarmin, A. (2017). Resistance to antimicrobial drugs in different surface waters and wastewaters of Guadeloupe. *PloS one*, *12*(3), e0173155.
16. Henriques, I., Moura, A., Alves, A., Saavedra, M. J., & Correia, A. (2006). Analysing diversity among β -lactamase encoding genes in aquatic environments. *FEMS microbiology ecology*, *56*(3), 418-429.
17. Hong, D. J., Bae, I. K., Jang, I. H., Jeong, S. H., Kang, H. K., & Lee, K. (2015). Epidemiology and characteristics of metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection & chemotherapy*, *47*(2), 81-97.
18. Hu, Y. Y., Cai, J. C., Zhou, H. W., Chi, D., Zhang, X. F., Chen, W. L., ... & Chen, G. X. (2013). Molecular typing of CTX-M-producing *Escherichia coli* isolates from environmental water, swine feces, specimens from healthy humans, and human patients. *Applied and environmental microbiology*, *79*(19), 5988-5996.
19. Jeong, S. H., Bae, I. K., Park, K. O., An, Y. J., Sohn, S. G., Jang, S. J., ... & Lee, S. H. (2006). Outbreaks of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing carbapenemases in Korea. *The Journal of Microbiology*, *44*(4), 423-431.

20. Kümmerer, K. (2004). Resistance in the environment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 54(2), 311-320.
21. Lentz, S. A., de Lima-Morales, D., Cuppertino, V. M., de S Nunes, L., da Motta, A. S., Zavascki, A. P., ... & Martins, A. F. (2016). Letter to the editor: Escherichia coli harbouring mcr-1 gene isolated from poultry not exposed to polymyxins in Brazil. *Eurosurveillance*, 21(26).
22. Liu, Y. Y., Wang, Y., Walsh, T. R., Yi, L. X., Zhang, R., Spencer, J., ... & Yu, L. F. (2016). Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *The Lancet infectious diseases*, 16(2), 161-168.
23. Magalhães, M. J. T. L., Pontes, G., Serra, P. T., Balieiro, A., Castro, D., Pieri, F. A., ... & Orlandi, P. P. (2016). Multidrug resistant Pseudomonas aeruginosa survey in a stream receiving effluents from ineffective wastewater hospital plants. *BMC microbiology*, 16(1), 193.
24. Manageiro, V., Ferreira, E., Caniça, M., & Manaia, C. M. (2014). GES-5 among the β -lactamases detected in ubiquitous bacteria isolated from aquatic environment samples. *FEMS microbiology letters*, 351(1), 64-69.
25. Maravić, A., Skočibušić, M., Cvjetan, S., Šamanić, I., Fredotović, Ž., & Puizina, J. (2015). Prevalence and diversity of extended-spectrum- β -lactamase-producing Enterobacteriaceae from marine beach waters. *Marine pollution bulletin*, 90(1-2), 60-67.
26. Mataseje, L. F., Neumann, N., Crago, B., Baudry, P., Zhanel, G. G., Louie, M., ... & ARO Water Study Group. (2009). Characterization of ceftioxin-resistant Escherichia coli isolates from recreational beaches and private drinking water in Canada between 2004 and 2006. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 53(7), 3126-3130.
27. Montezzi, L. F., Campana, E. H., Corrêa, L. L., Justo, L. H., Paschoal, R. P., da Silva, I. L. V. D., ... & Picão, R. C. (2015). Occurrence of carbapenemase-producing bacteria in coastal recreational waters. *International journal of antimicrobial agents*, 45(2), 174-177.
28. Nascimento, E. D. D., & Araújo, M. F. F. D. (2014). Antimicrobial resistance in bacteria isolated from aquatic environments in Brazil: a systematic review. *Revista Ambiente & Água*, 9(2), 239-249.

29. Olsen, J. E., Christensen, H., & Aarestrup, F. M. (2006). Diversity and evolution of bla_Z from *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57(3), 450-460.
30. Paschoal, R. P., Campana, E. H., Corrêa, L. L., Montezzi, L. F., Barreto, L. R., da Silva, I. R., ... & Picão, R. C. (2017). Concentration and variety of carbapenemase producers in recreational coastal waters showing distinct levels of pollution. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 61(12), e01963-17.
31. Pereira, A., Santos, A., Tação, M., Alves, A., Henriques, I., & Correia, A. (2013). Genetic diversity and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* from Tagus estuary (Portugal). *Science of the Total Environment*, 461, 65-71.
32. Poirel, L., Naas, T., Le Thomas, I., Karim, A., Bingen, E., & Nordmann, P. (2001). CTX-M-type extended-spectrum β -lactamase that hydrolyzes ceftazidime through a single amino acid substitution in the omega loop. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(12), 3355-3361.
33. Pontes, D. S., Pinheiro, F. A., Lima-Bittencourt, C. I., Guedes, R. L. M., Cursino, L., Barbosa, F., ... & Nascimento, A. M. A. (2009). Multiple antimicrobial resistance of gram-negative bacteria from natural oligotrophic lakes under distinct anthropogenic influence in a tropical region. *Microbial ecology*, 58(4), 762-772.
34. Sampaio, J. L. M., & Gales, A. C. (2016). Antimicrobial resistance in Enterobacteriaceae in Brazil: focus on β -lactams and polymyxins. *brazilian journal of microbiology*, 47, 31-37.
35. Segawa, T., Takeuchi, N., Rivera, A., Yamada, A., Yoshimura, Y., Barcaza, G., ... & Ushida, K. (2013). Distribution of antibiotic resistance genes in glacier environments. *Environmental microbiology reports*, 5(1), 127-134.
36. Sellera, F. P., Fernandes, M. R., Moura, Q., Souza, T. A., Cerdeira, L., & Lincopan, N. (2017). Draft genome sequence of *Enterobacter cloacae* ST520 harbouring bla_{KPC-2}, bla_{CTX-M-15} and bla_{OXA-17} isolated from coastal waters of the South Atlantic Ocean. *Journal of global antimicrobial resistance*, 10, 279-280.
37. Silva, K. C. D., & Lincopan, N. (2012). Epidemiologia das betalactamases de espectro estendido no Brasil: impacto clínico e implicações para o agronegócio. *J Bras Patol Med Lab*, 48(3), 91-9.
38. Sousa, V. S. D., da-Silva, A. P. D. S., Sorenson, L., Paschoal, R. P., Rabello, R. F., Campana, E. H., ... & Picão, R. C. (2017). *Staphylococcus saprophyticus*

recovered from humans, food, and recreational waters in Rio de Janeiro, Brazil. *International journal of microbiology*, 2017

39. Spindler, A., Otton, L. M., Fuentefria, D. B., & Corção, G. (2012). Beta-lactams resistance and presence of class 1 integron in *Pseudomonas* spp. isolated from untreated hospital effluents in Brazil. *Antonie van Leeuwenhoek*, 102(1), 73-81.

40. Tacão, M., Correia, A., & Henriques, I. (2012). Resistance to broad-spectrum antibiotics in aquatic systems: anthropogenic activities modulate the dissemination of blaCTX-M-like genes. *Applied and environmental microbiology*, 78(12), 4134-4140.

41. Talukdar, P. K., Rahman, M., Rahman, M., Nabi, A., Islam, Z., Hoque, M. M., ... & Islam, M. A. (2013). Antimicrobial resistance, virulence factors and genetic diversity of *Escherichia coli* isolates from household water supply in Dhaka, Bangladesh. *Plos one*, 8(4), e61090.

42. Toleman, M. A., Simm, A. M., Murphy, T. A., Gales, A. C., Biedenbach, D. J., Jones, R. N., & Walsh, T. R. (2002). Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo- β -lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 50(5), 673-679.

43. Turano, H., Gomes, F., Medeiros, M., Oliveira, S., Fontes, L. C., Sato, M. I., & Lincopan, N. (2016). Presence of high-risk clones of OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii* (ST79) and SPM-1-producing *Pseudomonas aeruginosa* (ST277) in environmental water samples in Brazil. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 86(1), 80-82.

44. Zhang, H., Zhou, Y., Guo, S. & Chang, W. (2015). Multidrug resistance found in extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae from rural water reservoirs in Guantao, China. *Front. Microbiol.* 6:267.

45. Zuanazzi, P. T.; Bartels, M. Estimativas para a população flutuante do Litoral Norte do RS. Porto Alegre: FEE, 2016. Disponível em: <www.fee.rs.gov.br/wp-content/uploads/2016/07/20160711relatorio-populacao-flutuante-do-litoral-norte.pdf>. Data de acesso: October 26, 2017.

46. Zurfluh, K., Hächler, H., Nüesch-Inderbinen, M., & Stephan, R. (2013). Characteristics of extended-spectrum β -lactamase-and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae isolates from rivers and lakes in Switzerland. *Applied and environmental microbiology*, 79(9), 3021-3026.

47. Walsh, T.R., Weeks, J., Livermore, D. M., & Toleman, M. A. (2011). Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and

its implications for human health: an environmental point prevalence study. *Lancet Infect. Dis.* 11, 355–362.

48. Wang, C., Dang, H., & Ding, Y. (2008). Incidence of diverse integrons and β -lactamase genes in environmental Enterobacteriaceae isolates from Jiaozhou Bay, China. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(12), 2889-2896.

5.4. Artigo 4

Sequenciamento Ion Torrent (PGM) aplicado à análise do resistoma de uma laguna costeira

Belize Leite, Stefani Corrêa, Débora Ribeiro, Raíssa Nunes, Adriana Giongo, Gertrudes Corção.

Resumo

Ambientes aquáticos atuam como reservatórios e como meio de transporte de bactérias portadoras de genes associados à resistência a antimicrobianos. A microbiota de humanos pode ser exposta a estes genes ao entrar em contato com bactérias veiculadas pela água, o que favorece o surgimento de novos fenótipos de bactérias resistentes. O monitoramento de bactérias ambientais pode detectar determinantes de resistência a antimicrobianos antes mesmo de estes se manifestarem no contexto clínico, contribuindo para estratégias de prevenção de infecções persistentes. O objetivo deste estudo foi avaliar a presença dos genes *bla*_{CTX-M-like}, *bla*_{GES-like}, *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-51}, *bla*_{SHV-like}, *bla*_{SPM-1}, *bla*_{TEM-like}, *bla*_Z, *mecA*, *tetA*, *tetB*, *acrA*, *acrB*, *tolC*, *adeB*, *adeR*, *adeS*, *mexB*, *mexD*, *mexF*, *mexY* e genes de segmentos conservados de integrons de classe I (5'CS/3'CS) em amostras de água oriundas de pontos de uma laguna costeira sob diferentes tipos de impacto antrópico, caracterizando os produtos obtidos através da plataforma de sequenciamento de alto desempenho *Ion Torrent* (PGM). Os dados gerados foram comparados com os disponíveis nas bases CARD (*Comprehensive Antibiotic Resistance Database*) e INTEGRALL "*The Integron Database*". As amostras de água também foram analisadas com relação à presença de resíduos de antimicrobianos (método LC-MS/MS), mas não apresentaram níveis detectáveis destes compostos. Apesar disso, foram identificados 31 genes associados à resistência ao longo da Laguna, incluindo enzimas que inativam o antimicrobiano, β -lactamases em sua maioria (10 genes), mutações de ponto que alteram a estrutura do alvo de ligação do antimicrobiano na célula (10 genes) e bombas de efluxo (11 genes). Algumas variantes dos genes foram pela primeira vez relatadas fora do contexto clínico. Integrons de classe I carreando os genes *aad(6')*, *bla*_{GES}, *bla*_{GES-16} e *qacE Δ 1* foram encontrados tanto em áreas urbanizadas quanto agrícolas. Uma vez que estes elementos se caracterizam por dispersar genes ligados a funções adaptativas e são frequentemente relacionados a ambientes impactados, sugere-se que tanto a urbanização quanto a agricultura são atividades que influenciam a distribuição de genes de resistência na Laguna.

Introdução

Antibióticos são produzidos por uma variedade de organismos e conferem vantagens adaptativas em determinados contextos. O primeiro antibiótico foi descoberto em 1929 por Alexander Fleming, o qual constatou em seu laboratório que o crescimento de um cultivo de *Staphylococcus aureus* foi interrompido pela presença de um fungo contaminante (*Penicillium notatum*) (Aminov, 2009). As bactérias podem ser intrinsecamente resistentes a antibióticos (principalmente por permeabilidade seletiva da membrana) ou adquirir determinantes de resistência através de mutações pontuais no DNA, por incorporação de DNA exógeno, transdução ou conjugação (Blair et al., 2015).

A descoberta e uso de antimicrobianos foi essencial ao avanço da medicina, sendo largamente aplicados em tratamentos clínicos (humano e animal). Também vêm sendo utilizados no uso terapêutico, profilático e como promotores de crescimento na produção animal contribuindo para um aumento na produtividade de animais de corte e peixes cultiváveis. Atualmente, políticas internacionais de combate a infecções resistentes incentivam o uso consciente de antimicrobianos na prática clínica (World Health Organization, 2001) e proíbem a utilização de diversos medicamentos na produção animal (Huyghebaert et al., 2011).

A maior parte dos antimicrobianos passa inerte tanto pelo metabolismo quanto por sistemas tradicionais de tratamento de efluentes, podendo atingir os corpos hídricos receptores (Zhang et al., 2009). Estes resíduos enriquecem o ambiente em que se inserem com nutrientes, poluentes, bactérias resistentes e genes de resistência, representando fonte de pressão seletiva sobre o microbioma que compõe o ecossistema (Aminov, 2009). Linhagens de bactérias resistentes veiculadas pela água podem infectar humanos através do contato direto ou da cadeia alimentar e, ainda, permutar genes de resistência com patógenos ou mesmo componentes da microbiota intestinal (Rolain, 2013). Ainda há poucas informações sobre as condições nas quais estes genes são selecionados, transferidos e disseminados no ambiente.

Em virtude da preocupação direta das autoridades em saúde pública, o estudo da resistência a antimicrobianos é tradicionalmente voltado a cepas de origem clínica (Pidcock, 2006). Contudo, a análise sistemática de bactérias ambientais pode ser capaz de detectar determinantes de resistência antes mesmo

que estes venham a representar riscos à saúde humana. O desenvolvimento e aprimoramento de técnicas mais robustas e acessíveis podem consolidar estratégias de diagnóstico que priorizem a prevenção ao invés da remediação de surtos de infecções por bactérias resistentes.

Abordagens metagenômicas analisam todo o material genético ou vários genomas de uma amostra sem a necessidade de isolamento prévio dos microrganismos (Thomas et al., 2012). Estas abordagens permitem, por exemplo, diagnósticos rápidos e precisos; o acesso a informações sobre táxons raros (cultiváveis sobre condições muito específicas ou mesmo desconhecidas até o momento); a identificação de novas variantes de genes e mecanismos de resistência a antimicrobianos (Schmieder; Edwards, 2012); dentre outras aplicações que impactaram positivamente a pesquisa em microbiomas de ambientes clínicos ou naturais.

Plataformas de sequenciamento de alto desempenho (*Next-Generation Sequencing*, NGS) realizam estas análises sem a necessidade de etapas como clonagem e eletroforese, apresentando custo inferior comparado ao sequenciamento de Sanger. Estas plataformas vêm gradativamente sendo aprimoradas quanto à abundância, automatização, rapidez e acessibilidade de informações que produzem. Diferentes sequenciadores têm sido desenvolvidos para esta finalidade e divergem principalmente quanto ao tempo de corrida, taxa de erro de leitura, volume de dados, comprimento das sequências geradas e custo operacional.

O objetivo deste estudo foi avaliar amostras de água de uma laguna costeira quanto à presença dos genes *bla*_{CTX-M-like}, *bla*_{GES-like}, *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-51}, *bla*_{SHV-like}, *bla*_{SPM-1}, *bla*_{TEM-like}, *bla*_Z, *mecA*, *tetA*, *tetB*, *acrA*, *acrB*, *tolC*, *adeB*, *adeR*, *adeS*, *mexB*, *mexD*, *mexF*, *mexY* e segmentos conservados de integrons de classe I, caracterizando os produtos de PCR obtidos através da plataforma de sequenciamento *Ion Torrent* (PGM). Analisaram-se amostras de pontos sob diferentes tipos de impacto a fim de perceber se as atividades humanas presentes nas margens da Laguna influenciam na distribuição destes genes.

Material e métodos

Área de estudo

Conforme descrito no **subitem 4.1** do Material e métodos (corpo da Tese).

Coleta das amostras

Conforme descrito no **subitem 4.2** do Material e métodos (corpo da Tese).

Análise de compostos orgânicos e antimicrobianos

As amostras de água foram avaliadas quanto à presença de resíduos de compostos orgânicos e antimicrobianos conforme descrito no **subitem 4.3** do Material e métodos (corpo da Tese).

Análise da presença de genes de resistência a antimicrobianos

As amostras de água foram concentradas e o DNA total das mesmas foi extraído; analisando-se a presença dos genes *bla*_{CTX-M-like}, *bla*_{GES-like}, *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-51}, *bla*_{SHV-like}, *bla*_{TEM-like}, *bla*_{SPM-1}, *bla*_Z, *mecA*, *tetA*, *tetB*, 5'CS/3'CS (amplificam genes de segmentos conservados de integrons de classe I), *acrA*, *acrB*, *tolC*, *adeB*, *adeR*, *adeS*, *mexB*, *mexD*, *mexF* e *mexY*. Os procedimentos adotados encontram-se descritos no **subitem 4.6** do Material e métodos (corpo da Tese).

Sequenciamento através da plataforma Ion PGM

A purificação dos produtos de PCR obtidos, a preparação das bibliotecas genômicas e a análise das sequências foram desenvolvidas conforme descrito no **subitem 4.7** do Material e métodos (corpo da Tese).

Resultados

Apesar das atividades antrópicas desenvolvida nos arredores da Laguna, não foram detectados nas amostras níveis de antimicrobianos acima de 400 ng.L⁻¹, o que não exclui a possibilidade de níveis abaixo deste limiar estarem presentes. Os genes *bla*_{GES-like}, *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_Z, *acrA*, *mexB*, *mexD* *mexF* e genes de segmentos de integrons de classe I (5'CS/3'CS) foram confirmados em todas as amostras por PCR convencional (**Tabela 4.1**). Os genes *acrB*, *tolC*, *adeB*, *adeR*, *adeS* e *mexY* foram encontrados de modo isolado, em algum dos pontos da Laguna (**Tabela 4.1**). Os genes *bla*_{CTX-M-like}, *bla*_{OXA-51}, *bla*_{SHV-like}, *bla*_{SPM-1}, *bla*_{TEM-like} e *mecA* não foram encontrados nas amostras.

Tabela 4.1. Presença dos genes pesquisados nas amostras de diferentes pontos da Laguna.

Gene	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4
<i>bla</i> _{GES-like}	+	+	+	+
<i>bla</i> _{OXA-23-like}	+	+	+	+
<i>bla</i> _Z	+	+	+	+
<i>tetA</i>	-	-	+	+
<i>tetB</i>	+	-	+	+
5'CS/3'CS	+	+	+	+
<i>acrA</i>	+	+	+	+
<i>acrB</i>	+	-	-	-
<i>tolC</i>	-	+	+	+
<i>adeB</i>	+	-	+	+
<i>adeR</i>	+	-	-	-
<i>adeS</i>	+	-	-	-
<i>mexB</i>	+	+	+	+
<i>mexD</i>	+	+	+	+
<i>mexF</i>	+	+	+	+
<i>mexY</i>	+	-	-	-

O sequenciamento a partir dos amplicons obtidos geraram 578.058 *reads* (69.749 oriundas do Ponto 1; 310.257 do Ponto 2; 41.249 do Ponto 3; e 156.803 do Ponto 4). Após o processamento, originaram-se 3.825 *contigs* com tamanho maior ou igual a 150 pares de bases (840 oriundos do Ponto 1; 1.363 do Ponto 2; 651 do Ponto 3; e 971 do Ponto 4), os quais foram manualmente analisados nas bases CARD e INTEGRALL.

Tabela 4.2. Genes de resistência encontrados nas águas da Laguna.

Gene	Família	Fenótipo predito	Ponto
Mecanismo: alteração do antimicrobiano			
<i>aad(6')</i> **	Transferase	Aminoglicosídeos	1, 4
<i>aac(2')</i> -Ia			3
<i>bla</i> _{KPC-15}	β-lactamase classe A	Penêmicos, cefalosporinas, monobactam	3
<i>bla</i> _{OXY-2}			3
<i>bla</i> _{GES} **	β-lactamase classe A		1, 4
<i>bla</i> _{GES-16} **			2
<i>bla</i> _{OXA-62}		Penêmicos, cefalosporinas	4
<i>bla</i> _{OXA-85}	β-lactamase classe D		2, 4
<i>bla</i> _{OXA-398}			1
<i>bla</i> _Z	β-lactamase classe A	Penêmicos	3
Mecanismo: alteração do alvo na célula			
<i>gyr</i> (A e B) *	DNA girase	Fluoroquinolonas	1, 3
<i>parE</i>	Topoisomerase		4
<i>uhpT</i>	Proteína de transporte	Fosfomicina	1
<i>tuf</i> *	Fator de elongação	Elfamicina	3
<i>cfr</i>	Metiltransferase	Macrolídeos e lincosamidas	3
<i>erm</i>			4
<i>mprF</i>	Defensina		1, 2
<i>rpoC</i> *	RNA polimerase	Antibióticos peptídicos	2
<i>vanN</i>	Ligase		4
Mecanismo: efluxo do antimicrobiano			
<i>abcA</i>	“ATP binding cassette” (ABC)	Cefalosporinas, penêmicos, antibióticos peptídicos	1
<i>macA</i>	“Major facilitator superfamily” (MFS)	Macrolídeos	4
<i>lrfA</i>		Fluoroquinolonas	1, 2, 3
<i>tetC</i>		Tetraciclina	3
<i>smeE</i>	“Resistance-nodulation-division” (RND)	Fluoroquinolonas, fenicóis macrolídeos, tetraciclina	1
<i>oprA</i>		Fluoroquinolonas, macrolídeos, tetraciclina, carbapenêmicos, aminoglicosídeos	1, 3
<i>mdsA</i>		Fenicóis, cefamicina, penêmicos, cefalosporinas, monobactâmicos	1
<i>cmeC</i>		Fluoroquinolonas, macrolídeos, cefalosporinas	2
<i>smeB</i>		Cefamicina, cefalosporinas, penêmicos, aminoglicosídeos.	2
<i>muxB</i>		Macrolídeos, monobactâmicos, tetraciclina, aminocumarina.	3
<i>qacEΔ1</i> **	“Small multidrug resistance” (SMR)	Antissépticos contendo quaternário de amônio	4

* Alinhamentos acima de 50 pares de base. ** Elementos inseridos em integrons de classe I. Alinhamentos acima de 50 pares de base, na base de dados *INTEGRALL*.

O alinhamento dos fragmentos com os bancos de dados consultados revelou a presença de 31 genes associados à resistência, os quais podem atuar tanto inativando ($n= 10$) quanto modificando o alvo de ligação do antimicrobiano ($n= 10$) ou removendo-o das células ($n= 11$) (**Tabela 4.2**). Observaram-se 11 genes nas amostras do Ponto 1; 7 genes nas amostras do Ponto 2; 12 genes nas amostras do Ponto 3; e 9 genes nas amostras do Ponto 4 (**Tabela 4.2**). Em toda a extensão da Laguna há potencial para a manifestação de resistência a aminoglicosídeos, penêmicos, cefalosporinas, fluoroquinolonas e macrolídeos (**Tabela 4.2**). Enquanto determinantes de resistência a monobactâmicos e tetraciclinas, por exemplo, apareceram somente nos Pontos 1 e 3 (**Tabela 4.2**).

Discussão

O presente estudo visou aplicar a plataforma de sequenciamento de alto desempenho *Ion Torrent* à caracterização do resistoma de amostras de água superficial de uma laguna costeira. Utilizou-se esta plataforma devido à disponibilidade da tecnologia, por gerar dados comparáveis aos de outras plataformas e por representar uma solução de alto rendimento, adaptável às metas do estudo, e de baixo custo comparada a outras plataformas (Rothberg et al., 2011).

Observaram-se determinantes de resistência em todos os pontos analisados (**Tabela 4.1**, **Tabela 4.2**). Apesar de assumirem papéis diversos no metabolismo, a superexpressão de sistemas de efluxo também contribui com a resistência a diferentes tipos de antimicrobianos. Embora não tenhamos avaliado a expressão destes genes, a presença dos genes de sistemas de efluxo foi contemplada por representar um risco em potencial à manutenção da resistência nas comunidades microbianas nativas (Li et al., 2015 b).

O uso de oligonucleotídeos direcionados à amplificação de regiões variáveis do genoma, tal como 5'CS-3'CS (Lévesque et al., 1995), pode favorecer o aparecimento de genes diversos, para os quais não foram utilizados oligonucleotídeos específicos. Contudo, os genes só foram confirmados como pertencentes a integrons quando identificados através da base INTEGRALL.

A abordagem utilizada teve como principal limitação o tamanho reduzido dos *contigs* montados (maioria entre 150 e 200 pb) e o baixo percentual de

nucleotídeos alinhados com os dados das bases acessadas (a maior parte dos alinhamentos foi inferior a 50 pb). Valores estes consideravelmente menores do que os recomendados por estudos similares que utilizaram o sistema *Illumina* (Zhang et al. 2011; Ma et al., 2014), o qual é reconhecido pela capacidade de gerar fragmentos maiores e por apresentar um rendimento superior ao *Ion Torrent* (Goodwin et al., 2016). Atualmente, a geração de dados por sequenciamentos de alto desempenho tem uma taxa muito inferior a alimentação dos bancos de dados, devido a dificuldade e demora nas análises. Além da limitação do tamanho dos *contigs*, sugere-se que parte dos problemas de identificação seja atribuída a falta de dados sobre resistoma de ecossistemas aquáticos.

Seguindo os limiares adotados pelos estudos conduzidos no *Illumina*, apenas 22.58% dos genes (7/31) teriam alinhamentos satisfatórios à validação das identificações: *aad(6')* (adeniltransferase); *bla_{GES}* e *bla_{GES-16}* (carbapenemases); mutações em *gyrA* e *gyrB* (DNA girase) que conferem resistência a fluoroquinolonas, mutação em *Ef-Tu* (fator de alongação) que confere resistência à elfamicina, mutação em *rpoC* (subunidade da RNA polimerase) que confere resistência à daptomicina; e *qacEΔ1*, proteína de efluxo de múltiplas drogas, principalmente compostos contendo quaternário de amônio (**Tabela 4.2**).

A resistência oriunda de mutações nos genes *gyrA* e *gyrB* já foi detectada em cursos d'água de diversos países (Vredenburg et al., 2014; Johnning et al., 2015), inclusive no Brasil (Conte et al., 2017). As mutações nos genes *tuf* e *rpoC* ou mesmo o fenótipo resistente que estas mutações originam não têm sido registrados no Brasil. Entretanto, a variante do gene *tuf* tem sido encontrada em sistemas de tratamento de água (McCall et al., 2016) e a variante de *rpoC* em isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* metilicina resistentes (MRSA) (Gómez et al., 2017 a). Uma vez selecionados, dependendo do contexto ambiental, estes genes podem vir a ter um impacto negativo sobre o sistema de saúde local. O registro prévio destas variantes possibilita o desenvolvimento de estratégias que visem a prevenir ou mitigar um problema futuro.

Os genes *aad(6')*, *bla_{GES}*, *bla_{GES-16}* e *qacEΔ1* destacaram-se principalmente por estarem associados a integrons de classe I (**Tabela 4.2**). Estes elementos parecem ser mais frequentes nos Pontos 1 e 4, caracterizados respectivamente pela ocupação urbana e por áreas de agricultura. Uma vez que

integrans facilitam o transporte de genes entre bactérias em condições de estresse ambiental, sendo relacionados a ecossistemas impactados por atividades antrópicas (Gillings et al., 2015), sugere-se que tanto a urbanização quanto a agricultura são atividades que influenciam a distribuição de genes de resistência na Laguna. Estes genes associados a integrans têm sido reportados na costa da região sudeste do Brasil (de Araujo et al., 2016; Paschoal et al., 2017).

Entre os resultados obtidos através de alinhamentos curtos (inferiores a 50 pb), destacaram-se os genes codificantes de β -lactamases *bla*_{KPC}, *bla*_{OXY}, *bla*_{OXA} e *bla*_Z (principalmente nos Pontos 3 e 4) (**Tabela 4.2**). Os genes *bla*_{KPC} e *bla*_{OXA} têm sido relatados em praias brasileiras (de Araujo et al., 2016; Paschoal et al., 2017), porém *bla*_{OXY} e *bla*_Z, apesar de serem descritos em ambientes aquáticos de outras localidades (Zhang et al., 2015; Gómez et al., 2017 b), ainda são retratados apenas sob o viés clínico no Brasil (Ferreira et al., 2011; Ferreira et al., 2017). Observou-se o mesmo para outros genes tais como, por exemplo, *van* (determinante de resistência à vancomicina) (**Tabela 4.2**), que é reportado em amostras de água em outros países (Zhang et al., 2009), porém no Brasil as informações sobre sua ocorrência restringem-se ao ambiente hospitalar (Silveira et al., 2015).

As amostras avaliadas foram isentas de quantidades detectáveis de antimicrobianos. Sabe-se que mesmo baixas concentrações podem contribuir para a seleção do fenótipo resistente em populações naturais (Aminov, 2009). Os antimicrobianos raramente ocorrem em concentrações letais fora do contexto clínico, especialmente em ambientes aquáticos (altamente diluídos). Concentrações de antimicrobianos inferiores a 400 ng.L⁻¹ vêm sendo reportadas no meio aquático por meio de outras técnicas de detecção (Kümmerer, 2009), levantando-se a hipótese de que é possível que quantidades menores destes compostos estejam presentes na área da Laguna.

O presente estudo encontrou nas amostras da Laguna algumas variantes de genes reportadas somente no ambiente clínico, evidenciando a necessidade de se realizar mais estudos que utilizem plataformas de sequenciamento de alto desempenho para análise do resistoma de ambientes naturais. Além disso, diversos tipos de bombas de efluxo também foram detectados nas amostras da Laguna (**Tabela 4.2**). O efluxo é um mecanismo comumente associado a linhagens multirresistentes (Piddock, 2006). Considerando-se que as comunidades microbianas nativas possivelmente coexistam com concentrações subinibitórias de

antimicrobianos, abrem-se precedentes para a realização de estudos que avaliam a expressão diferencial de genes de bombas de efluxo nestes ambientes.

A tecnologia *Ion Torrent* tem sido utilizada para representar a diversidade bacteriana de ambientes aquáticos (Shaw et al., 2015; Xiong et al., 2014; Xiong et al., 2015 a, b; Aydin et al., 2016) e menos frequentemente para caracterizar plasmídeos (Li et al., 2015 a) e genomas completos de cepas resistentes (Hendriksen et al., 2013; Daum et al., 2014). Este é o primeiro estudo que testou a aplicação desta plataforma de sequenciamento à análise de genes de resistência a partir do *pool* de genes do ambiente aquático. Poderiam ser testados outros protocolos e validadas outras repetições, em diferentes localidades e ambientes a fim de aprimorar o desempenho da técnica para este tipo de abordagem. Estudos como este possibilitam avaliar uma grande quantidade de informações sobre as comunidades nativas e revelam até mesmo genes que têm sido detectados exclusivamente no contexto clínico, um sinal de que ainda há muito a ser pesquisado nestes ambientes.

Conclusão

A plataforma *Ion Torrent* foi empregada na identificação de diferentes tipos de genes de resistência presentes nas águas superficiais de uma Laguna costeira. Verificou-se que mesmo na ausência de concentrações detectáveis de antimicrobianos, genes de resistência apresentaram uma distribuição uniforme nos quatro pontos de coleta, cuja característica são os diferentes graus de impacto antrópico. Também foi observada a presença de genes inseridos em integrons de classe I, o que parece estar associado à pressão de atividades antrópicas no entorno da Laguna e sugere que estes genes se propaguem com mais facilidade que outros em situação de desequilíbrio ambiental. Além disso, a detecção de genes ou mutações que conferem resistência que ainda não foram reportados no Brasil ou estão restritos ao meio clínico indica a necessidade de ampliar a utilização de ferramentas robustas de sequenciamento para avaliar ambientes aquáticos. Ainda que com algumas limitações, esta metodologia representa uma alternativa mais acessível em sequenciamento de alto desempenho e deve ser aperfeiçoada por estudos futuros.

Referências

1. Aminov, R. I. (2009). The role of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Environmental microbiology*, 11(12), 2970-2988.
2. Aydin, S., Ince, B., & Ince, O. (2016). Assessment of anaerobic bacterial diversity and its effects on anaerobic system stability and the occurrence of antibiotic resistance genes. *Bioresource technology*, 207, 332-338.
3. Beheshti, M., Talebi, M., Ardebili, A., Bahador, A., & Lari, A. R. (2014). Detection of AdeABC efflux pump genes in tetracycline-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from burn and ventilator-associated pneumonia patients. *Journal of pharmacy & bioallied sciences*, 6(4), 229.
4. Blair, J. M., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O., & Piddock, L. J. (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 13(1), 42.
5. Canal, N., Meneghetti, K. L., Almeida, C. P. D., Bastos, M. D. R., Otton, L. M., & Corção, G. (2016). Characterization of the variable region in the class 1 integron of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* isolated from surface water. *Brazilian journal of microbiology*, 47(2), 337-344.
6. Conte, D., Palmeiro, J. K., da Silva Nogueira, K., de Lima, T. M. R., Cardoso, M. A., Pontarolo, R., ... & Dalla-Costa, L. M. (2017). Characterization of CTX-M enzymes, quinolone resistance determinants, and antimicrobial residues from hospital sewage, wastewater treatment plant, and river water. *Ecotoxicology and environmental safety*, 136, 62-69.
7. Coordinators, N. R. (2016). Database resources of the national center for biotechnology information. *Nucleic acids research*, 44(Database issue), D7.
8. De Araujo, C. F. M., Silva, D. M., Carneiro, M. T., Ribeiro, S., Fontana-Maurell, M., Alvarez, P., ... & Carvalho-Assef, A. P. D. A. (2016). Detection of carbapenemase genes in aquatic environments in Rio de Janeiro, Brazil. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 60(7), 4380-4383.
9. Daum, L. T., Fischer, G. W., Sromek, J., Khubbar, M., Hunter, P., Gradus, M. S., & Bhattacharyya, S. (2014). Characterization of multi-drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* from immigrants residing in the USA using Ion Torrent full-gene sequencing. *Epidemiology & Infection*, 142(6), 1328-1333.

10. Ferreira, C. M., Ferreira, W. A., Almeida, N. C. O. D. S., Naveca, F. G., & Barbosa, M. D. G. V. (2011). Extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria isolated from hematologic patients in Manaus, State of Amazonas, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42(3), 1076-1084.
11. Ferreira, A. M., Martins, K. B., Silva, V. R. D., Mondelli, A. L., & Cunha, M. D. L. R. D. (2017). Correlation of phenotypic tests with the presence of the bla_Z gene for detection of beta-lactamase. *Brazilian Journal of Microbiology*, 48(1), 159-166.
12. Fuentefria, D. B., Ferreira, A. E., Gräf, T., & Corção, G. (2009). Spread of Metallo- β -lactamases: screening reveals the presence of a BLA SPM-1 gene in hospital sewage in southern Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40(1), 82-85.
13. Gillings, M. R., Gaze, W. H., Pruden, A., Smalla, K., Tiedje, J. M., & Zhu, Y. G. (2015). Using the class 1 integron-integrase gene as a proxy for anthropogenic pollution. *The ISME journal*, 9(6), 1269.
14. Gómez, N. C., Siller, M. R., & Muñoz, J. B. (2017 a). Mechanisms of resistance to daptomycin in *Staphylococcus aureus*. *Revista española de quimioterapia: publicación oficial de la Sociedad Española de Quimioterapia*.
15. Gómez, P., Casado, C., Sáenz, Y., Ruiz-Ripa, L., Estepa, V., Zarazaga, M., & Torres, C. (2017 b). Diversity of species and antimicrobial resistance determinants of staphylococci in superficial waters in Spain. *FEMS microbiology ecology*, 93(1).
16. Goodwin, S., McPherson, J. D., & McCombie, W. R. (2016). Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nature Reviews Genetics*, 17(6), 333.
17. Hendriksen, R. S., Joensen, K. G., Lukwesa-Musyani, C., Kalondaa, A., Leekitcharoenphon, P., Nakazwe, R., ... & Mwansa, J. C. (2013). Extremely drug-resistant *Salmonella enterica* serovar Senftenberg infections in patients in Zambia. *Journal of clinical microbiology*, 51(1), 284-286.
18. Huyghebaert, G., Ducatelle, R., & Van Immerseel, F. (2011). An update on alternatives to antimicrobial growth promoters for broilers. *The Veterinary Journal*, 187(2), 182-188.
19. Jank, L., Hoff, R. B., Costa, F. J. D., & Pizzolato, T. M. (2014). Simultaneous determination of eight antibiotics from distinct classes in surface and wastewater

samples by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography–electrospray ionisation mass spectrometry. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 94(10), 1013-1037.

20. Jeong, S. H., Bae, I. K., Park, K. O., An, Y. J., Sohn, S. G., Jang, S. J., ... & Lee, S. H. (2006). Outbreaks of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing carbapenemases in Korea. *The Journal of Microbiology*, 44(4), 423-431.
21. Jia, B., Raphenya, A. R., Alcock, B., Waglechner, N., Guo, P., Tsang, K. K., ... & Doshi, S. (2016). CARD 2017: expansion and model-centric curation of the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic acids research*, gkw1004.
22. Johnning, A., Kristiansson, E., Fick, J., Weijdegård, B., & Larsson, D. G. (2015). Resistance mutations in *gyrA* and *parC* are common in *Escherichia* communities of both fluoroquinolone-polluted and uncontaminated aquatic environments. *Frontiers in microbiology*, 6, 1355.
23. Kondo, Y., Ito, T., Ma, X. X., Watanabe, S., Kreiswirth, B. N., Etienne, J., & Hiramatsu, K. (2007). Combination of multiplex PCRs for staphylococcal cassette chromosome *mec* type assignment: rapid identification system for *mec*, *ccr*, and major differences in junkyard regions. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 51(1), 264-274.
24. Kümmerer, K. (2009). Antibiotics in the aquatic environment – a review –part I. *Chemosphere*, 75(4), 417-434.
25. Lentz, S. A., de Lima-Morales, D., Cuppertino, V. M., de S Nunes, L., da Motta, A. S., Zavascki, A. P., ... & Martins, A. F. (2016). Letter to the editor: *Escherichia coli* harbouring *mcr-1* gene isolated from poultry not exposed to polymyxins in Brazil. *Eurosurveillance*, 21 (26).
26. Levesque, C., Piche, L., Larose, C., & Roy, P. H. (1995). PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 39(1), 185-191.
27. Li, G., Zhang, Y., Bi, D., Shen, P., Ai, F., Liu, H., ... & Ou, H. Y. (2015 a). First report of a clinical, multidrug-resistant Enterobacteriaceae isolate coharboring fosfomicin resistance gene *fosA3* and carbapenemase gene *blaKPC-2* on the same transposon, Tn1721. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 59(1), 338-343.

28. Li, B., Yang, Y., Ma, L., Ju, F., Guo, F., Tiedje, J. M., & Zhang, T. (2015 b). Metagenomic and network analysis reveal wide distribution and co-occurrence of environmental antibiotic resistance genes. *The ISME journal*, 9(11), 2490.
29. Liu, B., & Pop, M. (2008). ARDB — antibiotic resistance genes database. *Nucleic acids research*, 37(suppl_1), D443-D447.
30. Ma, L., Li, B., & Zhang, T. (2014). Abundant rifampin resistance genes and significant correlations of antibiotic resistance genes and plasmids in various environments revealed by metagenomic analysis. *Applied microbiology and biotechnology*, 98(11), 5195-5204.
31. McArthur, A. G., Waglechner, N., Nizam, F., Yan, A., Azad, M. A., Baylay, A. J., ... & Kalan, L. (2013). The comprehensive antibiotic resistance database. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 57(7), 3348-3357..
32. McCall, C., Munir, M., Marsh, T., & Xagorarakis, I. (2016). *Metagenomic Analysis of Antibiotic Resistant Genes in a Conventional and Membrane Bioreactor Wastewater Treatment Plant*. Michigan State University, Environmental Engineering.
33. Ng, L. K., Martin, I., Alfa, M., & Mulvey, M. (2001). Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes. *Molecular and cellular probes*, 15(4), 209-215.
34. Oh, H., Stenhoff, J., Jalal, S., & Wretling, B. (2003). Role of efflux pumps and mutations in genes for topoisomerases II and IV in fluoroquinolone-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Microbial Drug Resistance*, 9(4), 323-328.
35. Piddock, L. J. (2006). Multidrug-resistance efflux pumps? not just for resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 4(8), 629.
36. Poirel, L., Naas, T., Le Thomas, I., Karim, A., Bingen, E., & Nordmann, P. (2001). CTX-M-type extended-spectrum β -lactamase that hydrolyzes ceftazidime through a single amino acid substitution in the omega loop. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(12), 3355-3361.
37. Naas, T., Oueslati, S., Bonnin, R. A., Dabos, M. L., Zavala, A., Dortet, L., ... & Iorga, B. I. (2017). Beta-lactamase database (BLDB)—structure and function. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 32(1), 917-919.
38. Olsen, J. E., Christensen, H., & Aarestrup, F. M. (2006). Diversity and evolution of blaZ from *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57(3), 450-460.

39. Paschoal, R. P., Campana, E. H., Corrêa, L. L., Montezzi, L. F., Barrueto, L. R., da Silva, I. R., ... & Picão, R. C. (2017). Concentration and variety of carbapenemase producers in recreational coastal waters showing distinct levels of pollution. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 61(12), e01963-17.
40. Rolain, J. M. (2013). Food and human gut as reservoirs of transferable antibiotic resistance encoding genes. *Frontiers in microbiology*, 4, 173.
41. Rothberg, J. M., Hinz, W., Rearick, T. M., Schultz, J., Mileski, W., Davey, M., ... & Hoon, J. (2011). An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature*, 475(7356), 348.
42. Schmieder, R., & Edwards, R. (2012). Insights into antibiotic resistance through metagenomic approaches. *Future microbiology*, 7(1), 73-89.
43. Silveira, A. C. D. O., Cunha, G. R. D., Caierão, J., Cordova, C. M. M. D., & d'Azevedo, P. A. (2015). Molecular epidemiology of heteroresistant vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in Brazil. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 19(5), 466-472.
44. Shaw, J. L., Monis, P., Weyrich, L. S., Sawade, E., Drikas, M., & Cooper, A. J. (2015). Using amplicon sequencing to characterize and monitor bacterial diversity in drinking water distribution systems. *Applied and environmental microbiology*, 81(18), 6463-6473.
45. Swick, M. C., Morgan-Linnell, S. K., Carlson, K. M., & Zechiedrich, L. (2011). Expression of multidrug efflux pump genes *acrAB-tolC*, *mdfA*, and *norE* in *Escherichia coli* clinical isolates as a function of fluoroquinolone and multidrug resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 55(2), 921-924.
46. Talukdar, P. K., Rahman, M., Rahman, M., Nabi, A., Islam, Z., Hoque, M. M., ... & Islam, M. A. (2013). Antimicrobial resistance, virulence factors and genetic diversity of *Escherichia coli* isolates from household water supply in Dhaka, Bangladesh. *Plos one*, 8(4), e61090.
47. Thomas, T., Gilbert, J., & Meyer, F. (2012). Metagenomics-a guide from sampling to data analysis. *Microbial informatics and experimentation*, 2(1), 3.
48. Vredenburg, J., Varela, A. R., Hasan, B., Bertilsson, S., Olsen, B., Narciso-da-Rocha, C., ... & Manaia, C. M. (2014). Quinolone-resistant *Escherichia coli* isolated from birds of prey in Portugal are genetically distinct from those isolated from water environments and gulls in Portugal, Spain and Sweden. *Environmental microbiology*, 16(4), 995-1004.

49. Woodford, N., Ellington, M. J., Coelho, J. M., Turton, J. F., Ward, M. E., Brown, S., ... & Livermore, D. M. (2006). Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *International journal of antimicrobial agents*, 27(4), 351-353.
50. World Health Organization. (2001). WHO global strategy for containment of antimicrobial resistance.
51. Xavier, D. E., Picão, R. C., Girardello, R., Fehlberg, L. C., & Gales, A. C. (2010). Efflux pumps expression and its association with porin down-regulation and β -lactamase production among *Pseudomonas aeruginosa* causing bloodstream infections in Brazil. *BMC microbiology*, 10(1), 217.
52. Xiong, W., Sun, Y., Ding, X., Zhang, Y., & Zeng, Z. (2014). Antibiotic resistance genes occurrence and bacterial community composition in the Liuxi River. *Frontiers in Environmental Science*, 2, 61.
53. Xiong, W., Sun, Y., Zhang, T., Ding, X., Li, Y., Wang, M., & Zeng, Z. (2015 a). Antibiotics, antibiotic resistance genes, and bacterial community composition in fresh water aquaculture environment in China. *Microbial ecology*, 70(2), 425-432.
54. Xiong, W., Sun, Y., Ding, X., Wang, M., & Zeng, Z. (2015 b). Selective pressure of antibiotics on ARGs and bacterial communities in manure-polluted freshwater-sediment microcosms. *Frontiers in microbiology*, 6, 194.
55. Xue, J., Feng, Y., Wijesinghe, R. U., & Wood, C. (2017). Using Bacteroidales genetic markers to assess fecal pollution sources in coastal waters. *Water and Environment Journal*.
56. Yoneda K, Chikumi H, Murata T, Gotoh N, Yamamoto H, Fujiwara H, Nishino T, Shimizu E: Measurement of *Pseudomonas aeruginosa* multidrug efflux pumps by quantitative real-time polymerase chain reaction. *FEMS Microbiol Lett.* 2005, 243: 125-131. 10.1016/j.femsle.2004.11.048.
57. Zankari, E., Hasman, H., Cosentino, S., Vestergaard, M., Rasmussen, S., Lund, O., ... & Larsen, M. V. (2012). Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 67(11), 2640-2644.
58. Zhang, X. X., Zhang, T., & Fang, H. H. (2009). Antibiotic resistance genes in water environment. *Applied microbiology and biotechnology*, 82(3), 397-414.
59. Zhang, T., Zhang, X. X., & Ye, L. (2011). Plasmid metagenome reveals high levels of antibiotic resistance genes and mobile genetic elements in activated sludge. *PloS one*, 6(10), e26041.

60. Zhang, S. H., Lv, X., Han, B., Gu, X., Wang, P. F., Wang, C., & He, Z. (2015). Prevalence of antibiotic resistance genes in antibiotic-resistant *Escherichia coli* isolates in surface water of Taihu Lake Basin, China. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(15), 11412-11421.

6. DISCUSSÃO GERAL

Os resultados do presente estudo qualificam a Laguna Tramandaí como um reservatório de bactérias resistentes e genes de resistência a antimicrobianos. Estes elementos foram observados em ambas as temporadas e em todos os pontos avaliados, tanto na fração cultivável quanto não cultivável do microbioma. A região sudeste do Brasil concentra a maior parte dos estudos direcionados à análise da resistência em ambientes aquáticos (Nascimento et al., 2014; Montezzi et al., 2015; de Araujo et al., 2016; Paschoal et al., 2017). A representação de outras localidades faz-se importante pois pode levantar novas informações sobre o tema.

As margens da Laguna Tramandaí apresentam paisagens bastante distintas, o que é reflexo das diferentes atividades humanas desenvolvidas nestes locais. Os resultados das análises físico-químicas e biológicas das amostras também refletiram o impacto destas atividades. A quantidade de bactérias cultiváveis resistentes pareceu estar correlacionada à concentração de nutrientes e à quantidade de coliformes termotolerantes, o que vem sendo documentado como efeito da urbanização (Wang et al. 2016; Garbossa et al., 2017; Yang et al. 2017). Entretanto, a carga de bactérias resistentes foi equivalente à carga de bactérias totais mesmo em pontos não urbanizados da Laguna, principalmente na baixa temporada.

Os antimicrobianos raramente ocorrem em concentrações letais fora do contexto clínico, especialmente em ambientes aquáticos (altamente diluídos) (Kümmerer, 2009). As amostras avaliadas foram isentas de quantidades detectáveis de antimicrobianos. O fungicida Triciclazol e os inseticidas Tiametoxan e Propoxur foram detectados em todos os pontos. Sabe-se que mesmo concentrações subinibitórias de antimicrobianos podem contribuir para a seleção de genes de resistência em populações naturais, o que também pode ser favorecido por outros poluentes (Aminov, 2009; Kümmerer, 2009; Gullberg et al., 2011). A disseminação de resíduos de pesticidas ao longo de toda a Laguna é atribuída às áreas agrícolas do entorno.

Populações de bactérias resistentes a ácido nalidíxico e tetraciclina foram predominantes. O uso destas classes de antimicrobianos tem destaque na aquicultura (Samuelsen; Bergh, 2004; Harnisz et al., 2011). A resistência à tetraciclina tem sido mais explorada no ambiente aquático (Harnisz et al., 2011;

Young et al., 2013; Harnisz et al., 2015), sendo também atribuída ao impacto da agricultura (Winkworth-Lawrence; Lange, 2016). As tetraciclinas são antimicrobianos de origem natural, enquanto as quinolonas foram sintetizadas com o avanço da indústria de medicamentos. O ácido nalidíxico foi o primeiro antimicrobiano desta classe a ser comercializado e linhagens resistentes rapidamente foram reportadas, o que levou à produção das fluoroquinolonas. Hatosy e Martiny (2015) sugerem que a resistência a antimicrobianos de origem sintética está ligada a poluição de ambientes aquáticos por efluentes contaminados.

O fenótipo resistente à tetraciclina pode estar relacionado a presença dos genes *tetA* e *tetB*. Apesar de haver diversos genes que conferem resistência às tetraciclinas (Ng et al., 2001), estas variantes são as mais bem documentadas em bactérias de ambientes aquáticos (Wang et al., 2013; Adesoji et al. 2015; Stange et al., 2016; Jiang et al., 2017). Estes genes foram mais frequentes em isolados de *E. coli*. No Brasil os genes *tet* não vêm sendo pesquisados em ambientes aquáticos.

A superexpressão de genes *mex* em *Pseudomonas* e do sistema AcrAB-TolC em *Enterobacteriaceae* é capaz de reduzir a suscetibilidade a quinolonas em cepas de origem clínica (Neves et al., 2011; Singh et al., 2012). A atividade destes sistemas de efluxo é raramente reportada em ambientes naturais (Braz et al., 2016; Martins et al. 2018) e pode estar favorecendo o fenótipo resistente à ácido nalidíxico nos isolados da Laguna. Além disso, genes codificantes de sistemas que bombeiam quinolonas (*irfA* e *oprA*, por exemplo) ou alteram seu alvo na célula (*gyrA*, *gyrB* e *parE*) foram identificados por sequenciamento e devem estar beneficiando estas populações resistentes. Os genes atribuídos à resistência a quinolonas foram encontrados em todos os pontos avaliados.

Também foram observadas na área da Laguna, embora em baixa representatividade, populações resistentes a imipenem e ceftazidima, o que é raramente relatado em ambientes naturais (Kittinger et al., 2016). O gene *bla*_{GES-like}, o qual codifica β-lactamases com atividade de carbapenemase, foi encontrado tanto no DNA das amostras de água quanto nos isolados. A análise dos produtos sequenciados identificou a variante *bla*_{GES-16}, a qual tem sido descrita em praias do sudeste brasileiro (de Araujo et al., 2016; Paschoal et al., 2017). O fenótipo resistente à ceftazidima pode ser atribuído ao gene *bla*_{CTX-M}, que apesar de ausente nas amostras de água, foi o gene mais frequente nas espécies isolados. Variantes *bla*_{CTX-M} do grupo 1 foram mais frequentes em *P. aeruginosa*. Genes deste grupo

foram reportados como dominantes em amostras de águas superficiais de rios (Blaak et al., 2015) e de efluente doméstico (Talukdar et al., 2013). Por outro lado, variantes do grupo 9 foram prevalentes em *E. coli*. Estes genes foram relatados em isolados de *Enterobacteriaceae* oriundos de praias do Rio de Janeiro selecionados por exposição a imipinem (Montezzi et al., 2015). Portanto, o fenótipo resistente à imipenem pode ser atribuído à veiculação de *bla*_{GES-like} e de *bla*_{CTX-M}.

Integrans de classe I tem sido indicados como bons marcadores de poluição ambiental, principalmente aquela oriunda de atividades antrópicas (Nardelli et al., 2012; Gillings, 2017; Yang et al., 2017). A abundância de genes associados a estes elementos pode mudar rapidamente em resposta a mudanças ambientais (Cambray et al., 2010). Embora sejam mais estudados em *E. coli* (Kotlarska et al., 2015; Stange et al. 2016), integrans foram principalmente veiculados por isolados de *P. aeruginosa*. A frequência de detecção destes elementos nos isolados da Laguna foi comparável à observada em ambientes clínicos (Fonseca et al., 2005).

Estudos com foco no ambiente aquático geralmente utilizam antimicrobianos para pré-selecionar bactérias resistentes (Montezzi et al., 2015; Zhang et al. 2015; De Oliveira et al., 2017) e costumam analisar apenas representantes de *Enterobacteriaceae* (Talukdar et al., 2013; Blaak et al., 2015; Montezzi et al., 2015). À parte do teste *in vitro* da exposição a antimicrobianos, este estudo priorizou a análise de bactérias capazes de veicular estes genes independente do fenótipo expresso no contexto ambiental. No geral, *P. aeruginosa* foi mais importante para a disseminação dos genes avaliados do que *Enterobacteriaceae* (*E. coli* e *Enterobacter* spp.). *Bacillus* spp., grupo que é pouco pesquisado fora do contexto hospitalar, exibiu os genes *tet*, *bla*_{SHV-like} e *bla*_{TEM-like}. Sugere-se que futuros estudos sobre resistência em ambientes naturais incluam bactérias Gram-positivas em suas análises.

As amostras das zonas urbanizadas na Laguna aparentam ser mais afetadas, porém é evidente que bactérias resistentes e genes de resistência circulam nas áreas não urbanizadas, o que ocorre mesmo na baixa temporada. A tetraciclina, por exemplo, pode permanecer retida em diversos tipos de solo por um longo período de tempo (Kümmerer, 2003). Portanto, as zonas de plantio também podem descarregar antimicrobianos e bactérias resistentes em corpos d'água, o que está condicionado aos padrões de uso da terra e ao regime de chuvas. Como a baixa temporada corresponde a uma época bastante chuvosa na região, assume-se

que as práticas agrícolas influenciam a distribuição de genes de resistência na Laguna neste período.

O período da alta temporada pode representar um incremento populacional de até cinco vezes na área de estudo (Zuanazzi e Bartels, 2016), aumentando também a carga poluidora que é lançada no ambiente. Alguns genes de β -lactamases (*bla*_{CTX-M}, *bla*_{GES-like} e *bla*_{SHV-like}) foram mais frequentes neste período, quando ocorreram de modo mais uniforme em pontos urbanizados e não urbanizados da Laguna. A ocorrência e a diversidade de *bla*_{CTX-M}, por exemplo, tem sido associada a ambientes aquáticos impactados (Tacão et al., 2012; Marávic et al., 2015). Uma vez que menos de 15% do volume de esgoto doméstico produzido nas cidades vizinhas à Laguna é tratado (Prefeitura de Tramandaí, 2013; Prefeitura de Imbé, 2015), os resíduos gerados neste período podem estar influenciando o fluxo de genes de resistência nas populações microbianas.

Algumas variantes de genes reportadas somente no ambiente clínico foram encontradas nas amostras da Laguna. Estudos como estes contribuem para o reconhecimento de corpos d'água enquanto reservatórios naturais de genes de resistência a antibióticos. Independentemente da atividade antrópica da região, estudos sistemáticos e periódicos de determinação de bactérias portadoras destes genes em ambientes naturais é uma importante ferramenta para a prevenção de surtos de superinfecção em ambiente hospitalar ou na saúde pública em geral.

7. CONCLUSÃO

- 7.1 Genes associados a mecanismos de resistência a antimicrobianos e genes de integrons de classe I foram detectados em ambas as temporadas e todos os pontos avaliados da Laguna Tramandaí (tanto em áreas urbanizadas quanto rurais).
- 7.2 As análises físico-químicas e biológicas das amostras refletiram o impacto das atividades desenvolvidas no entorno da Laguna.
- 7.3 A Laguna foi identificada como reservatório dos genes de integrons de classe I (5'-3' CS), *tetA*, *tetB*, *mexB*, *mexD*, *mexY*, *mexF*, *acrA*, *acrB*, *tolC*, *adeB*, *adeR*, *adeS*, *bla_{CTX-M}-like*, *bla_{GES}-like*, *bla_{OXA-23}-like*, *bla_{SHV}-like*, *bla_{SPM-1}*, *bla_{TEM}-like* e *bla_Z*.
- 7.4 Verificou-se que a distribuição destes genes varia de acordo com o grupo taxonômico bacteriano, com a temporada do ano, com as variáveis ambientais bem como com o grau de impacto antrópico existente nos pontos avaliados.

8. REFERÊNCIAS

Abraham, E. P., and Chain, E. 1940. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature* 146, 837.

Adesoji, A.T., Ogunjobi, A.A., Olatoye, I.O. and Douglas, D.R., 2015. Prevalence of tetracycline resistance genes among multi-drug resistant bacteria from selected water distribution systems in southwestern Nigeria. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, 14(1), p.35.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC nº 68, 28 de novembro de 2014. Dispõe sobre a atualização do Anexo I, Lista de Antimicrobianos Registrados na Anvisa, da Resolução – RDC nº 20, de 5 de maio de 2011 e dá outras providências. Diário Oficial da União 2014; 29 de novembro.

Ambler, R.P., Coulson, A.F., Frere, J.M., Ghuysen, J.M., Joris, B., Forsman, M., Levesque, R.C., Tiraby, G. and Waley, S.G., 1991. A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases. *Biochemical Journal*, 276(Pt 1), p.269.

Andrade, L. N., & Darini, A. L. C. 2017. Bacilos gram-negativos produtores de beta-lactamases: que bla bla bla é esse?. *Journal of Infection Control*, 6(1).

Aydin, S., Ince, B. and Ince, O., 2016. Assessment of anaerobic bacterial diversity and its effects on anaerobic system stability and the occurrence of antibiotic resistance genes. *Bioresource technology*, 207, pp.332-338.

Balsalobre, L. C., Dropa, M., de Oliveira, D. E., Lincopan, N., Mamizuka, E. M., Matté, G. R., & Matté, M. H. 2010. Presence of blaTEM-116 gene in environmental isolates of *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas jandaei* from Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41(3), 718-719.

Bazan, J.A., Martin, S.I. and Kaye, K.M., 2009. Newer beta-lactam antibiotics: doripenem, ceftobiprole, ceftaroline, and cefepime. *Infectious Disease Clinics*, 23(4), pp.983-996.

Bentley, D.R., Balasubramanian, S., Swerdlow, H.P., Smith, G.P., Milton, J., Brown, C.G., Hall, K.P., Evers, D.J., Barnes, C.L., Bignell, H.R. and Boutell, J.M., 2008. Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature*, 456(7218), p.53.

Bivián-Castro, E.Y., Lopez, M.G., Pedraza-Reyes, M., Bernes, S. and Mendoza-Díaz, G., 2009. Synthesis, characterization, and biological activity studies

of copper (II) mixed compound with histamine and nalidixic acid. *Bioinorganic chemistry and applications*, 2009.

Blaak, H., Lynch, G., Italiaander, R., Hamidjaja, R.A., Schets, F.M. and de Roda Husman, A.M., 2015. Multidrug-resistant and extended spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in Dutch surface water and wastewater. *PLoS One*, 10(6), p.e0127752.

Bradford, P.A., 2001. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clinical microbiology reviews*, 14(4), 933-951.

Brasil. Ministério da Agricultura. Instrução Normativa nº 26, de 10 julho de 2009. Aprovar o Regulamento Técnico para a Fabricação, o controle de qualidade, a comercialização e o emprego de produtos antimicrobianos de uso veterinário, na forma dos Anexos a presente Instrução Normativa. 2009. Disponível em: <http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis>. Acesso em: 02 abr. 2018.

Bush, K., Jacoby, G.A. and Medeiros, A.A., 1995. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 39(6), p.1211.

Bush, K. and Jacoby, G.A., 2010. Updated functional classification of β -lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 54(3), pp.969-976.

Bhullar, K., Waglechner, N., Pawlowski, A., Koteva, K., Banks, E.D., Johnston, M.D., Barton, H.A. and Wright, G.D., 2012. Antibiotic resistance is prevalent in an isolated cave microbiome. *PloS one*, 7(4), p.e34953.

Cambray, G., Guerout, A.M. and Mazel, D., 2010. Integrons. Annual review of genetics, 44, pp.141-166.

Canal, N., Meneghetti, K. L., Almeida, C. P. D., Bastos, M. D. R., Otton, L. M., Corção, G. 2016. Characterization of the variable region in the class 1 integron of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* isolated from surface water. *Brazilian journal of microbiology*, 47(2), 337-344.

Cantón, R., González-Alba, J.M. and Galán, J.C., 2012. CTX-M enzymes: origin and diffusion. *Frontiers in microbiology*, 3, p.110.

Cergole-Novella, M.C., Pignatari, A.C.C., Castanheira, M. and Guth, B.E.C., 2011. Molecular typing of antimicrobial-resistant Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* strains (STEC) in Brazil. *Research in microbiology*, 162(2), pp.117-123.

Chen, Z., Yu, D., He, S., Ye, H., Zhang, L., Wen, Y., ... Chen, S. 2017. Prevalence of Antibiotic-Resistant *Escherichia coli* in Drinking Water Sources in Hangzhou City. *Frontiers in microbiology*, 8, 1133.

Chopra, I., 2002. New developments in tetracycline antibiotics: glycylicyclines and tetracycline efflux pump inhibitors. *Drug resistance updates*, 5(3-4), pp.119-125.

Chopra, I. and Roberts, M., 2001. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and molecular biology reviews*, 65(2), pp.232-260.

Daum, L.T., Fischer, G.W., Sromek, J., Khubbar, M., Hunter, P., Gradus, M.S. and Bhattacharyya, S., 2014. Characterization of multi-drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* from immigrants residing in the USA using Ion Torrent full-gene sequencing. *Epidemiology & Infection*, 142(6), pp.1328-1333.

Davies, J. and Davies, D., 2010. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and molecular biology reviews*, 74(3), pp.417-433.

D'Costa, V.M., King, C.E., Kalan, L., Morar, M., Sung, W.W., Schwarz, C., Froese, D., Zazula, G., Calmels, F., Debruyne, R. and Golding, G.B., 2011. Antibiotic resistance is ancient. *Nature*, 477(7365), p.457.

de Araujo, C.F.M., Silva, D.M., Carneiro, M.T., Ribeiro, S., Fontana-Maurell, M., Alvarez, P., Asensi, M.D., Zahner, V. and Carvalho-Assef, A.P.D.A., 2016. Detection of carbapenemase genes in aquatic environments in Rio de Janeiro, Brazil. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 60(7), pp.4380-4383.

de Oliveira, D.V., Nunes, L.S., Barth, A.L. and Van Der Sand, S.T., 2017. Genetic Background of β -Lactamases in Enterobacteriaceae Isolates from Environmental Samples. *Microbial ecology*, 74(3), pp.599-607.

Delcour, A. H. 2009. Outer membrane permeability and antibiotic resistance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1794(5), 808-816.

Dunn, G. L. 1982. Ceftizoxime and other third-generation cephalosporins: structure-activity relationships. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 10 (suppl_C), 1-10.

Elsaied, H., Stokes, H.W., Kitamura, K., Kurusu, Y., Kamagata, Y. and Maruyama, A., 2011. Marine integrons containing novel integrase genes, attachment sites, attI, and associated gene cassettes in polluted sediments from Suez and Tokyo

Bays. *The ISME journal*, 5(7), p.1162.

Enright, M.C., Robinson, D.A., Randle, G., Feil, E.J., Grundmann, H. and Spratt, B.G., 2002. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(11), pp.7687-7692.

Farion, S.R., 2007. Litoral do Rio Grande do Sul: rio, lago, lagoa, laguna. *Ágora*, 13(1), pp.167-186.

Fehlberg, L.C., Xavier, D.E., Peraro, P.P., Marra, A.R., Edmond, M.B. and Gales, A.C., 2012. Beta-lactam resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* strains causing bloodstream infections: comparative results between Brazilian and American isolates. *Microbial Drug Resistance*, 18(4), pp.402-407.

Fluit, A. C., & Schmitz, F. J. 2004. Resistance integrons and super-integrons. *Clinical Microbiology and Infection*, 10(4), 272-288.

Fontes, L.C., Neves, P.R., Oliveira, S., Silva, K.C., Hachich, E.M., Sato, M.I. and Lincopan, N., 2011. Isolation of *Pseudomonas aeruginosa* coproducing metallo- β -lactamase SPM-1 and 16S rRNA methylase RmtD1 in an urban river. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 55(6), pp.3063-3064.

Gaze, W.H., Abdousslam, N., Hawkey, P.M. and Wellington, E.M.H., 2005. Incidence of class 1 integrons in a quaternary ammonium compound-polluted environment. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49(5), pp.1802-1807. Gaze et al., 2011;

George, A.M. and Levy, S.B., 1983. Gene in the major cotransduction gap of the *Escherichia coli* K-12 linkage map required for the expression of chromosomal resistance to tetracycline and other antibiotics. *Journal of bacteriology*, 155(2), pp.541-548.

Giraud, E., Baucheron, S. and Cloeckert, A., 2006. Resistance to fluoroquinolones in *Salmonella*: emerging mechanisms and resistance prevention strategies. *Microbes and Infection*, 8(7), pp.1937-1944.

Gillings, M.R., Krishnan, S., Worden, P.J. and Hardwick, S.A., 2008. Recovery of diverse genes for class 1 integron-integrases from environmental DNA samples. *FEMS microbiology letters*, 287(1), pp.56-62.

Gillings, M. R., Gaze, W. H., Pruden, A., Smalla, K., Tiedje, J. M., & Zhu, Y. G. (2015). Using the class 1 integron-integrase gene as a proxy for anthropogenic pollution. *The ISME journal*, 9(6), 1269.

Goldstein, C., Lee, M.D., Sanchez, S., Hudson, C., Phillips, B., Register, B., Grady, M., Liebert, C., Summers, A.O., White, D.G. and Maurer, J.J., 2001. Incidence of class 1 and 2 integrases in clinical and commensal bacteria from livestock, companion animals, and exotics. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 45(3), pp.723-726.

Guimarães, D.O., Momesso, L.D.S. and Pupo, M.T., 2010. Antibiotics: therapeutic importance and perspectives for the discovery and development of new agents. *Química Nova*, 33(3), pp.667-679.

Gullberg, E., Cao, S., Berg, O.G., Ilbäck, C., Sandegren, L., Hughes, D. and Andersson, D.I., 2011. Selection of resistant bacteria at very low antibiotic concentrations. *PLoS pathogens*, 7(7), p.e1002158.

Guyomard-Rabenirina, S., Dartron, C., Falord, M., Sadikalay, S., Ducat, C., Richard, V., ... & Talarmin, A. (2017). Resistance to antimicrobial drugs in different surface waters and wastewaters of Guadeloupe. *PloS one*, 12(3), e0173155.

Hall, R.M., 2012. Integrons and gene cassettes: hotspots of diversity in bacterial genomes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1267(1), pp.71-78.

Hardwick, S.A., Stokes, H.W., Findlay, S., Taylor, M. and Gillings, M.R., 2007. Quantification of class 1 integron abundance in natural environments using real-time quantitative PCR. *FEMS microbiology letters*, 278(2), pp.207-212.

Harnisz, M., Gołaś, I. and Pietruk, M., 2011. Tetracycline-resistant bacteria as indicators of antimicrobial resistance in protected waters—The example of the Drwęca River Nature Reserve (Poland). *Ecological indicators*, 11(2), pp.663-668.

Hendriksen, R.S., Joensen, K.G., Lukwesa-Musyani, C., Kalondaa, A., Leekitcharoenphon, P., Nakazwe, R., Aarestrup, F.M., Hasman, H. and Mwansa, J.C., 2013. Extremely drug-resistant *Salmonella enterica* serovar Senftenberg infections in patients in Zambia. *Journal of clinical microbiology*, 51(1), pp.284-286.

Hopkins, K.L., Davies, R.H. and Threlfall, E.J., 2005. Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella*: recent developments. *International journal of antimicrobial agents*, 25(5), pp.358-373.

Henriques, I., Moura, A., Alves, A., Saavedra, M. J., and Correia, A. 2006. Analysing diversity among β -lactamase encoding genes in aquatic environments. *FEMS microbiology ecology*, 56(3), 418-429.

Hugenholtz, P. (2002). Exploring prokaryotic diversity in the genomic era. *Genome biology*, 3(2), reviews0003-1.

Jacoby, G.A., 2009. AmpC β -lactamases. *Clinical microbiology reviews*, 22(1), pp.161-182.

Ji, Y., Xu, Y., Zhang, Q., Tsui, K.W., Yuan, Y., Norris Jr, C., Liang, S. and Liang, H., 2011. BM-Map: bayesian mapping of multireads for next-generation sequencing data. *Biometrics*, 67(4), pp.1215-1224.

Jones, C.H. and Petersen, P.J., 2006. Tigecycline: First class glycylicycline: a new choice for empiric therapy. *Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies*, 3(2), pp.137-144.

Kamanavalli, C.M. and Ninnekar, H.Z., 2000. Biodegradation of propoxur by *Pseudomonas* species. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16(4), pp.329-331.

Kang, S.G., Lee, D.Y., Shin, S.J., Ahn, J.M. and Yoo, H.S., 2005. Changes in patterns of antimicrobial susceptibility and class 1 integron carriage among *Escherichia coli* isolates. *Journal of veterinary science*, 6(3), pp.201-205.

Kitzis, M.D., Billot-Klein, D., Goldstein, F.W., Williamson, R., Van Nhieu, G.T., Carlet, J., Acar, J.F. and Gutmann, L., 1988. Dissemination of the novel plasmid-mediated beta-lactamase CTX-1, which confers resistance to broad-spectrum cephalosporins, and its inhibition by beta-lactamase inhibitors. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 32(1), pp.9-14.

Kliebe, C., Nies, B.A., Meyer, J.F., Tolxdorff-Neutzling, R.M. and Wiedemann, B., 1985. Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 28(2), pp. 302-307.

Koczura, R., Mokracka, J., Taraszewska, A. and Łopacinska, N., 2016. Abundance of class 1 integron-integrase and sulfonamide resistance genes in river water and sediment is affected by anthropogenic pressure and environmental factors. *Microbial ecology*, 72(4), pp.909-916.

Koenig, J.E., Sharp, C., Dlutek, M., Curtis, B., Joss, M., Boucher, Y. and Doolittle, W.F., 2009. Integron gene cassettes and degradation of compounds associated with industrial waste: the case of the Sydney tar ponds. *PloS one*, 4(4), p.e5276

Kohanski, M.A., Dwyer, D.J. and Collins, J.J., 2010. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nature Reviews Microbiology*, 8(6), p.423.

Kotlarska, E., Łuczkiwicz, A., Pisowacka, M. and Burzyński, A., 2015. Antibiotic resistance and prevalence of class 1 and 2 integrons in *Escherichia coli* isolated from two wastewater treatment plants, and their receiving waters (Gulf of Gdansk, Baltic Sea, Poland). *Environmental Science and Pollution Research*, 22(3), pp.2018-2030.

Kristiansson, E., Fick, J., Janzon, A., Grabic, R., Rutgersson, C., Weijdegård, B., Söderström, H. and Larsson, D.J., 2011. Pyrosequencing of antibiotic-contaminated river sediments reveals high levels of resistance and gene transfer elements. *PloS one*, 6(2), p.e17038.

Kümmerer, K., 2003. Significance of antibiotics in the environment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52(1), pp.5-7.

Kümmerer, K., 2009. Antibiotics in the aquatic environment—a review—part I. *Chemosphere*, 75(4), pp.417-434.

Li, G., Zhang, Y., Bi, D., Shen, P., Ai, F., Liu, H., Tian, Y., Ma, Y., Wang, B., Rajakumar, K. and Ou, H.Y., 2015. First report of a clinical, multidrug-resistant Enterobacteriaceae isolate coharboring fosfomycin resistance gene *fosA3* and carbapenemase gene *blaKPC-2* on the same transposon, Tn1721. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 59(1), pp.338-343.

Liu, Y.Y., Wang, Y., Walsh, T.R., Yi, L.X., Zhang, R., Spencer, J., Doi, Y., Tian, G., Dong, B., Huang, X. and Yu, L.F., 2016. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *The Lancet infectious diseases*, 16(2), pp.161-168.

Lupo, A., Coyne, S. and Berendonk, T.U., 2012. Origin and evolution of antibiotic resistance: the common mechanisms of emergence and spread in water bodies. *Frontiers in microbiology*, 3, p.18.

McMurry, L., Petrucci, R.E. and Levy, S.B., 1980. Active efflux of tetracycline encoded by four genetically different tetracycline resistance determinants in *Escherichia coli*. *Proceedings of the national academy of sciences*, 77(7), pp.3974-3977.

Ma, L., Li, B., & Zhang, T. (2014). Abundant rifampin resistance genes and significant correlations of antibiotic resistance genes and plasmids in various environments revealed by metagenomic analysis. *Applied microbiology and biotechnology*, 98(11), 5195-5204.

Mardis, E.R., 2008. The impact of next-generation sequencing technology on genetics. *Trends in genetics*, 24(3), pp.133-141.

Martins, R.G., Martins, M.B.G., Silva, J.M., Pereira, M.A. and Appezzato-da-Glória, B., 2012. Thiamethoxam on the histological characteristics of sugarcane young roots. *Ciência Rural*, 42(11), pp.1936-1940.

Martins, W.M., Narciso, A.C., Cayô, R., Santos, S.V., Fehlberg, L.C., Ramos, P.L., da Cruz, J.B. and Gales, A.C., 2018. SPM-1-producing *Pseudomonas aeruginosa* ST277 clone recovered from microbiota of migratory birds. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 90(3), pp.221-227.

Mehta, D., & Sharma, A. K. 2016. Cephalosporins: A review on imperative class of antibiotics. *Inventi Rapid: Molecular Pharmacology*, 1, 1-6.

Metzker, M.L., 2010. Sequencing technologies—the next generation. *Nature reviews genetics*, 11(1), p.31. (Moreira et al., 2009;, 2016;

Montezzi, L.F., Campana, E.H., Corrêa, L.L., Justo, L.H., Paschoal, R.P., da Silva, I.L.V.D., Souza, M.D.C.M., Drolshagen, M. and Picão, R.C., 2015. Occurrence of carbapenemase-producing bacteria in coastal recreational waters. *International journal of antimicrobial agents*, 45(2), pp.174-177.

Nandi, S., Maurer, J.J., Hofacre, C. and Summers, A.O., 2004. Gram-positive bacteria are a major reservoir of Class 1 antibiotic resistance integrons in poultry litter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(18), pp.7118-7122.

Nardelli, M., Scalzo, P. M., Ramírez, M. S., Quiroga, M. P., Cassini, M. H., & Centrón, D. (2012). Class 1 integrons in environments with different degrees of urbanization. *PLoS one*, 7(6), e39223.

Nascimento, E.D.D. and Araújo, M.F.F.D., 2014. Antimicrobial resistance in bacteria isolated from aquatic environments in Brazil: a systematic review. *Revista Ambiente & Água*, 9(2), pp.239-249.

Nemergut, D.R., Martin, A.P. and Schmidt, S.K., 2004. Integron diversity in heavy-metal-contaminated mine tailings and inferences about integron evolution. *Applied and environmental microbiology*, 70(2), pp.1160-1168.

Newman, D.J. and Cragg, G.M., 2016. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *Journal of natural products*, 79(3), pp.629-661.

Ng, L. K., Martin, I., Alfa, M., and Mulvey, M. 2001. Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes. *Molecular and cellular probes*, 15(4), 209-

215.

Olaitan, A. O., Morand, S., & Rolain, J. M. (2014). Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Frontiers in microbiology*, 5, 643.

Padovani, L., Capri, E., Padovani, C., Puglisi, E. and Trevisan, M., 2006. Monitoring tricyclazole residues in rice paddy watersheds. *Chemosphere*, 62(2), pp.303-314.

Paterson, D.L. and Bonomo, R.A., 2005. Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update. *Clinical microbiology reviews*, 18(4), pp.657-686.

Perry, J.A., Westman, E.L. and Wright, G.D., 2014. The antibiotic resistome: what's new?. *Current opinion in microbiology*, 21, pp.45-50.

Piddock, L.J., 2006. Multidrug-resistance efflux pumps? not just for resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 4(8), p.629.

Pontes, D. S., Pinheiro, F. A., Lima-Bittencourt, C. I., Guedes, R. L. M., Cursino, L., Barbosa, F., ... and Nascimento, A. M. A. 2009. Multiple antimicrobial resistance of gram-negative bacteria from natural oligotrophic lakes under distinct anthropogenic influence in a tropical region. *Microbial ecology*, 58(4), 762-772.

Prescott, J.F., 2000. Beta-lactam Antibiotics. *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine, Fifth Edition*, pp.153-173.

Paiva, M.C., Ávila, M.P., Reis, M.P., Costa, P.S., Nardi, R.M. and Nascimento, A.M., 2015. The microbiota and abundance of the class 1 integron-integrase gene in tropical sewage treatment plant influent and activated sludge. *PLoS one*, 10(6), p.e0131532.

Paschoal, R.P., Campana, E.H., Corrêa, L.L., Montezzi, L.F., Barreto, L.R., da Silva, I.R., Bonelli, R.R., Castro, L.D.S. and Picão, R.C., 2017. Concentration and variety of carbapenemase producers in recreational coastal waters showing distinct levels of pollution. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 61(12), pp.e01963-17.

Pereira, A., Santos, A., Tação, M., Alves, A., Henriques, I. and Correia, A., 2013. Genetic diversity and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* from Tagus estuary (Portugal). *Science of the Total Environment*, 461, pp.65-71.

Poirel, L., Potron, A. and Nordmann, P., 2012. OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(7), pp.1597-1606.

PREFEITURA DE IMBÉ. Prefeitura e Corsan ajustam últimos detalhes para início das obras de esgoto no município. Disponível em: www.imbe.rs.gov.br/home/show_page.asp?id_SHOW_noticia=5745&user=&id_CONTEUDO=2722&codID_CAT=808&imgCAT=. Acesso em 15 de abril de 2018.

PREFEITURA DE TRAMANDAÍ. Relatório do diagnóstico técnico-participativo do plano municipal integrado de saneamento básico do município de Tramandaí. Disponível em: www.tramandai.rs.gov.br/imagens/conteudo/diagnostico_esgotamento_sanitario.pdf. Acesso em 15 de abril de 2018.

Queenan, A.M. and Bush, K., 2007. Carbapenemases: the versatile β -lactamases. *Clinical microbiology reviews*, 20(3), pp.440-458.

Rabanal, F., Grau-Campistany, A., Vila-Farrés, X., Gonzalez-Linares, J., Borràs, M., Vila, J., ... Cajal, Y. 2015. A bioinspired peptide scaffold with high antibiotic activity and low in vivo toxicity. *Scientific reports*, 5, 10558.

Rawat, D. and Nair, D., 2010. Extended-spectrum β -lactamases in Gram Negative Bacteria. *Journal of global infectious diseases*, 2(3), p.263.

Rodríguez-Minguela, C.M., Apajalahti, J.H., Chai, B., Cole, J.R. and Tiedje, J.M., 2009. Worldwide prevalence of class 2 integrases outside the clinical setting is associated with human impact. *Applied and environmental microbiology*, 75(15), pp.5100-5110.

Riesenfeld, C.S., Goodman, R.M. and Handelsman, J., 2004. Uncultured soil bacteria are a reservoir of new antibiotic resistance genes. *Environmental microbiology*, 6(9), pp.981-989.

Rosewarne, C.P., Pettigrove, V., Stokes, H.W. and Parsons, Y.M., 2010. Class 1 integrons in benthic bacterial communities: abundance, association with Tn 402-like transposition modules and evidence for coselection with heavy-metal resistance. *FEMS microbiology ecology*, 72(1), pp.35-46.

Rusk, N., 2010. Torrents of sequence. *Nature Methods*, 8(1), p.44.

Sá, L.L.C.D., Fonseca, É.L.D., Pellegrini, M., Freitas, F., Loureiro, E.C.B. and Vicente, A.C.P., 2010. Occurrence and composition of class 1 and class 2 integrons in clinical and environmental O1 and non-O1/non-O139 *Vibrio cholerae* strains from the Brazilian Amazon. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 105(2), pp.229-232.

Sampaio, J.L.M. and Gales, A.C., 2016. Antimicrobial resistance in

Enterobacteriaceae in Brazil: focus on β -lactams and polymyxins. *Brazilian journal of microbiology*, 47, pp.31-37.

Samuelsen, O.B. and Bergh, Ø., 2004. Efficacy of orally administered florfenicol and oxolinic acid for the treatment of vibriosis in cod (*Gadus morhua*). *Aquaculture*, 235(1-4), pp.27-35.

Santiago, G.S., da Motta, C.C., Bronzato, G.F., Gonçalves, D., de Souza, M.M.S., da Silva Coelho, I., Ferreira, H.N. and de Oliveira Coelho, S.D.M., 2016. Revisão: Produção de β -lactamases do Tipo AmpC em Enterobacteriaceae. *Brazilian Journal of Veterinary Medicine*, 38(Supl. 3), pp.17-30.

Santin, E., Hayashi, R.M., Wammes, J.C., Gonzalez-Esquerria, R., Carazzolle, M.F., de Melo Freire, C.C., Monzani, P.S. and da Cunha, A.F., 2017. Phenotypic and Genotypic Features of a Salmonella Heidelberg Strain Isolated in Broilers in Brazil and Their Possible Association to Antibiotics and Short-Chain Organic Acids Resistance and Susceptibility. *Frontiers in veterinary science*, 4.

Scaletsky, I.C., Souza, T.B., Aranda, K.R. and Okeke, I.N., 2010. Genetic elements associated with antimicrobial resistance in enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) from Brazil. *BMC microbiology*, 10(1), p.25.

Segawa, T., Takeuchi, N., Rivera, A., Yamada, A., Yoshimura, Y., Barcaza, G., Shinbori, K., Motoyama, H., Kohshima, S. and Ushida, K., 2013. Distribution of antibiotic resistance genes in glacier environments. *Environmental microbiology reports*, 5(1), pp.127-134.

Sellera, F.P., Fernandes, M.R., Moura, Q., Souza, T.A., Cerdeira, L. and Lincopan, N., 2017. Draft genome sequence of *Enterobacter cloacae* ST520 harbouring blaKPC-2, blaCTX-M-15 and blaOXA-17 isolated from coastal waters of the South Atlantic Ocean. *Journal of global antimicrobial resistance*, 10, pp.279-280.

Sharma, V.K., Johnson, N., Cizmas, L., McDonald, T.J. and Kim, H., 2016. A review of the influence of treatment strategies on antibiotic resistant bacteria and antibiotic resistance genes. *Chemosphere*, 150, pp.702-714.

Shaw, J.L., Monis, P., Weyrich, L.S., Sawade, E., Drikas, M. and Cooper, A.J., 2015. Using amplicon sequencing to characterize and monitor bacterial diversity in drinking water distribution systems. *Applied and environmental microbiology*, 81(18), pp.6463-6473.

Silva, K.C.D. and Lincopan, N., 2012. Epidemiologia das betalactamases de espectro estendido no Brasil: impacto clínico e implicações para o agronegócio. *J*

Bras Patol Med Lab, 48(3), pp.91-9.

Singh, R., Swick, M.C., Ledesma, K.R., Yang, Z., Hu, M., Zechiedrich, L. and Tam, V.H., 2012. Temporal interplay between efflux pumps and target mutations in development of antibiotic resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 56(4), pp.1680-1685.

Smith, N. M., Bulman, Z. P., Sieron, A. O., Bulitta, J. B., Holden, P. N., Nation, R. L., ... and Tsuji, B. T., 2017. Pharmacodynamics of dose-escalated 'front-loading' polymyxin B regimens against polymyxin-resistant mcr-1-harboring *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72(8), 2297-2303.

Speer, B.S., Shoemaker, N.B. and Salyers, A.A., 1992. Bacterial resistance to tetracycline: mechanisms, transfer, and clinical significance. *Clinical microbiology reviews*, 5(4), pp.387-399.

Spindler, A., Otton, L.M., Fuentefria, D.B. and Corção, G., 2012. Beta-lactams resistance and presence of class 1 integron in *Pseudomonas* spp. isolated from untreated hospital effluents in Brazil. *Antonie van Leeuwenhoek*, 102(1), pp.73-81.

Stange, C., Sidhu, J. P. S., Tiehm, A., and Toze, S. 2016. Antibiotic resistance and virulence genes in coliform water isolates. *International journal of hygiene and environmental health*, 219(8), 823-831.

Stokes, H.W., Nesbø, C.L., Holley, M., Bahl, M.I., Gillings, M.R. and Boucher, Y., 2006. Class 1 integrons potentially predating the association with Tn402-like transposition genes are present in a sediment microbial community. *Journal of bacteriology*, 188(16), pp.5722-5730 ,

Tacão, M., Correia, A. and Henriques, I., 2012. Resistance to broad-spectrum antibiotics in aquatic systems: anthropogenic activities modulate the dissemination of blaCTX-M-like genes. *Applied and environmental microbiology*, 78(12), pp.4134-4140.

Tan, L., Li, L., Ashbolt, N., Wang, X., Cui, Y., Zhu, X., Xu, Y., Yang, Y., Mao, D. and Luo, Y., 2017. Arctic antibiotic resistance gene contamination, a result of anthropogenic activities and natural origin. *Science of The Total Environment*.

Turano, H., Gomes, F., Medeiros, M., Oliveira, S., Fontes, L.C., Sato, M.I. and Lincopan, N., 2016. Presence of high-risk clones of OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii* (ST79) and SPM-1-producing *Pseudomonas aeruginosa* (ST277) in environmental water samples in Brazil. *Diagnostic microbiology and*

infectious disease, 86(1), pp.80-82.

Toleman, M.A., Simm, A.M., Murphy, T.A., Gales, A.C., Biedenbach, D.J., Jones, R.N. and Walsh, T.R., 2002. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo- β -lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 50(5), pp.673-679.

Torres-Cortés, G., Millán, V., Ramírez-Saad, H.C., Nisa-Martínez, R., Toro, N. and Martínez-Abarca, F., 2011. Characterization of novel antibiotic resistance genes identified by functional metagenomics on soil samples. *Environmental microbiology*, 13(4), pp.1101-1114.

Trimble, M.J., Mlynářčik, P., Kolář, M. and Hancock, R.E., 2016. Polymyxin: alternative mechanisms of action and resistance. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 6(10), p.a025288.

Valentín, S., Morales, A., Sánchez, J. L., Rivera, A. 2009. Safety and efficacy of doxycycline in the treatment of rosacea. *Clinical, cosmetic and investigational dermatology: CCID*, 2, 129.

Yang, Y., Liu, W., Xu, C., Wei, B. and Wang, J., 2017. Antibiotic resistance genes in lakes from middle and lower reaches of the Yangtze River, China: Effect of land use and sediment characteristics. *Chemosphere*, 178, pp.19-25.

Yu, Z., Qin, W., Lin, J., Fang, S., Qiu, J. 2015. Antibacterial mechanisms of polymyxin and bacterial resistance. *BioMed research international*, 2015.

Wright, G. D. 2007. The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. *Nature Reviews Microbiology*, 5(3), 175.

Wright, M.S., Baker-Austin, C., Lindell, A.H., Stepanauskas, R., Stokes, H.W. and McArthur, J.V., 2008. Influence of industrial contamination on mobile genetic elements: class 1 integron abundance and gene cassette structure in aquatic bacterial communities. *The ISME journal*, 2(4), p.417.

Xavier, D.E., Picão, R.C., Girardello, R., Fehlberg, L.C. and Gales, A.C., 2010. Efflux pumps expression and its association with porin down-regulation and β -lactamase production among *Pseudomonas aeruginosa* causing bloodstream infections in Brazil. *BMC microbiology*, 10(1), p.217.

Xiong, W., Sun, Y., Ding, X., Zhang, Y., Zhong, X., Liang, W. and Zeng, Z., 2015. Responses of plasmid-mediated quinolone resistance genes and bacterial taxa to (fluoro) quinolones-containing manure in arable soil. *Chemosphere*, 119, pp.473-478.

Zanetti, M.O., Martins, V.V., Pitondo-Silva, A. and Stehling, E.G., 2013. Antimicrobial resistance, plasmids and class 1 and 2 integrons occurring in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Brazilian aquatic environments. *Water Science and Technology*, 67(5), pp.1144-1149.

Zavascki, A. P., Goldani, L. Z., Li, J., Nation, R. L. 2007. Polymyxin B for the treatment of multidrug-resistant pathogens: a critical review. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 60(6), 1206-1215.

Zhang, T., Zhang, X. X., & Ye, L. (2011). Plasmid metagenome reveals high levels of antibiotic resistance genes and mobile genetic elements in activated sludge. *PloS one*, 6(10), e26041

Zhang, H., Zhou, Y., Guo, S. and Chang, W. 2015. Multidrug resistance found in extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae from rural water reservoirs in Guantao, China. *Front. Microbiol.* 6:267.

Zhang, X. X., Zhang, T., and Fang, H. H. 2009. Antibiotic resistance genes in water environment. *Applied microbiology and biotechnology*, 82(3), 397-414.