

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

**CARACTERIZAÇÃO DA RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS E FATORES DE
VIRULÊNCIA EM BACTÉRIAS ISOLADAS DE AMOSTRAS DA LAGUNA DE
TRAMANDAÍ**

ALINE REIS MÜLLER

Orientador(a): Prof^(a). Dr^(a). Gertrudes Corção

Porto Alegre

Agosto/2019

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

**CARACTERIZAÇÃO DA RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS E FATORES DE
VIRULÊNCIA EM BACTÉRIAS ISOLADAS DE AMOSTRAS DA LAGUNA DE
TRAMANDAÍ**

Aline Reis Müller

Bióloga

Dissertação de Mestrado 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 Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Área de concentração: Microbiologia
Ambiental

Orientador(a): Prof^(a). Dr^(a). Gertrudes Corção

Porto Alegre, Rio Grande do Sul - Brasil

Agosto/2019

“Em algum lugar, alguma coisa incrível está esperando para ser descoberta.”

Carl Sagan

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais pelo incrível suporte, não teria chegado até aqui sem vocês.

À minha professora e orientadora Dra. Gertrudes Corção, por seus ensinamentos e por sua confiança, obrigada pela oportunidade desse aprendizado.

À todas minhas colegas de laboratório pelo auxílio, pelo agradável convívio e por todos os momentos que passamos juntas. Em especial agradeço a Laura Nunes De Souza, por ter estado ao meu lado e me ouvido, por ter sido minha amiga, por tanto ter me ensinado e por todo o companheirismo nessa etapa da nossa vida, não posso imaginar como teria sido sem você.

Ao meu companheiro Augusto Carvalho Bisinella, pelo incentivo e apoio a todos os caminhos que porventura eu queira trilhar.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa e à UFRGS por ter reaberto as portas para mim.

À todos que, de alguma forma, me auxiliaram nessa jornada.

CARACTERIZAÇÃO DA RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS E FATORES DE VIRULÊNCIA EM BACTÉRIAS ISOLADAS DE AMOSTRAS DA LAGUNA DE TRAMANDAÍ

Autor: Aline Reis Müller

Orientador(a): Prof^(a). Dr^(a). Gertrudes Corção

RESUMO

Os ambientes aquáticos têm demonstrado grande importância quanto à aquisição e disseminação de resistência à antimicrobianos em bactérias. Frente a este problema, esse estudo teve como objetivo determinar o perfil de suscetibilidade a antimicrobianos, verificar a presença de genes de resistência a beta-lactâmicos (*bla*_{OXA-48}, *bla*_{KPC}, *bla*_{TEM}, *bla*_{GES}) e caracterizar o perfil de virulência através da análise da produção de biofilme e presença de fímbrias dos tipos 1 e 3 de bactérias de diferentes espécies provenientes da Laguna de Tramandaí. Trinta e sete isolados foram identificados através da análise por MALDI-TOF como pertencentes às espécies *S. marcescens*, *P. aeruginosa*, *M. morgani*, *C. freundii*, *P. alcalifaciens*, *E. coli* e *E. faecium*. Todos os isolados foram suscetíveis ao Imipenem e todos os Gram-negativos apresentaram suscetibilidade à piperacilina tazobactam, ceftazidima e cefepima, assim como os Gram-positivos à nitrofurantoína, gentamicina e tigeciclina. As maiores taxas de resistência a antimicrobianos entre as bactérias Gram-negativas foram para ampicilina (75,7%), amoxicilina-ácido clavulânico (66,6%) e cefoxitina (39,4%). Dos quatro isolados Gram-positivos, dois mostraram-se resistentes à ampicilina, norfloxacin e estreptomicina e um à vancomicina. Apesar de 81% das bactérias apresentarem multirresistência, os isolados analisados não apresentaram os genes de resistência pesquisados. Todas as bactérias foram formadoras de biofilme e 43,2% foram forte formadoras. Aproximadamente metade (51,5%) dos isolados Gram-negativos apresentaram uma das fímbrias analisadas (tipo 1 ou tipo 3), sendo a fímbria do tipo 3 a mais recorrente. A elevada porcentagem de isolados que apresentaram multirresistência atenta para o risco de disseminação de resistência no ambiente pesquisado e caracterizam a laguna como um possível reservatório de bactérias resistentes.

¹Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. Agosto, 2019.

CHARACTERIZATION OF THE ANTIBIOTICS RESISTANCE AND VIRULENCE FACTORS IN ISOLATED BACTERIA FROM TETRACYCLINE-SUPPLIED TRAMANDAÍ LAGOON SAMPLES

Author: Aline Reis Müller

Advisor: Prof. Dr. Gertrudes Corção

ABSTRACT

Aquatic environments have been shown to be important for the acquisition and spread of antimicrobial resistance in bacteria. This study aimed to determine the antimicrobial susceptibility profile, verify the presence of beta-lactam resistance genes (*bla*_{OXA-48}, *bla*_{KPC}, *bla*_{TEM}, *bla*_{GES}), and characterize the virulence profile through the analysis of biofilm production and presence of fimbriae types 1 and 3 of bacteria of different species from Tramandaí Lagoon. 37 isolates were identified by MALDI-TOF analysis as belonging to the species *S. marcescens*, *P. aeruginosa*, *M. morgani*, *C. freundii*, *P. alcalifaciens*, *E. coli* and *E. faecium*. All isolates were susceptible to Imipenem and all Gram-negative isolates were susceptible to piperacillin tazobactam, ceftazidime and cefepime, as well as Gram-positive to nitrofurantoin, gentamicin and tigecycline. The highest antimicrobial resistance rates among Gram-negative bacteria were for ampicillin (75.7%), amoxicillin-clavulanic acid (66.6%) and ceftoxitin (39.4%). Two Gram-positive isolates were resistant to ampicillin, norfloxacin, streptomycin and one isolate was vancomycin resistant. Although, 81% of the bacteria presented multiresistance, the isolates analyzed did not show the resistance genes searched. All bacteria were biofilm-forming and 43.2% were strong-forming. About half of the isolates (51,5%) presented one of the analyzed fimbria (type 1 or type 3) and type 3 fimbria was the most recurrent. The high percentage of isolates that presented multiresistance aware to the risk of antibiotic resistance spread in the studied environment and characterize the lagoon as a possible reservoir of resistant bacteria.

¹Master of Science Thesis in Agricultural and Environmental Microbiology – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. August, 2019.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
2.	OBJETIVOS	2
2.1	Objetivo Geral	2
2.2	Objetivos Específicos	2
3.	REVISÃO DA LITERATURA.....	3
3.1	Características da Família Enterobacteriaceae e dos gêneros <i>Serratia</i> , <i>Morganella</i> , <i>Citrobacter</i> , <i>Providencia</i> e <i>Escherichia</i>	3
3.1.1	Gênero <i>Serratia</i> e espécie <i>S.marcescens</i>	3
3.1.2	Gênero <i>Morganella</i> e espécie <i>M. morganii</i>	4
3.1.3	Gênero <i>Citrobacter</i> e espécie <i>C. freundii</i>	4
3.1.4	Gênero <i>Providência</i> e espécie <i>P. alcalifaciens</i>	5
3.1.5	Gênero <i>Escherichia</i> e espécie <i>E. coli</i>	5
3.2	Família Pseudomonadaceae e o gênero <i>Pseudomonas</i>	6
3.3	Família Enterococcaceae e o gênero <i>Enterococcus</i>	7
3.4	Resistência a agentes antimicrobianos em bactérias de corpos d'água.....	8
3.5	Resistência às tetraciclinas.....	10
3.6	Resistência à beta-lactâmicos.....	11
3.7	Biofilme.....	12
3.8	Fímbrias.....	14
4.	MATERIAL E MÉTODOS.....	16
4.1	Meios de cultura e soluções	16
4.2	Área de estudos e coleta das amostras.....	16
4.3	Identificação bacteriana por provas bioquímicas e por MALDI – TOF MS.....	16
4.4	Análises da susceptibilidade a antimicrobianos.....	17
4.5	Formação de biofilme.....	18
4.6	Fímbria.....	19
4.7	Extração de DNA.....	19
4.8	Amplificação por PCR.....	20
4.9	Análise estatística.....	21

5.	RESULTADOS	22
5.1	Identificação	22
5.2	Susceptibilidade a antimicrobianos e genes de resistência	22
5.3	Biofilme	25
5.4	Fímbrias	27
6.	DISCUSSÃO	28
7.	CONCLUSÃO	34
8.	REFERÊNCIAS	35
9.	ANEXOS	50
9.1	Meios de cultura	51
9.2	Soluções	52

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1: Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para pesquisa de genes de resistência.	21
Tabela 2: Concentração final dos reagentes para as reações de PCR	21
Tabela 3: Ciclos de amplificação dos genes analisados	21
Tabela 4: Relação entre antimicrobianos, suscetibilidade e resistência, considerando o número total de isolados bacterianos Gram-negativos e sua porcentagem	23
Tabela 5: Perfil de resistência a antimicrobianos encontrados nos isolados estudados	24
Tabela 6: Relação entre espécies e a intensidade da formação de biofilme.	25
Tabela 7: Relação entre o nome do isolado, o perfil de resistência e a intensidade do biofilme.	26
Tabela 8: Relação entre espécies e presença ou ausência de fímbrias do tipo 1 e fímbrias do tipo 3.	27
Tabela 9: Relação entre a intensidade do biofilme e a presença e ausência de fímbrias.	27
Tabela 10: Antimicrobianos utilizados para análise do perfil de suscetibilidade.	55
Tabela 11: Relação entre o nome do isolado e as espécie.	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMC	Amoxicilina-ácido clavulânico
AMI	Amicacina
AMP	Ampicilina
ATM	Aztreonam
CAZ	Ceftazidima
CFO	Cefoxitina
CLO	Cloranfenicol
CLSI	Clinical laboratory standards institute
CPM	Cefepima
CTX	Cefotaxima
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ESBL	beta-lactamase de espectro estendido
Et al	E colaboradores
GEN	Gentamicina
GES	Guiana extend spectrum
IPM	Imipenem
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Carbapenemase
NIT	Nitrofurantoína
PPT	Piperacilina- tazobactam
SUT	Sulfametoxazol-trimetoprima
TET	Tetraciclina
TGC	Tigeciclina
VAN	Vancomicina

1. INTRODUÇÃO

Os ambientes hospitalares são conhecidos por serem locais de forte propagação de bactérias resistentes a antibióticos, principalmente devido ao grande fluxo de microrganismos circulantes e ao elevado uso de antimicrobianos. No entanto, os ambientes aquáticos têm demonstrado ser um local de grande importância quanto à aquisição e disseminação de resistência antimicrobiana, particularmente devido ao fato de serem, muitas vezes, impactados por atividades antropogênicas. Efluentes domésticos, industriais e hospitalares são lançados constantemente nos corpos aquáticos e contribuem para a disseminação da resistência bacteriana no ambiente (MARTI; VARIATZA; BALCAZAR, 2014). Além disso, destaca-se frequentemente a descarga de resíduos de antibióticos como contribuintes da resistência bacteriana, porém, metais pesados, desinfetantes e compostos orgânicos também auxiliam nessa seleção (CHAPMAN, 2003; SEILER; BERENDONK, 2012).

As bactérias resistentes encontradas nos ambientes aquáticos podem disseminar sua resistência através de transferência horizontal de gene por elementos genéticos móveis (RIZZO et al., 2013) Tal possibilidade aumenta a preocupação em relação à saúde pública, uma vez que se entrarem em contato com os seres humanos e forem virulentas, é possível que não haja fármacos disponíveis para combatê-las.

Tendo em vista a ampla propagação de resistência bacteriana em ambientes aquáticos, nossa dificuldade em lidar com tal adversidade e a seriedade dos danos para a saúde, a presente pesquisa visa caracterizar o perfil de resistência a antimicrobianos e analisar os fatores de virulência em bactérias isoladas da Laguna de Tramandaí.

Um estudo com *Pseudomonas aeruginosa* na mesma laguna (CHAVES, 2017), que objetivou analisar a manutenção da resistência a antimicrobianos nesse ambiente através da suplementação com ácido nalidíxico, ceftazidima, imipenem e tetraciclina mostrou que o tratamento com ácido nalidíxico selecionou elevado número de isolados resistentes, e o teste de difusão em disco revelou porcentagens de resistência acima de 70% para beta-lactâmicos em amostras suplementadas e não suplementadas. As amostras não suplementadas apresentaram 93,7% de cepas multirresistentes, enquanto as amostras não suplementadas apresentaram 82,7% de cepas multirresistentes. Esse estudo torna-se relevante, tendo em vista esses resultados e a importância do monitoramento de ambientes aquáticos como reservatórios da

resistência a antibióticos, assim como o fato de haver uma escassez de trabalhos relativos à resistência bacteriana em microrganismos ambientais aquáticos provenientes da região estudada.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O presente estudo objetivou caracterizar bactérias isoladas de amostras de água da Laguna de Tramandaí previamente cultivadas na presença do antimicrobiano tetraciclina.

2.2 Objetivos Específicos

- 2.2.1** Recuperar e identificar os isolados bacterianos de diferentes pontos da Laguna de Tramandaí, crescidos na presença de tetraciclina.
- 2.2.2** Caracterizar os isolados das diferentes espécies encontradas quanto aos seus perfis de suscetibilidade a diferentes classes de antimicrobiano.
- 2.2.3** Verificar a presença de fatores de virulência relacionados à formação de fímbrias e à formação de biofilme.
- 2.2.4** Verificar a presença de genes de resistência a beta-lactâmicos nos isolados bacterianos.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Características da Família Enterobacteriaceae e dos gêneros *Serratia*, *Morganella*, *Citrobacter*, *Providencia* e *Escherichia*.

A família Enterobacteriaceae pertence à divisão Proteobacteria, classe Gammaproteobacteria e ordem Enterobacteriales. As bactérias dessa família possuem mais de 40 gêneros, sendo a maior e mais diversificada família de bacilos Gram-negativos de importância médica. Muito dispersos na natureza, isolados deste grupo taxonômico podem ser encontrados em plantas, na água, no solo e na microbiota do trato intestinal dos animais. Sua relevância para a saúde está relacionada à ocorrência de infecções, à sua patogenicidade e à apresentação de resistência a diversos antimicrobianos utilizados na terapia médica (ANDRADE, 2008; DOS SANTOS et al., 2015).

3.1.1 Gênero *Serratia* e espécie *S.marcescens*

As bactérias do gênero *Serratia* são aeróbicas e anaeróbicas facultativas, são também produtoras de enzimas hidrolíticas como lipase, DNase e gelatinase, tornando-as diferentes dos demais membros da família Enterobacteriaceae. Algumas cepas pertencentes ao gênero sintetizam metabólitos secundários de diversas utilidades, como antibióticos ou pigmentos vermelhos e surfactantes, tendo potenciais aplicações na indústria farmacêutica ou na biorremediação ambiental (WEI; LAI, 2006). Porém, os microrganismos desse gênero podem ser agentes patogênicos oportunistas, principalmente em pessoas que já se encontram debilitadas (HEJAZI; FALKINER, 1997).

A espécie *S.marcescens* é a principal causadora de doenças humanas do gênero *Serratia* (DOS SANTOS et al., 2015). Inicialmente, esses microrganismos eram considerados aquáticos saprófitos não prejudiciais e sem patogenicidade, e frequentemente eram utilizados como marcador biológico pelas suas colônias vermelhas de fácil reconhecimento (HEJAZI; FALKINER, 1997). Hoje sabemos que essa espécie está relacionada a infecções hospitalares, sendo um agente causador de diversos tipos de doenças, como do trato respiratório, do trato urinário, septicemia, meningite, endocardite infecciosa e infecções de feridas (COX, 1985; HEJAZI; FALKINER, 1997; MILLS; DREW, 1976). Cepas de *S. marcescens* foram apresentando resistência múltipla para beta-lactâmicos, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas

(STOCK; GRUEGER; WIEDEMANN, 2003), tornando essa espécie um patógeno humano emergente.

3.1.2 Gênero *Morganella* e espécie *M. morganii*

Os organismos pertencentes ao gênero *Morganella* são anaeróbios facultativos, apresentam catalase positiva, oxidase negativa e conseguem reduzir nitrato para nitrito. Os flagelos em espécies desse gênero são os principais determinantes na colonização e formação de biofilmes bacterianos, assim como as fímbrias demonstram um papel relevante no estabelecimento de infecções do trato urinário (NIELUBOWICZ; MOBLEY, 2010). A maioria desses microrganismos consegue hidrolisar a ureia, sendo a atividade da urease um fator determinante no crescimento de bactérias e na formação de biofilme no trato urinário (DOS SANTOS et al., 2015).

M. morganii, anteriormente conhecida como *Proteus morganii*, é a espécie de maior interesse clínico dentro do gênero *Morganella*, e é comumente encontrada nos intestinos de humanos e de outros animais. Seu crescimento ocorre entre 4 e 45°C, possuindo a habilidade de produzir concentrações tóxicas de histamina em frutos do mar entre 7 a 10°C (LEHANE; OLLEY, 2000). É conhecida por ser uma bactéria oportunista, causando infecções em neonatos, infecções do trato urinário e respiratório, podendo atingir pessoas em estágios pós-operatórios ou diabéticas (KIM et al., 2007). Está também relacionada a infecções nasocomiais, podendo causar meningite, ectima gangrenoso, peritonite bacteriana espontânea, celulite, corioamnionite, artrite séptica e abscesso cutâneo (LIVANI; KABIR, 2019).

3.1.3 Gênero *Citrobacter* e espécie *C. freundii*

São bacilos anaeróbios facultativos que podem se encontrar sozinhos ou em pares, apresentam motilidade com cinco flagelos polares em um pólo (GARRITY; BRENNER; STALEY, 2005). Um grande estudo observacional nos Estados Unidos demonstrou que 0,8% da infecção por bactérias Gram-negativas foi causada pelo gênero *Citrobacter* (JONES et al., 2000).

A espécie *C. freundii* é a mais importante espécie desse gênero, é considerada um coliforme, ou seja, ela é indicadora da qualidade da água e de alimentos. Ela pode ser encontrada no solo, na água, no esgoto e nos intestinos de animais (DUCEPPE et al., 2019). Pode causar infecções gastrointestinais, no sistema urinário e pulmonar, infecções sanguíneas e meningites neonatais (DORAN, 1999), assim como está

relacionada a uma alta resistência antimicrobiana à penicilina e cefalosporinas de terceira geração (BARLOW; HALL, 2002).

3.1.4 Gênero *Providencia* e espécie *P. alcalifaciens*

As bactérias do gênero *Providencia* são todas anaeróbias facultativas e possuem flagelo por toda a superfície celular, são geralmente consideradas comensais no trato gastrointestinal, entretanto, algumas espécies, como *P. alcalifaciens*, já foram associadas às infecções adquiridas em hospitais em idosos e pessoas debilitadas (MANOS; BELAS, 2006). Esse gênero pode também ser encontrado em diversos reservatórios de animais, como gado, cães, gatos, ovelhas e aves, muitas vezes no solo ou na água de esgoto (FEYZIOĞLU et al., 2013).

O gênero *Providencia* foi relacionado como causador da diarreia dos viajantes (YOH et al., 2005), além disso, a bactéria *P. alcalifaciens* foi descrita como possível causa de diarreia infantil em países em desenvolvimento (ALBERT; FARUQUE; MAHALANABIS, 1998) e como causadora de surto de infecção transmitida por alimentos no Japão (MURATA et al., 2001).

3.1.5 Gênero *Escherichia* e espécie *E. coli*

As espécies do gênero *Escherichia* são anaeróbias facultativas, podendo ser imóveis ou móveis com flagelos peritricos (GARRITY; BRENNER; STALEY, 2005). *E. coli*, a mais importante espécie desse gênero, é considerada um coliforme, utilizada como indicador da qualidade da água, pois faz parte aproximadamente de 10% dos microrganismos existentes no intestino de animais, podendo ser encontrada também no solo, na água, na sujeira e em diversos outros ambientes (TORRES, 2010).

Ainda que *E. coli* seja considerada comensal e uma habitante normal do intestino humano, é também o bacilo Gram-negativo mais comumente encontrado nos casos de infecções, pois há cepas que podem causar danos e apresentar toxinas, como as produtoras de toxinas Shiga (STEC), sendo considerada um contaminante perigoso tanto na água quanto na produção de alimento (DURIEZ et al., 2001; TORRES, 2010). Cepas que apresentam patogenicidade podem, inclusive, ser derivadas de cepas comensais que até então não apresentavam virulência, pela aquisição de operons de virulência cromossômicas ou extra-cromossômicas (FINLAY; FALKOW, 1997; OCHMAN; LAWRENCE; GROISMAN, 2000). Distintos mecanismos de patogenicidade foram descritos de pelo menos seis diferentes patótipos de *E. coli* como provocadores de

doenças entéricas, como diarreia ou disenteria, enquanto outros patótipos já foram identificados como causadores de infecções extra-intestinais, incluindo infecções do trato urinário e meningite (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). Durante a década de 80, doenças associadas a *E. coli* ganharam notoriedade devido a ocorrência de surtos graves de diarreia sanguinolenta, conhecida como colite hemorrágica, o termo *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) foi, na época, empregado para classificar populações de STEC com elevado poder patogênico e responsáveis por casos graves em seres humanos, apresentando quadro de colite hemorrágica (MANGIA, 2011)

E. coli, como bactéria indicadora, é interessante de ser analisada pelo fato de adquirir resistência bacteriana mais rápido que outras bactérias (TORRES, 2010). Assim, mudanças no perfil de resistência nessa espécie podem servir como um interessante indicador de resistência em bactérias potencialmente patogênicas (VAN DEN BOGAARD; LONDON; STOBBERINGH, 2000; KIJIMA-TANAKA et al., 2003) .

3.2 Família Pseudomonadaceae e o gênero *Pseudomonas*

Entre os microrganismos da família Pseudomonadaceae, o gênero que mais se destaca é *Pseudomonas*. Esse gênero pode ser encontrado como saprófita de vida livre em solos, água doce, ambientes marinhos, em associação com plantas ou animais como agentes causadores de doenças. São bactérias Gram-negativas, suas células são em forma de bastão, retas ou curvadas e a maioria apresenta motilidade por meio de um ou mais flagelos polares, sendo comumente aeróbios estritos (PALLERONI, 1981).

Pseudomonas aeruginosa é uma grande causadora de infecções hospitalares (SLOTS; FEIK; RAMS, 1990) e tem demonstrado cada vez mais resistência a diversos antibióticos amplamente utilizados, apresentando uma alta taxa de morbidade e mortalidade (HANCOCK, 1998; LAMBERT, 2002). Essa bactéria possui um resistoma intrínseco, manifestando uma resistência mais ampla que é resultante de uma complexa rede de genes (ALVAREZ-ORTEGA et al., 2011). A baixa permeabilidade da membrana externa, muito menor em *P. aeruginosa* que em *E. coli*, por exemplo, e a presença de algumas proteínas relacionadas à modificação do metabolismo celular que leva a alterações no estado de crescimento celular, podem representar um dos mecanismos mais importantes de resistência intrínseca neste organismo (ALVAREZ-ORTEGA et al., 2011; BREIDENSTEIN; DE LA FUENTE-NÚÑEZ; HANCOCK, 2011; VAZ-MOREIRA; NUNES; MANAIA, 2014). A resistência intrínseca de *P. aeruginosa* é

muito atribuída à expressão de vários sistemas de efluxo de resistência a múltiplos fármacos. A preocupação com esse microrganismo em ambientes hospitalares vai além de sua resistência a antibióticos, pois já foi observada resistência a desinfetantes químicos e antissépticos como compostos quaternários de amônia, fenol e hexaclorofeno (CHUANCHUEN et al., 2001).

P. aeruginosa se destaca pela baixa sensibilidade aos antibióticos de maior espectro de ação, como os carbapenêmicos e as cefalosporinas (LANDMAN et al., 2007). A produção de enzimas beta-lactamases e metalo-beta-lactamases possui grande relevância entre as mutações que aumentam a resistência dessas bactérias, muitas vezes ocorrendo em pacientes com maior tempo de internação e uso prévio de antimicrobianos (CAVALLO et al., 2002; LEPPER et al., 2002)

Em pessoas já debilitadas, qualquer parte do corpo poderia ser suscetível a uma infecção por *P. aeruginosa*, fazendo com que pacientes em unidades de terapia intensiva (UTI) estejam mais sujeitos a infecções por essa bactéria (PIRES et al., 2009).

3.3 Família Enterococcaceae e o gênero *Enterococcus*

A família Enterococcaceae é composta por bactérias Gram-positivas. Em geral, são fastidiosas e crescem em ambientes onde as necessidades nutricionais são fornecidas muitas vezes por outros organismos. Além de serem encontradas nos intestinos de mamíferos, aves e peixes, é possível achá-las em material vegetal e animal em decomposição assim como em ambientes aquáticos, em íntima associação com algas (LORY, 2014)

Os membros mais estudados desta família pertencem ao gênero *Enterococcus*. As bactérias desse gênero são aeróbias facultativas, com morfologia coco encontrada aos pares ou em cadeia curta. Por terem a capacidade de crescer em cadeia, não são facilmente distinguíveis dos estreptococos clássicos e já foram considerados parte do gênero *Streptococcus*, até serem classificados em seu próprio gênero (MURRAY, 1990).

As espécies mais comumente isoladas são *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium*. Essas duas espécies fazem parte da microbiota intestinal dos seres humanos (KLEIN, 2003), sendo importantes causadores de infecções hospitalares pelo aparecimento de elevada resistência aos antibióticos tradicionalmente utilizados para tratamento de infecções (MOELLERING; JR., 1992). Possuem

sensibilidade ou resistência variável aos antimicrobianos glicopeptídios como a vancomicina e teicoplanina (LECLERCQ et al., 1988; GOLOB et al., 2019) , e muitas cepas de *E. faecium* demonstram resistência a múltiplos antimicrobianos (KAYSER, 2003). A transmissão pode ocorrer de pessoa a pessoa, ou através de alimentos ou ambientes contaminados, podendo ocasionar infecções em feridas, bacteremia, endocardite e, mais frequentemente, infecções do trato urinário (KAYSER, 2003; SINGH; NALLAPAREDDY; MURRAY, 2007).

3.4 Resistência a agentes antimicrobianos em bactérias de corpos d'água.

O ambiente aquático é considerado um dos habitats mais ricos em microrganismos procariontes (TAMAMES et al., 2010). Diversos estudos vêm apontando este ambiente como importante reservatório de resistência bacteriana (NOVO et al., 2013; RIZZO et al., 2013; VAZ-MOREIRA; NUNES; MANAIA, 2014; MARTI; VARIATZA; BALCAZAR, 2014). Vários genes que codificam resistência a uma ampla gama de antibióticos foram encontrados em microrganismos distribuídos não apenas em águas residuais hospitalares e em efluentes de produção animal, mas também em esgotos, estações de tratamento de águas residuais, águas superficiais, subterrâneas e até mesmo em água potável (ZHANG; ZHANG; FANG, 2009).

A presença de genes de resistência nesses locais pode ser proveniente de agentes patogênicos humanos que chegam aos corpos d'água ou de populações bacterianas que já possuem resistência intrínseca (MOORE et al., 2010; VAZ-MOREIRA; NUNES; MANAIA, 2014). A resistência a antibióticos pode estar ligada originalmente a bactérias ambientais que desenvolveram mecanismos adquiridos de resistência em um habitat com concentrações crônicas subletais de antibióticos provenientes do escoamento de resíduos da agricultura ou descarga de resíduos de esgoto (MOORE et al., 2010). A descarga de uma gama de antibióticos e seus metabólitos na água pode agir selecionando populações resistentes. No trabalho de Seiler e Berendonk (2012), os autores investigaram a interação entre metais pesados provenientes da agricultura e aquicultura e a co-seleção de resistência a antibióticos no solo e em corpos aquáticos, demonstrando que outros fatores além da descarga de antibiótico no ambiente podem ser motivo de preocupação. Os metais pesados são persistentes na natureza, acumulando-se em diferentes componentes dos ecossistemas (LU et al., 2014). Em outro estudo, os autores demonstraram que mesmo níveis relativamente baixos de metais pesados em ambientes poluídos podem estar

relacionados à resistência bacteriana aos antibióticos (CHEN et al., 2015).

Vários mecanismos estão por trás desse processo de co-seleção, como a co-resistência e a resistência cruzada. A co-resistência está relacionada à proximidade de dois ou mais genes que codificam resistência a diferentes agentes alojados em um mesmo elemento genético móvel, assim, bactérias que sofrem seleção por determinado agente antimicrobiano podem acabar mantendo genes de resistência a outros agentes, como metais (CHAPMAN, 2003). A resistência cruzada ocorre quando o mesmo determinante genético é responsável pela resistência a antibióticos e metais (BAKER-AUSTIN et al., 2006). Os plasmídeos e transposons são exemplos de elementos genéticos móveis, e os integrons são estruturas associadas a estes elementos, capazes de adquirir diversos genes, montando cassetes gênicos. Os três possuem segmentos de DNA com informações que não são essenciais para a célula, mas contribuem largamente para o aumento da dispersão da resistência bacteriana a antimicrobianos através da transferência gênica horizontal. Este mecanismo pode ocorrer em um processo de conjugação, onde uma bactéria transfere informação genética para outra, em um processo de transformação, adquirindo o DNA livre no ambiente, ou por transdução, quando temos a ação de um bacteriófago (MARTI; VARIATZA; BALCAZAR, 2014)

As bactérias resistentes a antibióticos provenientes de corpos aquáticos podem entrar em contato com seres humanos de diversas formas, uma delas é através da ingestão desses microrganismos por animais de abate, introduzindo esses patógenos na alimentação humana. Outra forma é através do uso da água em atividades recreativas, podendo promover a ingestão dessas bactérias (MOORE et al., 2010). Xi et al. (2009) demonstraram que é possível encontrar um aumento do número de bactérias resistentes a antibióticos em sistema de tratamento de água e que o próprio sistema de distribuição pode vir a servir como reservatório para disseminação de resistência em patógenos bacterianos oportunistas, permitindo o contágio por água potável. Segundo os autores, a ligação entre os mecanismos de resistência a antibióticos e a utilização do cloro em estações de tratamento de água é ainda desconhecida, no entanto, é possível haver uma relação com o aumento da expressão de genes de bombas de efluxo.

3.5 Resistência às tetraciclinas

As tetraciclinas foram os primeiros agentes antimicrobianos utilizados com atividade de amplo espectro contra uma gama de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (O'BRIEN, 1987). São antibióticos baratos, que têm sido amplamente utilizados devido a sua baixa toxicidade e amplo espectro de atividade na terapia de infecções humanas e animais, tendo sido largamente utilizado em níveis subterapêuticos na alimentação de animais como promotores de crescimento (CHOPRA; ROBERTS, 2001).

A utilização desse antimicrobiano na clínica vem diminuindo devido ao número crescente de isolados resistentes à tetraciclina (GEORGE; LEVY, 1983; JOHNSON; ADAMS, 1992; ZHANG et al., 2008; GAO et al., 2012) . A tetraciclina age, na concentração adequada, ligando-se aos ribossomos e impedindo a síntese protéica bacteriana. Entre as formas de resistência desse antimicrobiano, estão a expulsão do mesmo por bomba de efluxo, a proteção dos ribossomos ou a inativação da tetraciclina. As bactérias portadoras do gene de resistência para bomba de efluxo produzem uma proteína de membrana citoplasmática que bombeia a tetraciclina para fora da célula, mantendo o nível intracelular baixo o suficiente para permitir a síntese protéica. Outro mecanismo consiste em possuir um gene de resistência que codifica uma proteína que interage com os ribossomos, protegendo-os, assim, permitindo que os mesmos prossigam com a síntese protéica mesmo na presença de altos níveis de tetraciclina. É possível, ainda, que haja a codificação de uma enzima que modifica quimicamente a tetraciclina para uma forma inativa (SPEER; SHOEMAKER; SALYERS, 1992; ROBERTS, 2005;) ou que a permeabilidade da membrana celular bacteriana esteja alterada, não permitindo a penetração do antimicrobiano (BAPTISTA, 2013).

Devido ao seu uso extensivo, as tetraciclinas têm sido encontradas em diferentes ambientes. Depois de utilizada como medicamento, aproximadamente 70% da tetraciclina é excretada e liberada para o ambiente através da urina e das fezes, provenientes de origem humana ou animal (JJEMBA, 2006). Isso ocorre porque durante a utilização de um antibiótico, o organismo não consegue absorver completamente o medicamento e uma fração significativa é excretada nas formas de metabólitos para o ambiente (BOUND; VOULVOULIS, 2004; ZHOU et al., 2012). Devido a sua natureza hidrofílica e de baixa volatilidade, a tetraciclina, depois de excretada, pode perdurar por um tempo significativo no ambiente aquático (DAGHRIR; DROGUI, 2013).

Um dos problemas relacionados a essa permanência nos ambientes aquáticos é que a tetraciclina pode entrar em contato com metais que estão continuamente se acumulando. Ela tem forte tendência a interagir com vários íons metálicos e formar complexos metálicos. A coexistência da tetraciclina e metais no ambiente e suas interações têm mostrado um aumento na resistência a antibióticos (PULICHARLA et al., 2017). Além disso, estudos confirmaram que a exposição à baixa concentração de tetraciclina por períodos mais longos leva à seleção, ao desenvolvimento e à manutenção da resistência bacteriana à mesma (GULLBERG et al., 2011; KUMMERER, 2004; VAN HOEK et al., 2011).

3.6 Resistência a beta-lactâmicos

Um grupo de antimicrobianos muito utilizado na clínica médica e que vem demonstrando vasta resistência por microrganismos são os beta-lactâmicos. Os antibióticos beta-lactâmicos possuem em sua estrutura bioquímica o anel beta-lactâmico, o qual é alvo das enzimas beta-lactamases bacterianas. As penicilinas, cefalosporinas, carbapenens e monobactams pertencem aos antibióticos beta-lactâmicos e correspondem a maioria dos antibióticos que vem sendo utilizados em larga escala. Entre as bactérias Gram-negativas a resistência a antimicrobianos beta-lactâmicos está principalmente relacionada a beta-lactamases e bombas de efluxo, enquanto nas Gram-positivas está especialmente vinculada a modificação da proteína de ligação à penicilina (LIVERMORE; WOODFORD, 2006). As beta-lactamases podem ser encontradas extracelularmente ou localizadas no espaço periplasmático da bactéria (BUSH, 1988), e podem ser codificadas por genes localizados no cromossomo bacteriano ou em elementos genéticos móveis (WALSH et al., 2005). Entre as beta-lactamases, ressalta-se, em particular, as de espectro estendido (ESBL – *Extended-Spectrum Betalactamase*) e as carbapenemases.

Mediada por plasmídios, as ESBL são capazes de hidrolisar as cefalosporinas e os monobactâmicos, mas não os carbapenêmicos e cefamicinas (BUSH; JACOBY, 2010). Os organismos capazes de produzir essas enzimas podem inativar uma gama de antibióticos beta-lactâmicos (JUNIOR; FERREIRA; CONCEIÇÃO, 2004). A partir do agravamento da resistência bacteriana a esses antimicrobianos, fez-se necessária a utilização de inibidores de ESBLs, como o ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam (WARREN et al., 2008). Diversas bactérias já demonstram resistência a antimicrobianos com esses inibidores (STAPLETON et al., 1995, RICE et al., 1993,

2000; CHIU et al., 2010).

As ESBLs são divididas, principalmente, nas famílias SHV, TEM e CTX-M (JACOBY; MUNOZ-PRICE, 2005). A maior parte delas evoluiu a partir de mutações em beta-lactamases clássicas (TEM-1, TEM-2 E SHV-1) (PATERSON; BONOMO, 2005).

A família das carbapenemases faz parte de um grupo diverso dentro das beta-lactamases, de espectro ainda mais amplo que as ESBL. Estas enzimas são capazes de inativar antibióticos beta-lactâmicos e inibidores de beta-lactamases de espectro estendido (LIVERMORE; WOODFORD, 2006). As beta-lactamases estão divididas entre as classes A a D de Ambler (1980). De acordo com essa classificação, as carbapenemases fazem parte das classes A, B e D. Para Bush e Jacoby (2010) que organizaram essas enzimas em critérios distintos aos de Ambler, as carbapenemases correspondem aos grupos 2df, 2f, 3a e 3b. As carbapenemases de classe A (grupo 2f) são amplamente disseminadas, sendo KPC e GES as mais relevantes (NORDMANN; CUZON; NAAS, 2009; QUEENAN; BUSH, 2007). As carbapenemases de classe B (grupo 3) são também denominadas metalo-beta-lactamases (M β L) e possuem genes localizados em uma diversidade de integrons, destacando-se os genes para IMPs, VIM e NDM (LIVERMORE; WOODFORD, 2006). As M β L não possuíam grande relevância até início dos anos 90 devido ao fato de serem produzidas cromossomicamente por alguns microrganismos de pouca importância clínica, os quais estavam, algumas vezes, associados com infecções oportunistas (BERTONCHELI; HÖRNER, 2008). Mas com a caracterização do gene *cfiA* (ou *CcrA*), observou-se que uma enzima M β L poderia ser mediada por elementos genéticos móveis (YAMAZOE et al., 1999).

As de classe D (grupo 2df), também chamadas de oxacilinas (OXAS), possuem menor taxa de hidrólise comparada às demais classes (WALTHER-RASMUSSEN; HØIBY, 2006; NORDMANN; NAAS; POIREL, 2011). Elas são caracterizadas como penicilinas que podem hidrolisar oxacilina e cloxacilina, sendo pouco inibidas pelo ácido clavulânico e EDTA (MOQUET et al., 2011). O OXA-48 é um dos poucos membros desta família que possui uma atividade notável de hidrólise de carbapenêmicos, sendo o gene *bla*_{OXA-48} codificado por plasmídeo e não associado a um integron, diferente da maioria dos genes das oxacilinas (POIREL et al., 2004).

3.7 Biofilme

A capacidade de formar biofilme é um importante fator de virulência em diversos gêneros bacterianos. Os biofilmes são comunidades complexas estruturadas

por microrganismos, constituídas por uma matriz de substâncias extracelulares poliméricas. Essas comunidades são sésseis, permanecendo aderidas a uma superfície e formam uma estrutura coordenada e funcional, aumentando a chance de sobrevivência microbiana. Os biofilmes maduros são envoltos por diversas substâncias e possuem canais de água que facilitam a troca de nutrientes. Após o amadurecimento do biofilme, muitas bactérias podem ser desprendidas, tornando-se planctônicas, estando livres para colonizar outros ambientes (KASNOWSKI et al., 2010)

Para ocorrer a formação do biofilme é necessário a presença do microrganismo, do glicocálix e de uma superfície. Se um destes componentes é removido, o biofilme não se desenvolve (DUNNE; JR., 2002). Há ainda outros fatores a serem considerados, como a composição da superfície, as influências dos fatores ambientais e os tipos de microrganismos envolvidos.

Diversas são as vantagens em residir na forma de biofilme, entre elas está a proteção contra anticorpos e a transmissão de elementos genéticos de diferentes espécies bacterianas, inclusive genes de resistência a antimicrobianos (DUNNE, 2002; SIB et al., 2019). Presume-se que grande parte das infecções humanas esteja associada a biofilmes bacterianos, em particular, aquelas que envolvem implantes biomédicos, como próteses e cateteres (DA SILVA TRENTIN; BRANDT GIORDANI; MACEDO, 2013). Além disso, sabe-se que o biofilme vem sendo relacionado a colites, vaginites, uretrites, conjuntivites, otites, infecções na cavidade oral e gengivite, fazendo com que o número de doenças ligadas à formação do biofilme bacteriano seja um número cada vez mais alarmante (DAVIES, 2003).

Em relação à segurança alimentar e degradação de alimentos, a formação de biofilme aumenta a carga microbiana. Na linha de produção, pode contaminar os alimentos que ali circulam em consequência do desprendimento de porções aderidas, podendo acarretar risco à saúde do consumidor e prejuízo financeiro à indústria (FLACH; KARNOPP; CORÇÃO, 2005)

Os biofilmes demonstraram ser mais resistentes aos antimicrobianos utilizados na terapia médica do que as bactérias livres. Ainda que várias explicações tenham surgido, há bastante para ser compreendido. Entre elas está o fato de que gradientes de nutrientes e de oxigênio variam do topo ao fundo dos biofilmes; esses gradientes estão associados à diminuição da atividade metabólica bacteriana e ao aumento do tempo de duplicação das células bacterianas. Essas células dormentes são responsáveis por algumas das resistências aos antibióticos (HØIBY et al., 2010). Além

das questões que incluem taxas metabólicas e de crescimento reduzido, a proteção por substâncias poliméricas extracelulares e mecanismos de resistência específicos conferidos pela fisiologia alterada das bactérias do biofilme em comparação com as bactérias planctônicas, também estão relacionadas à resistência antimicrobiana (DAVIES, 2003), assim como a ineficiência do antimicrobiano em penetrar em todas as áreas do biofilme, fazendo com que a escolha do antibiótico tenha um elevado impacto no sucesso da terapia utilizada (DAVIES, 2003; VRANY; STEWART; SUCI, 1997).

3.8 Fímbrias

As fímbrias são estruturas protéicas poliméricas localizadas na superfície das células bacterianas. Elas permitem às bactérias se ligarem a estruturas receptoras e colonizarem superfícies específicas. São encontradas mais usualmente em bactérias Gram-negativas, sendo similares aos flagelos, mas sem a função motora, constituídas por proteínas específicas como a fibrilina e pilina (KUEHN et al., 1994). Variam de algumas frações de micrômetro $> 20 \mu\text{m}$ de comprimento e variam de < 2 a 11 nm de diâmetro (DHAKAL et al., 2015).

A adesão da célula bacteriana às células hospedeiras é realizada por adesinas, sendo um importante passo para o início de uma infecção (CHEN et al., 2011). As adesinas podem ser do tipo filamentosas, como fímbrias e pili, ou não filamentosas (SOTO; HULTGREN, 1999). O pili ou fímbria foi observada pela primeira vez em investigações microscópicas eletrônicas iniciais. Em 1955, Duguid nomeou esses apêndices não flagelares de "fímbrias" (plural de latim para fio ou fibra), relacionando sua presença com a capacidade da *E. coli* de aglutinar glóbulos vermelhos (DHAKAL et al., 2015). Ainda que pili e fímbria sejam vistos como sinônimos, usualmente o termo "pili" está mais relacionado ao apêndice sexual, o qual atua na troca de material genético entre bactérias, distinguindo-se da "fímbria", também conhecida como pili comum, a qual frequentemente é o termo utilizado quando relacionado à adesão.

As fímbrias permitem que as bactérias se liguem às células hospedeiras causando um efeito pró-inflamatório, sendo consideradas um importante fator de virulência envolvido em infecções do trato urinário, e acredita-se que seja um fator de virulência em uma variedade de doenças inflamatórias crônicas (GUPTA; GUPTA; GANGULY, 1997; ETO et al., 2007; CHU; BARNES, 2010).

As fímbrias do tipo 1 são conhecidas por serem manose-sensível e as fímbrias do tipo 3, por serem manose-resistente. A fímbria do tipo 3 é capaz de realizar ligação

com as células endoteliais e epiteliais respiratórias em humanos, e ambas são importantes causadoras de doenças do trato urinário (CHEN et al., 2011; HORNICK et al., 1992; SNYDER et al., 2005). Na extremidade da fímbria tipo 1 encontra-se as adesinas fimG e fimH, que possuem grande importância na determinação da virulência em *E.coli* e em outros membros da família Enterobacteriaceae (JONES et al., 1995; SOTO; HULTGREN, 1999). As cepas de *E. coli* uropatogênicas podem expressar uma variedade de fímbrias, como a do tipo 1. Modelos animais sugeriram que a fímbria tipo 1 aumenta a sobrevivência de *E. coli* no trato urinário (ARONSON et al., 1979; HULL et al., 1999), agravando mais ainda as doenças do trato urinário causadas por esta bactéria.

Existem diversos estudos que apontam uma ligação entre a ocorrência de fímbrias e a formação de biofilme, aumentando, assim, a sobrevivência bacteriana em ambientes naturais e durante a interação com hospedeiro (LASARO et al., 2009; ONG et al., 2008a; ULETT et al., 2007). Segundo Zottola e Sasahara (1994), as células que possuem apêndices, como as fímbrias, conseguem superar a repulsão e se aproximar do substrato, ancorando-se à superfície e iniciando a produção de substâncias exopoliméricas, atuando com uma adesão celular irreversível. A fímbria do tipo 3 já foi correlacionada à formação de biofilme em *Klebsiella pneumoniae* (DI MARTINO et al., 2003), enquanto a fímbria do tipo 1 já demonstrou estar relacionada à formação do biofilme na bactéria *E. coli* (NAGY et al., 2016).

4. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos apresentados neste trabalho foram realizados no laboratório 222-F do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

4.1 Meios de cultura e soluções

Os meios de cultura e soluções utilizados nos experimentos deste estudo estão descritos nos anexos.

4.2 Área de estudos e coleta das amostras

Os isolados bacterianos utilizados no presente estudo são provenientes de amostras coletadas da Laguna de Tramandaí em um estudo prévio (LEITE, 2019). A Laguna está situada entre os municípios de Tramandaí e Imbé, na porção norte da Planície Costeira do estado 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. Essa laguna pertence à Bacia Hidrográfica do Rio Tramandaí, abrangendo dezessete municípios. A laguna de Tramandaí recebe água salgada em seu canal pela sua desembocadura, mantendo uma ligação constante com o mar, e age como escoadouro natural de drenagem do conjunto de lagos costeiros interligados em direção norte e sul (FARION, 2007). Os principais usos da água proveniente dessa bacia são para a irrigação e abastecimento público. A laguna tem um importante papel na economia local, tendo em vista a atividade pesqueira e a irrigação de lavouras de arroz. Além disso, o lugar é também utilizado para reprodução e berçário de diferentes espécies (FARION, 2007; PETERSEN, 2016), assim como para atividades de recreação.

Em estudos prévios (LEITE et al., 2019; CHAVES, 2017), as amostras foram coletadas e submetidas a crescimento com os seguintes antimicrobianos: ácido nalidíxico, ceftazidima, imipenem e tetraciclina, separadamente na concentração de 20mg/L. Todos os isolados bacterianos utilizados neste trabalho correspondem aos isolados provenientes do crescimento das amostras com tetraciclina. Esses isolados foram esgotados em ágar tripticaseína de soja suplementado com tetraciclina (20mg/L) (TSA/TET) e armazenados em glicerol para posterior identificação e caracterização.

4.3 Identificação bacteriana por provas bioquímicas e por MALDI – TOF MS

((Matrix – Assisted Laser Desorption – Ionization Time of Flight Mass Spectrometry)

Os isolados bacterianos foram recuperados em caldo BHI por 24 horas a 37°C, reisolados em ágar TSA e analisados através da coloração de Gram para confirmação de sua pureza. Foram realizados teste da catalase e prova da oxidase em bactérias Gram-negativas.

Os isolados foram identificados através da técnica de ionização e dessorção a laser assistida por matriz (Matrix-assisted laser desorption/ionization - MALDI) no software MALDI Biotyper 4.0 com base nos perfis que foram gerados. A partir de isolados bacterianos cultivados por 24h em meio de cultivo TSA, uma colônia individual de cada isolado foi transferida para uma placa-alvo MALDI-TOF. Posteriormente foram adicionados sobre cada *spot* 1 µl de solução matriz HCCA. Em seguida a placa foi disposta no Microflex LT/SH (BrukerDaltonics) para identificação. Os isolados foram reconhecidos em nível de espécie, com scores ≥ 2 .

4.4 Análises da susceptibilidade a antimicrobianos

Foram testados 16 antimicrobianos de 8 classes distintas em 33 isolados bacterianos identificados como Gram-negativos e 9 antimicrobianos de 6 classes distintas nos quatro isolados bacterianos identificados como Gram-positivos, através do método disco-difusão Kirby-Bauer em Ágar Mueller-Hinton (CLSI, 2019), conforme a tabela 11 (em anexos). Para realização desse método, os isolados foram incubados a 37°C por 24h em placas de TSA. Posteriormente, as colônias retiradas do meio TSA foram inoculadas em solução salina 0,9%, buscando atingir a turbidez de 0,5 da escala de MacFarland. Após esse procedimento, os isolados foram semeados em placas contendo Ágar Mueller-Hinton. Os antimicrobianos em discos foram dispostos nas placas semeadas e incubados por 18h a 35°C. Os halos de inibição foram medidos de acordo com seus diâmetros e os resultados foram interpretados com os critérios do CLSI (2019). Ao apresentarem resistência a pelo menos três classes diferentes de antimicrobianos, os isolados foram considerados multirresistentes. Foi utilizada a cepa *E. coli* 25922 como controle do método.

Os quatro isolados de *E. faecium* foram submetidos ao teste de concentração inibitória mínima (CIM) para o antimicrobiano vancomicina, de acordo com CLSI (2019), com modificações. O antimicrobiano foi diluído, primeiramente, em solução tampão fosfato-salino (PBS) 1X. Foram realizadas 12 diluições do antimicrobiano vancomicina em meio de cultura Ágar Mueller-Hinton pH 7,2, à temperatura de 50°C (0,25 µg/mL; 0,5 µg/mL; 1 µg/mL; 1,9 µg/mL; 3,9 µg/mL; 7,8 µg/mL; 15 µg/mL; 31 µg/mL; 62 µg/mL;

125 µg/mL; 250 µg/mL; 500 µg/mL) e foram incluídas duas placas sem os antimicrobianos como controle. Cada placa de Petry conteve 36 mL de Ágar Mueller-Hinton e 4 mL de suspensão PBS 1X, a qual continha o antimicrobiano dissolvido na concentração correspondente. Os isolados foram crescidos em BHI por 24 horas à 36°C e, posteriormente, foram cultivados em meio de cultura PCA por 24 horas à 36°C. Em seguida, as colônias retiradas do meio PCA foram inoculadas em solução PBS 1X, buscando atingir a turbidez de 0,5 da escala de MacFarland. Essas soluções bacterianas foram inoculadas em forma de gotas em cada placa de Petry, as quais continham as diferentes diluições do antimicrobiano. As placas de Petry permaneceram em temperatura ambiente até que os pontos dos inóculos fossem absorvidos pelo ágar. Em seguida, as placas foram incubadas à temperatura de 36°C por 24 horas para posterior análise dos resultados.

4.5 Formação de biofilme

A detecção e a quantificação da biomassa do biofilme foi realizada de acordo com o método Stepanovic et al. (2000) através de espectrofotometria. Os isolados bacterianos foram semeados em TSA e incubados a 37°C durante 24 horas. A partir do TSA, os isolados foram ajustados à turbidez 0,5 da escala de McFarland em solução salina 0,9% estéril. Em seguida, 20 µL destas suspensões foram adicionadas em octoplicatas juntamente com 180 µL de Caldo Soja Trypticaseína (TSB) em placas de microtitulação de 96 poços e fundo plano, sendo incubadas a 37°C por 24 horas. Para o controle positivo, utilizou-se uma suspensão de 20 µL de solução salina contendo *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 35954) e 180 µL de caldo TSB. No controle negativo foram adicionados 180 µL de caldo TSB e 20 µL de salina estéril. Os poços foram aspirados e lavados três vezes com 300 µL de solução salina estéril e as placas foram levemente agitadas, para remoção das bactérias não aderentes. As células que permaneceram aderidas ao fundo do poço e às paredes da placa foram fixadas com 200 µL de metanol 99%. Após 15 minutos, as placas foram esvaziadas e deixadas para secar para posterior coloração dos poços com 200 µL do corante cristal violeta a 1% por 5 minutos. O excesso de corante foi retirado através da lavagem dos poços com água corrente. Posteriormente, as placas permaneceram um período de tempo em temperatura ambiente para secarem. As células coradas aderidas foram solubilizadas com 160 µL de etanol (P.A.). Ao final, foi realizada a leitura da densidade óptica (OD) de cada poço em espectrofotômetro em comprimento de onda de 570 nm.

Os isolados foram classificados em quatro categorias de acordo com os valores dos biofilmes bacterianos. O ponto de corte para o teste foi definido como três desvios padrão acima da média do controle negativo cujo poço da placa conteve apenas o caldo TSB. A classificação foi interpretada da seguinte maneira: foram realizadas médias da densidade ótica de cada isolado (MDOI) e comparado com a média da densidade ótica dos controles negativos [MDO (-)]. Utilizou-se classificação de grau de formação de biofilme dividida em não formador de biofilme [$MDOI \leq MDO (-)$], fracamente formador [$MDO (-) \leq MDOI \leq 2MDO (-)$], moderadamente formador [$2MDO (-) \leq MDOI \leq 4MDO (-)$] e fortemente formador [$4MDO (-) \leq MDOI$] (STEPANOVIC et al. 2000).

4.6 Fímbria

As fímbria do tipo 1 e do tipo 3 foram analisadas através de aglutinação com mananoligossacarídeo comercial (MOS ALLTECH). Os isolados foram cultivados em caldo BHI por 3 horas e, posteriormente, em meio ágar CampyFood (CFA) por 24 horas à 37°C. Após esse período, os isolados foram suspensos em solução salina na escala 0,5 de McFarland. Para evidenciar fímbrias do tipo 1, foram adicionados 50 µL da solução de MOS (0,3% em salina) e 50 µL de suspensão bacteriana em salina e 50 µL de salina estéril em placas de 96 poços, seguida de incubação à 4°C por 24 horas. Para analisar fímbrias do tipo 3, o mesmo procedimento foi seguido, porém, ao invés de salina estéril, foram adicionados 50 µL de manose a 3% em cada poço. A temperatura e período de incubação foram os mesmos.

Os resultados foram avaliados através de um microscópio óptico com aumento de 10x. A formação de grumos somente na ausência de manose evidenciou a produção de fímbrias do tipo 1 e a formação de grumos na presença e na ausência da manose indicou a produção de fímbrias do tipo 3.

4.7 Extração de DNA

As extrações de DNA foram baseadas na metodologia descrita por Reyes-Escogido et al. (2010) com modificações. Cada isolado foi cultivado previamente em meio BHI à 37°C por 24 horas. 1.5ml da cultura bacteriana foi centrifugada a 12000 rpm por cinco minutos. Os pellets bacterianos foram lavados com 500 µl de tampão TE (10mM TRIS-Base, pH 7,5; 1mM EDTA, pH 8,0) e centrifugados novamente nas mesmas condições. As células foram ressuspensas em 50 µl de tampão de lise TES (10mM TRIS-Base, pH 7,5; 1mM EDTA, pH 8,0; 0,5% SDS), e levadas ao microondas

por 10 segundos em potência alta. Após isso, 150 µg de proteinase K (Macherey-Nagel) e 10 µg de RNase (Macherey-Nagel) foram adicionadas à suspensão e levados à estufa a 56°C por dez minutos. Então, a suspensão foi incubada por dois minutos a temperatura ambiente e 150 µl de tampão TE com 25 mg de Chelex 100 (Bio-Rad) foram adicionadas, a suspensão foi colocada no microondas nas mesmas condições citadas acima. As amostras foram, então, centrifugadas a 12000 rpm por dez minutos. O sobrenadante contendo o DNA foi passado para um novo microtubo e as amostras foram novamente centrifugadas nas mesmas condições. O novo sobrenadante contendo DNA foi utilizado para quantificação e realização de reações de PCR (contendo 2 µl por reação).

4.8 Amplificação por PCR

Todos os isolados foram submetidos a amplificação por PCR do gene do RNA ribossomal 16S. Dezesete isolados dos 37 identificados nesse trabalho foram submetidos à amplificação por PCR para os genes *bla*_{TEM}, *bla*_{GES}, *bla*_{OXA-48} e *bla*_{KPC}, pois esses isolados apresentaram amplificação do gene 16SRNA e, portanto, o DNA foi considerável de boa qualidade. Para visualização, utilizou-se gel de agarose 1,5% e corante Gel RED (QuatroG), o marcador utilizado foi LADDER 100KB (Invitrogen) e os oligonucleotídeos estão descritos na tabela 1.

Tabela 1: Oligonucleotídeos iniciadores utilizados e condições da PCR dos genes de resistência à antimicrobianos.

Gene Alvo	Primer (5'-3')	Pares de base	Anelamento	Referência
<i>bla</i> _{TEM}	TCGGGGAAATGTGCGCG TGCTTAATCAGTGAGGACCC	850	54°C	TALUKDAR et al.(2013)
<i>bla</i> _{GES}	GTTAGACGGGCGTACAAAGATAAT TGTCCGTGCTCAGGATGAG	860	58°C	JEONG et al. (2006)
<i>bla</i> _{OXA-48}	GCGTGGTTAAGGATGAACAC CATAAGTTAACCCAACCG	438	52°C	CANDAN et al. (2017)
<i>bla</i> _{KPC}	CGTCTAGTTCTGCTGTCTTG CTTGTCATCCTTGTTAGGCG	798	52°C	CANDAN et al. (2017)

Os genes de resistência e o gene RNA ribossomal 16S foram pesquisados em volume de reação final de 25µL, sendo 2 ng de DNA, 35 ciclos de amplificação para *bla*_{TEM} e 30 ciclos para *bla*_{GES}, *bla*_{OXA-48} e *bla*_{KPC} e RNA ribossomal 16S. Foram utilizados controles positivos de uso interno do laboratório para cada gene de resistência à antimicrobiano pesquisado. Os componentes das reações estão citados na tabela 2 e as características dos ciclos de amplificação na tabela 3.

Tabela 2: Concentração final dos reagentes para as reações de PCR.

	<i>bla</i> _{TEM}	<i>bla</i> _{GES}	<i>bla</i> _{OXA-48}	<i>bla</i> _{KPC}	16S
Tampão (QUATRO G)	1x	1x	1x	1x	1x
MgCl₂ (QUATRO G)	1,5mM	4mM	2,5mM	2,5mM	2,5mM
dNTP (QUATRO G)	100 µM	300µM	100µM	100µM	200µM
Oligo F (QUATRO G)	1µM	1µM	1µM	1µM	1µM
Oligo R (QUATRO G)	1µM	1µM	1µM	1µM	1µM
Taq (QUATRO G)	1U	1U	1U	1U	1U

Tabela 3: Ciclos de amplificação dos genes analisados.

	<i>bla</i> _{TEM}	<i>bla</i> _{GES}	<i>bla</i> _{OXA-48}	<i>bla</i> _{KPC}	16S
Desnaturação inicial	94°C 5 min.	94 °C 5min	94°C 2min	94°C 2min	94°C 5min
Desnaturação	94°C 45 segs.	94 °C 30s	94°C 1min	94°C 1min	94°C 1min
Anelamento	54°C 30 segs	58 °C 1min	52 °C 1min	52 °C 1min	48 °C 1min
Extensão	72°C 1 min	72°C 1min	72°C 1min	72°C 1min	72°C 1min
Extensão final	72°C 5 min	72 °C 7min	72°C 8min	72°C 8min	72°C 10min

4.9 Análise estatística

A correlação entre a capacidade de formar biofilme e a produção de fímbrias tipo 1 e tipo 3 foi analisada pelo Coeficiente de Phi, com índice de confiança $p=0.05$. Foram comparadas a formação de biofilme (forte, moderado e fraco) com os tipos de fímbria e a produção ou não de fímbria com o tipo de biofilme formado.

5. RESULTADOS

5.1 Identificação

Foram identificados 37 isolados no equipamento MALDI – TOF MS, totalizando a identificação de sete espécies distintas. Como pertencentes à espécie *Serratia marcescens* foram identificados 15 isolados, três isolados como da espécie *Pseudomonas aeruginosa*, cinco isolados da espécie *Morganella morganii*, dois isolados da espécie *Citrobacter freundii*, dois isolados da espécie *Providencia alcalifaciens*, seis isolados da espécie *E. coli* e quatro isolados da espécie *Enterococcus faecium*. Devido ao baixo número de isolados recuperados e um número não representativo por ponto de coleta, optou-se por não realizar comparações quanto à origem dos isolados e todos os resultados são da Laguna de Tramandaí como um todo.

5.2 Susceptibilidade a antimicrobianos e genes de resistência

Todos os 37 isolados foram submetidos a testes de susceptibilidade a antimicrobianos através do método de disco-difusão. Além da resistência a tetraciclina presente em todos os isolados bacterianos, as maiores taxas de resistência a antimicrobianos observadas entre as bactérias Gram-negativas foram para ampicilina (75,7%), amoxicilina-ácido clavulânico (66,6%), cefoxitina (39,4%), sulfametoxazol-trimetoprim e cloranfenicol (36,4% e 36,4%) (tabela 4). Todos os isolados Gram-negativos apresentaram suscetibilidade a piperacilina-tazobactam, ceftazidima, cefepima e imipenem. Entre os isolados Gram-positivos, todos apresentaram suscetibilidade à imipenem, nitrofurantoína, gentamicina e tigeciclina, dois isolados mostraram-se resistência à vancomicina, ampicilina, norfloxacina e estreptomicina. Foi realizado o teste CIM para os quatro isolados de *E. faecium*. Destes, um isolado (LT035, tabela 11) demonstrou ser de fato resistente à vancomicina, pois o resultado do teste da CIM realizado com esse isolado foi de 250 µg/mL, os demais isolados demonstraram CIM de 1 µg/mL. De acordo com os padrões CLSI vigente, para vancomicina, CIMs \geq 32 µg/mL, considera-se o microrganismo resistente a esse antimicrobiano.

Na tabela 5 está representado o perfil de resistência, onde 81% dos isolados apresentaram multirresistência aos antimicrobianos utilizados. Todos os isolados analisados não apresentaram os genes de resistência *bla*_{TEM}, *bla*_{GES}, *bla*_{OXA-48} e *bla*_{KPC}.

Tabela 4: Relação entre antimicrobianos, suscetibilidade e resistência, considerando o número total de isolados bacterianos Gram-negativos e sua porcentagem.

Antimicrobianos	Suscetíveis n(%)	Resistentes n(%)
Ampicilina	8 (24,2)	25 (75,7)
Amoxicilina-ácido clavulânico	11 (33,3)	22 (66,6)
Cefoxitina	20 (60,6)	13 (39,4)
Cefotaxima	32 (97)	1(3)
Aztreonam	32 (97)	1 (3)
Amicacina	31 (93)	2 (6)
Gentamicina	30 (91)	3 (9)
Cloranfenicol	21(63,6)	12 (36,4)
Sulfametoxazol-trimetoprima	21(63,6)	12 (36,4)
Norfloxacina	32 (97)	1(3)
Nitrofurantoína	23(69,7)	10(30,3)

Tabela 5: Perfil de resistência a antimicrobianos encontrados nos isolados estudados.

Perfil de resistência a antimicrobianos								<i>S. marcescens</i> n=15	<i>P.aeruginosa</i> n=3	<i>M.morganii</i> n=5	<i>C. freundii</i> n=2	<i>P. alcalifaciens</i> n=2	<i>E.coli</i> n=6	<i>E.faecium</i> n=4	
CFO	AMP	NIT	SUT	CLO	AMC	GEN	TET	1							
CFO	AMP	SUT	CLO	AMC	GEN	TET					1				
CFO	AMP	SUT	CLO	AMC	CTX	TET			1						
CFO	AMP	SUT	CLO	AMC	NIT	TET			1						
CFO	AMP	SUT	CLO	AMC	GEN	TET								1	
CFO	AMP	NOR	CLO	AMC	TET						1				
CFO	AMP	CLO	AMC	TET				1							
CFO	AMP	NIT	AMC	TET				1							
CFO	AMP	CLO	AMC	TET						2					
NIT	AMP	CLO	AMC	TET				1							
AMI	AMP	NIT	SUT	TET										1	
AMI	AMP	SUT	TET											1	
CFO	CLO	AMC	TET					1							
CFO	AMP	AMC	TET										1		
NIT	AMP	AMC	TET					4							
VAN	AMP	TET													2
NOR	EST	TET													2
AMC	AMP	TET						2							
CLO	AMC	TET								1					
CFO	AMC	TET						1							
SUT	AMP	TET						1	1					3	
ATM	TET									1					
NIT	TET							1							
AMC	TET												1		
TET								1		1					
TOTAL								15	3	5	2	2	6	4	

AMI: amicacina, AMC: amoxicilina-ácido clavulânico, AMP: ampicilina, ATM: Aztreonam, CTX: cefotaxima, CFO: cefoxitina, CLO: cloranfenicol, EST: estreptomicina, GEN: gentamicina, NIT:Nitrofurantoína, NOR:norfloxacin, PPT:piperacilina-tazobactam, SUT:sulfametoxazol-trimetoprima, TET:tetraciclina, VAN:Vancomicina

5.3 Biofilme

Os resultados de formação de biofilme, de acordo com sua intensidade, estão representados na tabela 6. Todos os isolados analisados apresentaram formação de biofilme, e, em sua maioria, mostraram-se forte ou moderados produtores. Foram 37 isolados analisados, obtendo-se um percentual de 43,2% classificados como forte formador de biofilme, 35,1% como moderado e 21,6% como fraco formador. A tabela 7 traz uma relação entre o nome dado aos isolados (identificados conforme tabela 11), perfil de resistência e a intensidade do biofilme. O nome dos isolados estão na devida ordem de acordo com a disposição da intensidade do biofilme mostrado. Das 37 bactérias analisadas, 23 foram considerados fortes ou moderados formadores de biofilme e multirresistentes.

Tabela 6: Relação entre espécies e a intensidade da formação de biofilme.

Espécies	Forte	Moderado	Fraco	Total
<i>S. marcescens</i>	9	3	3	15
<i>P. aeruginosa</i>	2	-	1	3
<i>M. morgani</i>	4	-	1	5
<i>C. freundii</i>	-	1	1	2
<i>P. alcalifaciens</i>	-	2	-	2
<i>E.coli</i>	1	5	-	6
<i>E. faecium</i>	-	2	2	4
Total	16	13	8	37

Tabela 7: Relação entre a identificação do isolado, perfil de resistência aos antimicrobianos e a intensidade do biofilme.

Nome do isolado	Perfil de resistência a antimicrobianos								Intensidade do biofilme		
	CFO	AMP	NIT	SUT	CLO	AMC	GEN	TET	Forte	Moderado	Fraco
LT002	CFO	AMP	NIT	SUT	CLO	AMC	GEN	TET	1		
LT024	CFO	AMP	SUT	CLO	AMC	GEN	TET			1	
LT016	CFO	AMP	SUT	CLO	AMC	CTX	TET				1
LT017	CFO	AMP	SUT	CLO	AMC	NIT	TET	1			
LT029	CFO	AMP	SUT	CLO	AMC	GEN	TET				1
LT025	CFO	AMP	NOR	CLO	AMC	TET					1
LT014	CFO	AMP	CLO	AMC	TET			1			
LT005	CFO	AMP	NIT	AMC	TET					1	
LT021; LT022	CFO	AMP	CLO	AMC	TET			2			
LT010	NIT	AMP	CLO	AMC	TET			1			
LT031	AMI	AMP	NIT	SUT	TET					1	
LT030	AMI	AMP	SUT	TET						1	
LT006	CFO	CLO	AMC	TET							1
LT026	CFO	AMP	AMC	TET						1	
LT003;LT004; LT007; LT013	NIT	AMP	AMC	TET				4			
LT034; LT032	VAN	AMP	TET							2	
LT035; LT037	NOR	EST	TET								2
LT012; LT015	AMC	AMP	TET					1	1		
LT019	CLO	AMC	TET					1			
LT001	CFO	AMC	TET					1			
LT018; LT028; LT032;LT033; LT011	SUT	AMP	TET					1	3		1
LT020	ATM	TET									1
LT008	NIT	TET						1			
LT027	AMC	TET								1	
LT009; LT023	TET							1	1		
TOTAL									16	13	8

5.4 Fímbrias

Todos os 33 isolados Gram-negativos foram analisados quanto à presença de fímbria do tipo 1 e fímbria do tipo 3 através de aglutinação com mananoligossacarídeo comercial (MOS) e 51,5% dos isolados apresentaram uma das fímbrias analisadas. Conforme demonstrado na tabela 8, a fímbria do tipo 3 foi encontrada em maior quantidade que a fímbria do tipo 1. Os isolados que mais apresentaram alguma das fímbrias analisadas foram das espécies *S. marcescens* e *E. coli*. A tabela 9 apresenta a relação entre a formação do biofilme e a presença de fímbrias. Não se verificou uma correlação significativa entre as cepas produtoras de fímbrias do tipo 1 e 3 e a produção de biofilme ($p < 0,05$).

Tabela 8: Relação entre espécies Gram-negativas e presença ou ausência de fímbrias do tipo 1 e fímbrias do tipo 3.

Espécie	Fímbria 1	Fímbria 3	Ausência de ambas as fímbrias	Total
<i>S.marcescens</i>	4	6	5	15
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	3	3
<i>M. morgani</i>	-	1	4	5
<i>C. freundii</i>	-	-	2	2
<i>P.alcalifaciens</i>	1	1	2	2
<i>E.coli</i>	1	3	2	6

Tabela 9: Relação entre a intensidade do biofilme e a presença e ausência de fímbrias.

Classificação	Fímbria I n (%)	Fímbria III n (%)	Sem fímbria n (%)	Total
Forte	2(6)	6(18,2)	8(24,2)	16
Moderado	3(9)	4(12,1)	4(12,1)	11
Fraco	1(3)	1(3)	4(12,1)	6
Total	6	11	16	33

6. DISCUSSÃO

Foram identificadas nesse trabalho sete espécies distintas consideradas comuns em ambiente aquático. Segundo Berendonk et al. (2015), espécies como *E.coli*, *P. aeruginosa* e *E. faecium*, encontradas nesse estudo, são boas indicadoras para avaliar o status de resistência a antibióticos em ambientes. *P. aeruginosa* é uma bactéria que caracteristicamente é encontrada em diversos tipos de ambientes, enquanto *E.coli* tem íntima associação com hospedeiros, considerada um colifome assim como *E. faecium*, sendo as duas indicadores de qualidade da água. Segundo o autor, desta maneira pode-se analisar a resistência que está sendo inserida no meio ambiente por poluição e a resistência presente no ambiente.

A resistência a um agente antimicrobiano muitas vezes implica em resistência cruzada com outros agentes similares; plasmídeos e transposons geralmente são mediadores de mais de uma resistência e os microrganismos podem tornar-se resistentes a drogas de distintas classes, transferindo a resistência para diferentes gêneros bacterianos (VAZ, 2009). A diminuição da expressão da proteína OmpF, responsável pelo transporte passivo localizado na membrana externa, a qual pode levar a resistência à tetraciclina (PUGSLEY; SCHNAITMAN, 1978), pode também levar a resistência à quinolonas (HIRAI et al., 1986), cloranfenicol (REEVE; DOHERTY, 1968) e beta-lactâmicos (HARDER; NIKAIDO; MATSUHASHI, 1981). Sendo assim, a escolha prévia de resistentes à tetraciclina poderia indicar resistências também a outros antimicrobianos. As bactérias analisadas apresentaram resistência ao cloranfenicol (36,4% em Gram-negativas), à quinolonas, como norfloxacin (50% em Gram-positivas) e, de forma mais proeminente, aos beta-lactâmicos ampicilina e amoxicilina associada ao ácido clavulânico (75,7% e 66,6%, respectivamente, em Gram-negativas), assim como apresentaram, em um percentual menor, resistência a outros beta-lactâmicos avaliados.

P. aeruginosa tem se destacado como uma bactéria amplamente resistente aos diferentes antimicrobianos, restando poucas alternativas de terapia. A utilização de piperacilina, ceftazidima, cefepima, imipenem, aztreonam, gentamicina e ampicilina são algumas possibilidades de tratamento (TASSIOS et al., 1998), porém, com a crescente resistência, as opções acabam se limitando aos carbapenêmicos, como o imipenem. Dessa forma, a resistência ao imipenem é uma questão de saúde pública, tendo em vista que sua utilização é empregada como último recurso no tratamento infecções

hospitalares (NEVES et al., 2011). Todos os isolados bacterianos analisados demonstraram suscetibilidade ao imipenem, e todos os isolados Gram-negativos foram suscetíveis à piperacilina tazobactam, ceftazidima, cefepima, demonstrando que, no caso de *P. aeruginosa*, possivelmente a modificação das porinas na membrana externa ou a produção de carbapenemases, duas formas freqüentes de resistência aos carbapenêmicos (SANTOS; NOGUEIRA; MENDONÇA, 2015) não estavam presentes. Contudo, os três isolados de *P. aeruginosa* apresentaram multirresistência e dois deles resistência a sete antimicrobianos distintos, reforçando a ampla resistência encontrada frequentemente nessa espécie.

A ampla suscetibilidade encontrada aos antimicrobianos beta-lactâmicos imipenem, piperacilina tazobactam, ceftazidima e cefepima pode ser devido ao fato de que alguns pontos de coleta foram em locais mais afastados da ampla urbanização e liberação de dejetos. A piperacilina- tazobactam possui uma alta eficiência na ligação e inibição das enzimas ESBL, mostrando-se muito potente em relação a outros antimicrobianos, condizendo com os resultados encontrados na literatura (SÁNCHEZ et al., 2004; STREIT et al., 2004; HARKLESS et al., 2005; PATERSON; BONOMO, 2005). Ceftazidima e cefepima são antimicrobianos muito utilizados na terapias contra Gram-negativas (KING; BOOTHMAN; PHILLIPS, 1990; STREIT et al., 2004). Segundo CUNHA e GILL (1995), cefepima apresenta baixo nível de resistência cruzada com cefalosporinas de terceira geração e baixa propensão à seleção de mutantes resistentes, oferecendo baixo potencial para indução de resistência bacteriana. Contudo, a resistência à cefepima vem sendo relatada em estudos mais recentes, sobretudo encontrada em *P. aeruginosa* (MULLER; PLÉSIAT; JEANNOT, 2011). Os isolados analisados demonstraram alta sensibilidade à amicacina e à gentamicina (93% e 91% de suscetibilidade entre os Gram-negativos, respectivamente). Ambos são aminoglicosídeos potentes de ampla utilização e têm como alvo o ribossomo bacteriano, onde se ligam ao sítio A e interrompem a síntese protéica (JANA; DEB, 2006). São especialmente ativos contra bactérias Gram-negativas aeróbias, de acordo com os resultados obtidos, mas também atuam contra certos organismos Gram-positivos, como a suscetibilidade vista em todos os isolados de *E. faecium* à gentamicina, onde utilizou-se uma concentração mais alta de gentamicina (120 µg) do que o utilizado em bactérias Gram-negativas (10 µg).

Entre os antimicrobianos testados, a ampicilina foi a que apresentou o maior percentual de resistência, chegando a 75,7% nos isolados Gram-negativas e metade

dos isolados Gram-positivos. Outros trabalhos demonstraram resultados similares para isolados provenientes de ambientes aquáticos (HARNISZ; GOŁAŚ; PIETRUK, 2011; NUNES, 2017, CHAVES, 2017). Estudos demonstraram que a resistência à ampicilina encontrada em *E. faecium*, única espécie Gram-positiva analisada nesse estudo, pode ser devido à produção de beta-lactamases mediadas por plasmídios transferíveis ou por modificações das proteínas ligadoras de penicilinas (TAVARES, 2000). Um estudo sugeriu que o aumento da resistência à ampicilina começou mesmo anos antes do antibiótico ser lançado no mercado farmacêutico, aludindo que os resíduos desse antibiótico em ambientes agrícolas, tais como solo, águas residuais e esterco, poderiam ter um impacto muito maior na disseminação da resistência do que se pensava anteriormente (TRAN-DIEN et al., 2018). Os dados desse estudo confirmam a abrangente resistência a esse antimicrobiano utilizado de maneira tão ampla desde a década de 60.

Uma alta taxa de resistência foi observada nos isolados submetidos à amoxicilina associada ao ácido clavulânico (66,6%). A amoxicilina já foi, e ainda é, um dos antibióticos mais amplamente utilizados e, portanto, condiz sua alta taxa de resistência analisada em diversos estudos (ARDILA; LÓPEZ; GUZMÁN, 2010; NISHIZAWA et al., 2011). Porém, a adição de ácido clavulânico mudou esse cenário, tendo em vista que o mesmo apresenta atividade inibidora de enzimas beta-lactamases que degradam a amoxicilina (OLIVEIRA et al., 2009), ampliando muito mais sua ação. A alta resistência a amoxicilina ácido clavulânico em bactérias ambientais, é, portanto, preocupante, e a frequente administração desse antimicrobiano pode ser um dos importantes fatores que contribuem para a ampliação de sua resistência.

Altas taxas de resistência à ampicilina, amoxicilina associado ao ácido clavulânico e nitrofurantoína podem ser explicadas para *S. marcescens* devido à resistência intrínseca dessa bactéria a esses antimicrobianos (CLSI, 2019), ainda que nem todos os isolados tenham demonstrado essa resistência. Todas as *P. aeruginosas* demonstraram resistência à ampicilina e sulfametoxazol-trimetoprima, o que está condizente com a literatura, tendo em vista que há uma diminuição da entrada do antibiótico na célula nessa espécie, levando a concentrações intracelulares muito baixas (MICHIGAN STATE UNIVERSITY, 2011).

Dos quatro isolados de *E. faecium* analisados, dois apresentaram resistência à vancomicina no teste disco-difusão de Kirby-Bauer primeiramente. Tendo em vista a falta de confiabilidade do teste disco-difusão Kirby-Bauer para verificar a resistência

microbiana a vancomicina, foi realizado o teste de concentração inibitória mínima (CIM) para os quatro isolados de *E. faecium*. Destes, um isolado demonstrou resistência à vancomicina, tendo um elevado valor de CIM. Há muito tempo a vancomicina é considerada um antibiótico poderoso frente a bactérias Gram-positivas, vista como o último recurso em bactérias que apresentam multirresistência, e a resistência em *Enterococcus* não é muito frequente, sobretudo em bactérias ambientais. Tal tranquilidade quanto à eficácia desse antibiótico trouxe até mesmo uma desaceleração nos investimentos de empresas farmacêuticas em programas de criação e desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos similares (VARALDO, 2002; SILVEIRA et al., 2006). Contudo, desde sua descoberta na Inglaterra e na França em 1986, *Enterococcus* que são resistentes à vancomicina têm se tornado uma preocupação mundial, considerados importantes patógenos nosocomiais em pessoas imunodeficientes (LECLERCQ et al., 1988; UTTLEY et al., 1988; O'DRISCOLL; CRANK, 2015) .

A resistência à tetraciclina, presente em todos os isolados desse estudo, foi escolhida pelo fato de poder ser uma resistência adquirida, através de elementos genéticos móveis portadores de genes de resistência, mutações dentro do sítio de ligação ribossomal e/ou mutações cromossômicas que levam à expressão aumentada de mecanismos de resistência intrínseca (GROSSMAN, 2016) e de ser amplamente disseminada no ambiente, não somente em hospitais. Além disso, este antimicrobiano foi extensivamente utilizado como promotor de crescimento na produção animal no mundo todo, o que levou a disseminação de determinantes de resistência no ambiente por vários anos (LIPSITCH; SINGER; LEVIN, 2002). Os resíduos deste antimicrobiano foram encontrados em ambiente aquático e solo associados a produção animal. A disseminação de cepas resistentes foi associada à concentrações subletais destes antimicrobianos (ANDERSSON; HUGHES, 2014). Na laguna de Tramandaí não foram detectados resíduos de antimicrobianos, todavia foram detectados resíduos de agrotóxicos, os quais podem favorecer a permanência de bactérias resistentes (LEITE et al., 2019).

Ainda que parte dos isolados tenham apresentado resistência a beta-lactâmicos, nenhum gene de resistência pesquisado relacionado aos mesmos foi encontrado nos isolados analisados. Outros genes de resistência à beta-lactâmicos, diferente dos pesquisados nesse trabalho, também são responsáveis pela resistência bacteriana, e os genes analisados podem não estar relacionados à resistência

apresentada pelos isolados. Aproximadamente 40% das bactérias que apresentam resistência a antimicrobianos utilizam bombas de efluxo para inativá-los (CHEVALIER et al., 2008). Assim, também é possível inferir que outros genes, como os de bomba de efluxo, possam ser os responsáveis por esses fenótipos resistentes. Além disso, a diminuição da expressão de porinas, condição que não foi analisada, também está relacionada à resistência antimicrobiana em bactérias, sobretudo nas Gram-negativas (FERNANDO; ZHANEL; KUMAR, 2013).

Dos 37 isolados analisados, 81% apresentaram multirresistência a antimicrobianos, que é uma das grandes preocupações de saúde pública, tendo em vista que ao entrarem em contato com os seres humanos, as bactérias multirresistentes podem não ser combatidas por nenhum medicamento. A capacidade de permanecer no ambiente e em reservatório humano, a aquisição de plasmídeos, transposons e integrons, assim como a resistência intrínseca, são elementos que favorecem o fenótipo de multirresistência (VILA; MARTÍ; SÁNCHEZ-CÉSPEDES, 2007). Assim, a contaminação de ambientes aquáticos, como a Laguna de Tramandaí, deve ser constantemente monitorada, tendo em vista o elevado contato das suas águas com a população humana, sua possível atuação como reservatório de resistência a antimicrobianos e a alta presença de multirresistência encontrada entre os isolados analisados, o que sugere que os mesmos podem estar contribuindo para a manutenção e disseminação da resistência nesse ambiente.

Todos os isolados mostraram-se formadores de biofilme nas condições que foram submetidos, com uma alta taxa de fortes e moderados formadores (43,2% e 35,1%, respectivamente). Bactérias com elevada capacidade de formar biofilme podem causar infecções persistentes se apresentarem patogenicidade e são difíceis de erradicar. A capacidade das bactérias de formar biofilme está intimamente ligada à sobrevivência e permanência de bactérias em diversos ambientes. Levando em consideração que muitos estudos já associaram biofilme e resistência antimicrobiana (LEWIS, 2001; MAH; O'TOOLE, 2001; SIB et al., 2019), a capacidade bacteriana de formar biofilme pode estar relacionada à persistência de microrganismos resistentes a antimicrobianos no ambiente e a possível disseminação dessas cepas para os seres humanos. Entre as bactérias analisadas, 62,1% foram consideradas forte ou moderada formadoras de biofilme e multirresistentes. Ainda que microrganismos resistentes a antimicrobianos possam não apresentar virulência, sabe-se que, muitas vezes, genes de resistência que emergem clinicamente podem ter suas origens em bactérias não

patogênicas (THAKER; SPANOGIANNOPOULOS; WRIGHT, 2010; TORRES, 2010). O biofilme propicia um ambiente adequado para a aquisição de genes de resistência, possibilitando a interação entre microrganismos que serviriam de reservatórios de genes.

Diversos estudos já relacionaram a presença de fímbrias e a formação de biofilme (O'TOOLE; KOLTER, 1998; PRATT; KOLTER, 1998; DI MARTINO et al., 2003; ONG et al., 2008). A fímbria serviria como um facilitador na aderência bacteriana, tendo em vista que a adesão à superfície é o primeiro passo essencial na formação de biofilme e as adesinas fimbriais podem desempenhar um papel importante nos passos posteriores do desenvolvimento do biofilme, promovendo o contato célula-célula (SCHROLL et al., 2010). Entre os isolados Gram-negativos, 25,4% apresentaram algum tipo de fímbria pesquisada e forte formação de biofilme, e 21,1% apresentaram fímbria e moderada formação. Porém, não se verificou uma correlação significativa entre as cepas produtoras de fímbrias do tipo 1 e 3 e a produção de biofilme ($p < 0,05$).

A presença de fímbrias na maioria das cepas bacterianas sugere que estas organelas desempenham um papel importante no ciclo de vida das bactérias (CLEGG; GERLACH, 1987), sobretudo na sua patogenicidade. A fímbria do tipo 3 foi encontrada em maior quantidade que a fímbria do tipo 1, especialmente em *S. marcescens* e *E. coli*. Entre os quinze isolados de *S. marcescens*, seis apresentaram fímbria do tipo 1 e seis do tipo 3, o que está em concordância com outros estudos que demonstram que as cepas de *Serratia* possuem a capacidade de produzir uma variedade de tipos fimbriais distintos (ADEGBOLA; OLD, 1982; OLD; ADEGBOLA; SCOTT, 1983). Dos seis isolados de *E. coli*, um apresentou fímbria do tipo 1, e três fímbria do tipo 3. Historicamente, as fímbrias do tipo 3 não foram associadas à *E. coli* (MOL; OUDEGA, 1996; SCHROLL et al., 2010), porém, estudos vêm relatando a presença de fímbrias do tipo 3 em cepas de *E. coli*, tendo sua expressão codificada por plasmídeos conjugativos (BURMOLLE et al., 2008; ONG et al., 2008). Não foi encontrada fímbria do tipo 1 ou do tipo 3 em isolados de *P. aeruginosa*, o que é condizente com a literatura, tendo em vista que essa espécie apresenta outros tipos de fímbrias, como a fímbria do tipo 4 (ASIKYAN; KUS; BURROWS, 2008; HOBBS et al., 1993; MATTICK; WHITCHURCH; ALM, 1996). Os demais isolados analisados que não apresentaram fímbria do tipo 1 ou do tipo 3, podem ou não expressar nenhuma fímbria ou estar expressando fímbrias de outro tipo não analisadas.

7. CONCLUSÃO

1. Foram recuperados e identificados 37 isolados bacterianos de 7 espécies distintas (*S. marscescens*, *P. aeruginosa*, *M. morgani*, *C. freundii*, *P. alcalifaciens*, *E. coli* e *E. faecium*), provenientes da Laguna de Tramandaí e selecionados na presença de tetraciclina. Entre esses isolados, os mais frequentes foram *S. marscescens* e *E. coli*.
2. Os 37 isolados apresentaram suscetibilidade ao Imipenem. Todos os Gram-negativos apresentaram suscetibilidade à piperacilina tazobactam, ceftazidima e cefepima e os Gram-positivos à nitrofurantoína, gentamicina e tigeciclina. A ampicilina apresentou uma das maiores porcentagens de resistência, assim como a amoxicilina ácido clavulânico entre os Gram-negativos e 81% dos isolados apresentam multirresistência.
3. Todas as espécies Gram-negativas investigadas foram formadoras de biofilme e quase metade apresentou forte formação. Aproximadamente metade dos isolados apresentaram uma das fímbrias analisadas (tipo 1 ou tipo 3), sendo a fímbria do tipo 3 mais encontrada que a fímbria do tipo 1. Os isolados que mais apresentaram uma das fímbrias, na proporção, foram das espécies *S. marscescens* e *E. coli*. Não houve relação significativa entre as fímbrias encontradas e produção de biofilme.
4. Entre os isolados analisados, nenhum apresentou genes de resistência para *bla*_{TEM}, *bla*_{GES}, *bla*_{OXA-48} e *bla*_{KPC}, o que poderia indicar que outros genes possam estar relacionados aos fenótipos resistentes encontrados.
5. Pelos resultados obtidos nesse estudo pode-se inferir que a maioria dos isolados encontrados, devido ao fenótipo de multirresistência apresentado, pode estar contribuindo para a manutenção e disseminação da resistência aos antimicrobianos no ambiente.

8. REFERÊNCIAS

- ADEGBOLA, R. A.; OLD, D. C. New fimbrial hemagglutinin in *Serratia* species. **Infection and immunity**, v. 38, n. 1, p. 306–15, out. 1982.
- ALBERT, M. J.; FARUQUE, A. S.; MAHALANABIS, D. Association of *Providencia alcalifaciens* with diarrhea in children. **Journal of clinical microbiology**, v. 36, n. 5, p. 1433–5, 1 maio 1998.
- ALVAREZ-ORTEGA, C. et al. The intrinsic resistome of *Pseudomonas aeruginosa* to β -lactams. **Virulence**, v. 2, n. 2, p. 144–146, 28 mar. 2011.
- AMBLER, R. P. The Structure of β -Lactamases. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 289, n. 1036, p. 321–331, 16 maio 1980.
- ANDERSSON, D. I.; HUGHES, D. Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics. **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, n. 7, p. 465–478, 27 jul. 2014.
- ANDRADE, L. N. Estudo fenotípico e molecular de beta-lactamases de espectro estendido e AmpC em enterobactérias isoladas de pacientes com suspeita de meningite. **Tese de Doutorado, Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo**, p. 85, 2008.
- ARDILA, C. M.; LÓPEZ, M. A.; GUZMÁN, I. C. High resistance against clindamycin, metronidazole and amoxicillin in *Porphyromonas gingivalis* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* isolates of periodontal disease. **Medicina oral, patologia oral y cirugía bucal**, v. 15, n. 6, p. e947-51, 1 nov. 2010.
- ARONSON, M. et al. Prevention of Colonization of the Urinary Tract of Mice with *Escherichia coli* by Blocking of Bacterial Adherence with Methyl -D-Mannopyranoside. **Journal of Infectious Diseases**, v. 139, n. 3, p. 329–332, 1 mar. 1979.
- ASIKYAN, M. L.; KUS, J. V.; BURROWS, L. L. Novel proteins that modulate type IV pilus retraction dynamics in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of bacteriology**, v. 190, n. 21, p. 7022–34, 1 nov. 2008.
- BAKER-AUSTIN, C. et al. Co-selection of antibiotic and metal resistance. **Trends in Microbiology**, v. 14, n. 4, p. 176–182, 1 abr. 2006.
- BAPTISTA, M. G. DE F. M. **Mecanismos de Resistência aos Antibióticos - Maria Galvão Baptista (20071294)**. [s.l.] Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia, 2013.
- BARLOW, M.; HALL, B. G. Origin and evolution of the AmpC beta-lactamases

of *Citrobacter freundii*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 46, n. 5, p. 1190–8, 1 maio 2002.

BERENDONK, T. U. et al. Tackling antibiotic resistance: the environmental framework. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 5, p. 310–317, 30 maio 2015.

BERTONCHELI, C. DE M.; HÖRNER, R. Uma revisão sobre metalo- β -lactamases. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 4, p. 577–599, dez. 2008.

BOUND, J. P.; VOULVOULIS, N. Pharmaceuticals in the aquatic environment—a comparison of risk assessment strategies. **Chemosphere**, v. 56, n. 11, p. 1143–1155, 1 set. 2004.

BREIDENSTEIN, E. B. M.; DE LA FUENTE-NÚÑEZ, C.; HANCOCK, R. E. W. *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. **Trends in Microbiology**, v. 19, n. 8, p. 419–426, ago. 2011.

BURMOLLE, M. et al. Type 3 fimbriae, encoded by the conjugative plasmid pOLA52, enhance biofilm formation and transfer frequencies in Enterobacteriaceae strains. **Microbiology**, v. 154, n. 1, p. 187–195, 1 jan. 2008.

BUSH, K. Beta-lactamase inhibitors from laboratory to clinic. **Clinical microbiology reviews**, v. 1, n. 1, p. 109–23, jan. 1988.

BUSH, K.; JACOBY, G. A. Updated functional classification of beta-lactamases. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 54, n. 3, p. 969–76, mar. 2010.

CANDAN, E. D. et al. *Escherichia Coli*: Characteristics of Carbapenem Resistance and Virulence Factors. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 60, n. 0, 2017.

CAVALLO, J. D. et al. Mechanisms of beta-lactam resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: prevalence of OprM-overproducing strains in a French multicentre study (1997). **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 50, n. 6, p. 1039–1043, 1 dez. 2002.

CHAPMAN, J. S. Disinfectant resistance mechanisms, cross-resistance, and co-resistance. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 51, n. 4, p. 271–276, 1 jun. 2003.

CHAVES, M. A. DE. **Perfil de suscetibilidade em bastonetes gram negativos não fermentadores isolados de amostra de água superficial submetida a tratamento com antimicrobiano**. Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente - Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. 69p. 2017.

CHEN, F.-J. et al. Structural and Mechanical Properties of *Klebsiella pneumoniae* Type 3 Fimbriae. **Journal of Bacteriology**, v. 193, n. 7, p. 1718–1725, 1 abr. 2011.

CHEN, S. et al. Heavy Metal Induced Antibiotic Resistance in Bacterium LSJC7. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 10, p. 23390–23404, 29 set. 2015.

CHEVALIER, J. et al. Identification and Evolution of Drug Efflux Pump in Clinical *Enterobacter aerogenes* Strains Isolated in 1995 and 2003. **PLoS ONE**, v. 3, n. 9, p. e3203, 12 set. 2008.

CHIU, C.-H. et al. Mechanisms of resistance to ciprofloxacin, ampicillin/sulbactam and imipenem in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in Taiwan. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 35, n. 4, p. 382–386, 1 abr. 2010.

CHOPRA, I.; ROBERTS, M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 65, n. 2, p. 232–60 ; second page, table of contents, 1 jun. 2001.

CHU, D.; BARNES, D. J. Modeling fimbriae mediated parasite–host interactions. **Journal of Theoretical Biology**, v. 264, n. 4, p. 1169–1176, 21 jun. 2010.

CHUANCHUEN, R. et al. Cross-Resistance between Triclosan and Antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* Is Mediated by Multidrug Efflux Pumps: Exposure of a Susceptible Mutant Strain to Triclosan Selects *nfxB* Mutants Overexpressing *MexCD-OprJ*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 2, p. 428–432, 1 fev. 2001.

CLEGG, S.; GERLACH, G. F. Enterobacterial Fimbriae. **JOURNAL OF BACTERIOLOGY**, v. 169, n. 3, p. 934–938, 1987.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI) 2019. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility testing: Twentieth informational supplement. January 2019; Clinical And Laboratory Standards Institute, Wayne, PA CLSI document M100-S20, 30(1), replaces M100-S19,29(3).

COX, C. E. Aztreonam therapy for complicated urinary tract infections caused by multidrug-resistant bacteria. **Reviews of infectious diseases**, v. 7 Suppl 4, p. S767–71, 1985.

CUNHA, B. A.; GILL, M. V. Cefepime. **The Medical clinics of North America**, v. 79, n. 4, p. 721–32, jul. 1995.

DA SILVA TRENTIN, D.; BRANDT GIORDANI, R.; MACEDO, A. J. Biofilmes

bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate1. **Revista Liberato**, v. 14, n. 22, p. 213–236, 2013.

DAGHRIR, R.; DROGUI, P. Tetracycline antibiotics in the environment: a review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 11, n. 3, p. 209–227, 1 set. 2013.

DAVIES, D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, n. 2, p. 114–122, fev. 2003.

DHAKAL, B. K. et al. Pili, Fimbriae. **Reference Module in Biomedical Sciences**, 1 jan. 2015.

DI MARTINO, P. et al. Klebsiella pneumoniae type 3 pili facilitate adherence and biofilm formation on abiotic surfaces. **Research in microbiology**, v. 154, n. 1, p. 9–16, 2003.

DORAN, T. I. The Role of Citrobacter in Clinical Disease of Children: Review. **Clinical Infectious Diseases**, v. 28, n. 2, p. 384–394, fev. 1999.

DOS SANTOS, G. S. et al. **Study of the Enterobacteriaceae Group CESP (Citrobacter, Enterobacter, Serratia, Providencia, Morganella and Hafnia): A Review.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://pdfs.semanticscholar.org/143e/e9f2c91bcb7c645f42bc61464365b440c0f3.pdf>>. Acesso em: 12 jul. 2019.

DUCEPPE, M.-O. et al. Draft Genome Sequences of Eight Canadian Citrobacter braakii and Citrobacter freundii Strains. **Microbiology resource announcements**, v. 8, n. 27, p. e00273-19, 3 jul. 2019.

DUNNE, W. M. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? **Clinical microbiology reviews**, v. 15, n. 2, p. 155–66, abr. 2002.

DUNNE, W. M.; JR. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? **Clinical microbiology reviews**, v. 15, n. 2, p. 155–66, abr. 2002.

DURIEZ, P. et al. Commensal Escherichia coli isolates are phylogenetically distributed among geographically distinct human populations. **Microbiology**, v. 147, n. 6, p. 1671–1676, 1 jun. 2001.

ETO, D. S. et al. Integrin-Mediated Host Cell Invasion by Type 1–Piliated Uropathogenic Escherichia coli. **PLoS Pathogens**, v. 3, n. 7, p. e100, 2007.

FARION, S. R. **Ágora : revista do Departamento de História e Geografia.** [s.l: s.n.]. v. 13

FERNANDO, D.; ZHANEL, G.; KUMAR, A. Antibiotic Resistance and Expression Of Resistance-Nodulation-Division Pump- and Outer Membrane Porin-

Encoding Genes in *Acinetobacter* Species Isolated from Canadian Hospitals. **Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology**, v. 24, n. 1, p. 17–21, 2013.

FEYZIOĞLU, B. et al. **Investigation of Antibiotic Resistance Rates of *Providencia stuartii* isolated from Various Clinical Samples**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <www.usa-journals.com>. Acesso em: 17 jul. 2019.

FINLAY, B. B.; FALKOW, S. Common themes in microbial pathogenicity revisited. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 61, n. 2, p. 136–69, jun. 1997.

FLACH, J.; KARNOPP, C.; CORÇÃO, G. Biofilmes formados em materia-prima em contato com leite: fatores de virulência envolvidos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, n. 3, p. 291–296, 2005.

GAO, P. et al. Occurrence of sulfonamide and tetracycline-resistant bacteria and resistance genes in aquaculture environment. **Water Research**, v. 46, n. 7, p. 2355–2364, 1 maio 2012.

GARRITY, G.; BRENNER, D. J.; STALEY, J. T. **Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. 2. The proteobacteria. Part B, the gammaproteobacteria**. [s.l.] Springer, 2005.

GEORGE, A. M.; LEVY, S. B. Amplifiable resistance to tetracycline, chloramphenicol, and other antibiotics in *Escherichia coli*: involvement of a non-plasmid-determined efflux of tetracycline. **Journal of bacteriology**, v. 155, n. 2, p. 531–40, 1 ago. 1983.

GOLOB, M. et al. Antimicrobial Resistance and Virulence Genes in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* from Humans and Retail Red Meat. **BioMed research international**, v. 2019, p. 2815279, 2019.

GROSSMAN, T. H. Tetracycline Antibiotics and Resistance. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 6, n. 4, p. a025387, 1 abr. 2016.

GULLBERG, E. et al. Selection of resistant bacteria at very low antibiotic concentrations. **PLoS pathogens**, v. 7, n. 7, p. e1002158, jul. 2011.

GUPTA, R.; GUPTA, S.; GANGULY, N. K. Role of type-1 fimbriae in the pathogenesis of chronic pyelonephritis in relation to reactive oxygen species. **Journal of Medical Microbiology**, v. 46, n. 5, p. 403–406, 1 maio 1997.

HANCOCK, R. E. W. Resistance Mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and Other Nonfermentative Gram-Negative Bacteria. **Clinical Infectious Diseases**, v. 27, n. s1, p. S93–S99, ago. 1998.

HARDER, K. J.; NIKAIDO, H.; MATSUHASHI, M. Mutants of *Escherichia coli* that are resistant to certain beta-lactam compounds lack the ompF porin. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 20, n. 4, p. 549–52, 1 out. 1981.

HARKLESS, L. et al. An Open-Label, Randomized Study Comparing Efficacy and Safety of Intravenous Piperacillin/Tazobactam and Ampicillin/Sulbactam for Infected Diabetic Foot Ulcers. **Surgical Infections**, v. 6, n. 1, p. 27–40, 2 mar. 2005.

HARNISZ, M.; GOŁAŚ, I.; PIETRUK, M. Tetracycline-resistant bacteria as indicators of antimicrobial resistance in protected waters—The example of the Drwęca River Nature Reserve (Poland). **Ecological Indicators**, v. 11, n. 2, p. 663–668, 1 mar. 2011.

HEJAZI, A.; FALKINER, F. R. *Serratia marcescens*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 46, n. 11, p. 903–912, 1 nov. 1997.

HIRAI, K. et al. Differences in susceptibility to quinolones of outer membrane mutants of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 29, n. 3, p. 535–8, mar. 1986.

HOBBS, M. et al. PilS and PilR, a two-component transcriptional regulatory system controlling expression of type 4 fimbriae in *Pseudomonas aeruginosa*. **Molecular Microbiology**, v. 7, n. 5, p. 669–682, 1 mar. 1993.

HØIBY, N. et al. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 35, n. 4, p. 322–332, 1 abr. 2010.

HORNICK, D. B. et al. Adherence to respiratory epithelia by recombinant *Escherichia coli* expressing *Klebsiella pneumoniae* type 3 fimbrial gene products. **Infection and immunity**, v. 60, n. 4, p. 1577–88, abr. 1992.

HULL, R. A. et al. Virulence properties of *Escherichia coli* 83972, a prototype strain associated with asymptomatic bacteriuria. **Infection and immunity**, v. 67, n. 1, p. 429–32, jan. 1999.

JACOBY, G. A.; MUNOZ-PRICE, L. S. The New β -Lactamases. **New England Journal of Medicine**, v. 352, n. 4, p. 380–391, 27 jan. 2005.

JANA, S.; DEB, J. K. Molecular understanding of aminoglycoside action and resistance. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 70, n. 2, p. 140–150, 4 mar. 2006.

JEONG, S. H. et al. Outbreaks of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing carbapenemases in Korea. **Journal of microbiology (Seoul, Korea)**, v. 44, n. 4, p. 423–31, ago. 2006.

JJEMBA, P. K. Excretion and ecotoxicity of pharmaceutical and personal care products in the environment. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 63, n. 1, p. 113–130, jan. 2006.

JOHNSON, R.; ADAMS, J. The ecology and evolution of tetracycline resistance. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 7, n. 9, p. 295–299, 1 set. 1992.

JONES, C. H. et al. FimH adhesin of type 1 pili is assembled into a fibrillar tip structure in the Enterobacteriaceae. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 6, p. 2081–5, 14 mar. 1995.

JONES, R. N. et al. In vitro efficacy of six cephalosporins tested against Enterobacteriaceae isolated at 38 North American medical centres participating in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1998. **International journal of antimicrobial agents**, v. 15, n. 2, p. 111–8, jul. 2000.

JUNIOR, M. A. .; FERREIRA, E. S.; CONCEIÇÃO, G. C. β -lactamase de espectro ampliado (ESBL): Um importante mecanismo de resistência bacteriana e sua detecção no laboratório clínico. **Rev NewsLab.**, v. 63, p. 152–174, 2004.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic Escherichia coli. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 123–140, fev. 2004.

KASNOWSKI, M. C. et al. REVISTA CIENTÍFICA ELETRÔNICA DE MEDICINA VETERINÁRIA-ISSN: 1679-7353 FORMAÇÃO DE BIOFILME NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS E. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 15, p. 1–23, 2010.

KAYSER, F. H. Safety aspects of enterococci from the medical point of view. **International journal of food microbiology**, v. 88, n. 2–3, p. 255–62, 1 dez. 2003.

KIJIMA-TANAKA, M. et al. A national surveillance of antimicrobial resistance in Escherichia coli isolated from food-producing animals in Japan. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, n. 2, p. 447–451, 1 fev. 2003.

KIM, J. H. et al. Morganella morganii sepsis with massive hemolysis. **Journal of Korean medical science**, v. 22, n. 6, p. 1082–4, dez. 2007.

KING, A.; BOOTHMAN, C.; PHILLIPS, I. Comparative in vitro activity of cefpirome and cefepime, two new cephalosporins. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 9, n. 9, p. 677–685, set. 1990.

KLEIN, G. Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and the gastro-intestinal tract. **International journal of food microbiology**, v. 88, n. 2–3, p. 123–31, 1 dez. 2003.

KUEHN, M. J. et al. Genetic, biochemical, and structural studies of biogenesis of adhesive pili in bacteria. **Methods in Enzymology**, v. 236, p. 282–306, 1 jan. 1994.

KUMMERER, K. Resistance in the environment. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 54, n. 2, p. 311–320, 1 jul. 2004.

LAMBERT, P. A. Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of the Royal Society of Medicine**, v. 95 Suppl 41, n. Suppl 41, p. 22–6, 2002.

LANDMAN, D. et al. Evolution of antimicrobial resistance among *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, NY. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 60, n. 1, p. 78–82, 1 jul. 2007.

LASARO, M. A. et al. F1C Fimbriae Play an Important Role in Biofilm Formation and Intestinal Colonization by the *Escherichia coli* Commensal Strain Nissle 1917. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 1, p. 246–251, 1 jan. 2009.

LECLERCQ, R. et al. Plasmid-Mediated Resistance to Vancomycin and Teicoplanin in *Enterococcus Faecium*. **New England Journal of Medicine**, v. 319, n. 3, p. 157–161, 21 jul. 1988.

LEHANE, L.; OLLEY, J. Histamine fish poisoning revisited. **International journal of food microbiology**, v. 58, n. 1–2, p. 1–37, 30 jun. 2000.

LEITE, B. R. **CARACTERIZAÇÃO DO RESISTOMA DE UMA LAGUNA COSTEIRA DO SUL DO BRASIL**. 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. 2019.

LEPPER, P. M. et al. Consumption of imipenem correlates with beta-lactam resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 46, n. 9, p. 2920–5, set. 2002.

LEWIS, K. Riddle of Biofilm Resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 4, p. 999–1007, 1 abr. 2001.

LIPSITCH, M.; SINGER, R. S.; LEVIN, B. R. Antibiotics in agriculture: when is it time to close the barn door? **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 9, p. 5752–4, 30 abr. 2002.

LIVANI, F.; KABIR, S. Gram-negative folliculitis caused by *Morganella morganii*. **JAAD Case Reports**, v. 5, n. 6, p. 558, jun. 2019.

LIVERMORE, D. M.; WOODFORD, N. The β -lactamase threat in Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. **Trends in Microbiology**, v. 14, n.

9, p. 413–420, set. 2006.

LORY, S. The Family Enterococcaceae. In: **The Prokaryotes**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2014. p. 75–77.

LU, X. et al. Interaction of veterinary antibiotic tetracyclines and copper on their fates in water and water hyacinth (*Eichhornia crassipes*). **Journal of Hazardous Materials**, v. 280, p. 389–398, 15 set. 2014.

MAH, T.-F. C.; O'TOOLE, G. A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. **Trends in Microbiology**, v. 9, n. 1, p. 34–39, 1 jan. 2001.

MANGIA, A. H. R. **Pesquisadora comenta a epidemia de “E.coli” na Europa**. Disponível em: <<https://agencia.fiocruz.br/pesquisadora-comenta-a-epidemia-de-e-coli-na-europa>>. Acesso em: 19 jul. 2019.

MANOS, J.; BELAS, R. The Genera *Proteus*, *Providencia*, and *Morganella*. In: **The Prokaryotes**. [s.l.] Springer New York, 2006. p. 245–269.

MARTI, E.; VARIATZA, E.; BALCAZAR, J. L. The role of aquatic ecosystems as reservoirs of antibiotic resistance. **Trends in Microbiology**, v. 22, n. 1, p. 36–41, jan. 2014.

MATTICK, J. S.; WHITCHURCH, C. B.; ALM, R. A. The molecular genetics of type-4 fimbriae in *Pseudomonas aeruginosa* - a review. **Gene**, v. 179, n. 1, p. 147–155, 1 jan. 1996.

MICHIGAN STATE UNIVERSITY. **Molecular mechanisms of resistance — Antimicrobial Resistance Learning Site For Veterinary Students**. Disponível em: <<http://amrls.cvm.msu.edu/microbiology/molecular-basis-for-antimicrobial-resistance>>. Acesso em: 30 set. 2019.

MILLS, J.; DREW, D. *Serratia marcescens* Endocarditis: A Regional Illness Associated with Intravenous Drug Abuse. **Annals of Internal Medicine**, v. 84, n. 1, p. 29–35, 1 jan. 1976.

MOELLERING, R. C.; JR. Emergence of *Enterococcus* as a Significant Pathogen. **Clinical Infectious Diseases**, v. 14, n. 6, p. 1173–1176, 1992.

MOL, O.; OUDEGA, B. Molecular and structural aspects of fimbriae biosynthesis and assembly in *Escherichia coli*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 19, n. 1, p. 25–52, out. 1996.

MOORE, J. E. et al. Determination of total antibiotic resistance in waterborne bacteria in rivers and streams in Northern Ireland: Can antibiotic-resistant bacteria be an indicator of ecological change? **Aquatic Ecology**, v. 44, n. 2, p. 349–358, 24 jun. 2010.

MOQUET, O. et al. Class D OXA-48 carbapenemase in multidrug-resistant enterobacteria, Senegal. **Emerging infectious diseases**, v. 17, n. 1, p. 143–4, jan. 2011.

MULLER, C.; PLÉSIAT, P.; JEANNOT, K. A Two-Component Regulatory System Interconnects Resistance to Polymyxins, Aminoglycosides, Fluoroquinolones, and β -Lactams in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 3, p. 1211–1221, mar. 2011.

MURATA, T. et al. A Large Outbreak of Foodborne Infection Attributed to *Providencia alcalifaciens*. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 184, n. 8, p. 1050–1055, 15 out. 2001.

MURRAY, B. E. The life and times of the Enterococcus. **Clinical microbiology reviews**, v. 3, n. 1, p. 46–65, 1 jan. 1990.

NAGY, A. et al. Aggregative adherence fimbriae I (AAF/I) mediate colonization of fresh produce and abiotic surface by Shiga toxin-producing enteroaggregative *Escherichia coli* O104:H4. **International Journal of Food Microbiology**, v. 229, p. 44–51, 16 jul. 2016.

NEVES, P. R. et al. *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente: um problema endêmico no Brasil Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: an endemic problem in Brazil. **Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 47, n. 4, p. 409–420, 2011.

NIELUBOWICZ, G. R.; MOBLEY, H. L. T. Host–pathogen interactions in urinary tract infection. **Nature Reviews Urology**, v. 7, n. 8, p. 430–441, 20 ago. 2010.

NISHIZAWA, T. et al. Enhancement of amoxicillin resistance after unsuccessful *Helicobacter pylori* eradication. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 55, n. 6, p. 3012–4, jun. 2011.

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

NORDMANN, P.; NAAS, T.; POIREL, L. Global Spread of Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 10, p. 1791–1798, out. 2011.

NOVO, A. et al. Antibiotic resistance, antimicrobial residues and bacterial community composition in urban wastewater. **Water Research**, v. 47, n. 5, p. 1875–1887, 1 abr. 2013.

NUNES, A. A. T. **Resistência a antimicrobianos e fatores de virulência em *Klebsiella sp.* isoladas da laguna de Tramandaí.** [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2017.

O'BRIEN, T. F. Resistance of bacteria to antibacterial agents: report of Task Force 2. **Reviews of infectious diseases**, v. 9 Suppl 3, p. S244-60, 1987.

O'DRISCOLL, T.; CRANK, C. W. Vancomycin-resistant enterococcal infections: epidemiology, clinical manifestations, and optimal management. **Infection and drug resistance**, v. 8, p. 217–30, 2015.

O'TOOLE, G. A.; KOLTER, R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. **Molecular Microbiology**, v. 30, n. 2, p. 295–304, out. 1998.

OCHMAN, H.; LAWRENCE, J. G.; GROISMAN, E. A. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. **Nature**, v. 405, n. 6784, p. 299–304, maio 2000.

OLD, D. C.; ADEGBOLA, R.; SCOTT, S. S. Multiple fimbrial haemagglutinins in *Serratia* species. **Medical microbiology and immunology**, v. 172, n. 2, p. 107–15, 1983.

OLIVEIRA, J. H. H. L. DE et al. Ácido clavulânico e cefamicina c: uma perspectiva da biossíntese, processos de isolamento e mecanismo de ação. **Química Nova**, v. 32, n. 8, p. 2142–2150, 2009.

ONG, C.-L. Y. et al. Identification of Type 3 Fimbriae in Uropathogenic *Escherichia coli* Reveals a Role in Biofilm Formation. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 3, p. 1054–1063, 1 fev. 2008.

PALLERONI, N. J. Introduction to the Family Pseudomonadaceae. In: **The Prokaryotes**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1981. p. 655–665.

PATERSON, D. L.; BONOMO, R. A. Extended-Spectrum β -Lactamases: a Clinical Update. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 18, n. 4, p. 657–686, 1 out. 2005.

PETERSEN, B. C. Estudo das alterações metabólicas em peixes da lagoa tramandaí/rs. canoas,. 2016.

PIRES, E. J. V. C. et al. Análise epidemiológica de isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* provenientes de hospital universitário. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 21, n. 4, p. 384–390, dez. 2009.

POIREL, L. et al. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 48, n. 1, p. 15–22, jan. 2004.

PRATT, L. A.; KOLTER, R. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. **Molecular Microbiology**, v. 30, n. 2, p. 285–293, out. 1998.

PUGSLEY, A. P.; SCHNAITMAN, C. A. Outer membrane proteins of

Escherichia coli. VII. Evidence that bacteriophage-directed protein 2 functions as a pore. **Journal of bacteriology**, v. 133, n. 3, p. 1181–9, mar. 1978.

PULICHARLA, R. et al. Tetracyclines metal complexation: Significance and fate of mutual existence in the environment. **Environmental Pollution**, v. 221, p. 1–14, 1 fev. 2017.

QUEENAN, A. M.; BUSH, K. Carbapenemases: the Versatile β -Lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 3, p. 440–458, 1 jul. 2007.

REEVE, E. C.; DOHERTY, P. Linkage relationships of two genes causing partial resistance to chloramphenicol in Escherichia coli. **Journal of Bacteriology**, v. 96, n. 4, p. 1450, 1968.

REYES-ESCOGIDO, L. et al. Purification of bacterial genomic DNA in less than 20 min using chelex-100 microwave: examples from strains of lactic acid bacteria isolated from soil samples. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 98, n. 4, p. 465–474, 17 nov. 2010.

RICE, L. B. et al. Resistance to cefoperazone-sulbactam in Klebsiella pneumoniae: evidence for enhanced resistance resulting from the coexistence of two different resistance mechanisms. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 37, n. 5, p. 1061–4, 1 maio 1993.

RICE, L. B. et al. High-level expression of chromosomally encoded SHV-1 β -lactamase and an outer membrane protein change confer resistance to ceftazidime and piperacillin-tazobactam in a clinical isolate of Klebsiella pneumoniae. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 44, n. 2, p. 362–7, 1 fev. 2000.

RIZZO, L. et al. Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: A review. **Science of The Total Environment**, v. 447, p. 345–360, 1 mar. 2013.

ROBERTS, M. C. Update on acquired tetracycline resistance genes. **FEMS Microbiology Letters**, v. 245, n. 2, p. 195–203, 1 abr. 2005.

SÁNCHEZ, M. D. ET AL. Eficacia de la monoterapia con piperacilina-tazobactam en infecciones del área maxilofacial Efficacy of single drug therapy with piperacillin-tazobactam in infections of the maxillofacial area. **Rev Esp Cirug Oral y Maxilofac**, v. 26, p. 97–106, 2004.

SANTOS, I. DE A. L. DOS; NOGUEIRA, J. M. DA R.; MENDONÇA, F. C. R. Mecanismos de resistência antimicrobiana em Pseudomonas aeruginosa. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 47, n. 1/2, p. 5–12, 2015.

SCHROLL, C. et al. Role of type 1 and type 3 fimbriae in Klebsiella pneumoniae

biofilm formation. **BMC Microbiology**, v. 10, n. 1, p. 179, 23 jun. 2010.

SEILER, C.; BERENDONK, T. U. Heavy metal driven co-selection of antibiotic resistance in soil and water bodies impacted by agriculture and aquaculture. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, p. 399, 2012.

SIB, E. et al. Antibiotic resistant bacteria and resistance genes in biofilms in clinical wastewater networks. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 222, n. 4, p. 655–662, 1 maio 2019.

SILVEIRA, G. P. et al. Estratégias utilizadas no combate a resistência bacteriana. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 844–855, jul. 2006.

SINGH, K. V.; NALLAPAREDDY, S. R.; MURRAY, B. E. Importance of the *ebp* (Endocarditis- and Biofilm-Associated Pilus) Locus in the Pathogenesis of *Enterococcus faecalis* Ascending Urinary Tract Infection. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 195, n. 11, p. 1671–1677, 1 jun. 2007.

SLOTS, J.; FEIK, D.; RAMS, T. E. Prevalence and antimicrobial susceptibility of Enterobacteriaceae, Pseudomonadaceae and Acinetobacter in human periodontitis. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 5, n. 3, p. 149–154, 1 jun. 1990.

SNYDER, J. A. et al. Coordinate expression of fimbriae in uropathogenic Escherichia coli. **Infection and immunity**, v. 73, n. 11, p. 7588–96, nov. 2005.

SOTO, G. E.; HULTGREN, S. J. Bacterial adhesins: common themes and variations in architecture and assembly. **Journal of bacteriology**, v. 181, n. 4, p. 1059–71, fev. 1999.

SPEER, B. S.; SHOEMAKER, N. B.; SALYERS, A. A. Bacterial resistance to tetracycline: mechanisms, transfer, and clinical significance. **Clinical microbiology reviews**, v. 5, n. 4, p. 387–99, 1 out. 1992.

STAPLETON, P. et al. Incidence and mechanisms of resistance to the combination of amoxicillin and clavulanic acid in Escherichia coli. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 39, n. 11, p. 2478–83, 1 nov. 1995.

STEPANOVIC, S. et al. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal of microbiological methods**, v. 40, n. 2, p. 175–9, abr. 2000.

STOCK, I.; GRUEGER, T.; WIEDEMANN, B. Natural antibiotic susceptibility of strains of *Serratia marcescens* and the *S. liquefaciens* complex: *S. liquefaciens sensu stricto*, *S. proteamaculans* and *S. grimesii*. **International journal of antimicrobial agents**, v. 22, n. 1, p. 35–47, jul. 2003.

STREIT, J. M. et al. Assessment of pathogen occurrences and resistance profiles among infected patients in the intensive care unit: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (North America, 2001). **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 24, n. 2, p. 111–118, ago. 2004.

TALUKDAR, P. K. et al. Antimicrobial Resistance, Virulence Factors and Genetic Diversity of *Escherichia coli* Isolates from Household Water Supply in Dhaka, Bangladesh. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, p. e61090, 3 abr. 2013.

TAMAMES, J. et al. Environmental distribution of prokaryotic taxa. **BMC Microbiology**, v. 10, n. 1, p. 85, 22 mar. 2010.

TASSIOS, P. T. et al. Emergence of multidrug resistance in ubiquitous and dominant *Pseudomonas aeruginosa* serogroup O:11. The Greek *Pseudomonas Aeruginosa* Study Group. **Journal of clinical microbiology**, v. 36, n. 4, p. 897–901, abr. 1998.

TAVARES, W. Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, n. 3, p. 281–301, jun. 2000.

THAKER, M.; SPANOGIANNOPOULOS, P.; WRIGHT, G. D. The tetracycline resistome. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 67, n. 3, p. 419–431, 28 fev. 2010.

TORRES, A. G. **Pathogenic Escherichia coli in Latin America**. [s.l.] Bentham e Books, 2010.

TRAN-DIEN, A. et al. Early transmissible ampicillin resistance in zoonotic *Salmonella enterica* serotype Typhimurium in the late 1950s: a retrospective, whole-genome sequencing study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 18, n. 2, p. 207–214, fev. 2018.

ULETT, G. C. et al. The role of F9 fimbriae of uropathogenic *Escherichia coli* in biofilm formation. **Microbiology**, v. 153, n. 7, p. 2321–2331, 1 jul. 2007.

UTTLEY, A. H. et al. Vancomycin-resistant enterococci. **Lancet (London, England)**, v. 1, n. 8575–6, p. 57–8, 1988.

VAN DEN BOGAARD, A. E. J. M.; LONDON, N.; STOBBERINGH, E. E. Antimicrobial resistance in pig faecal samples from The Netherlands (five abattoirs) and Sweden. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 45, n. 5, p. 663–671, 1 maio 2000.

VAN HOEK, A. H. A. M. et al. Acquired antibiotic resistance genes: an overview. **Frontiers in microbiology**, v. 2, p. 203, 2011.

VARALDO, P. E. Antimicrobial resistance and susceptibility testing: an

evergreen topic. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 50, n. 1, p. 1–4, 1 jul. 2002.

VAZ-MOREIRA, I.; NUNES, O. C.; MANAIA, C. M. Bacterial diversity and antibiotic resistance in water habitats: searching the links with the human microbiome.

FEMS Microbiology Reviews, v. 38, n. 4, p. 761–778, jul. 2014.

VAZ, E. K. Antimicrobial resistance: how it appears and what it represents for swine production. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 37(Supl 1), p. 147–150, 2009.

VILA, J.; MARTÍ, S.; SÁNCHEZ-CÉSPEDES, J. Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 59, n. 6, p. 1210–1215, 1 jun. 2007.

VRANY, J. D.; STEWART, P. S.; SUCI, P. A. Comparison of recalcitrance to ciprofloxacin and levofloxacin exhibited by *Pseudomonas aeruginosa* biofilms displaying rapid-transport characteristics. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 41, n. 6, p. 1352–8, jun. 1997.

WALSH, T. R. et al. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? **Clinical microbiology reviews**, v. 18, n. 2, p. 306–25, abr. 2005.

WALTHER-RASMUSSEN, J.; HØIBY, N. OXA-type carbapenemases. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 57, n. 3, p. 373–383, 1 mar. 2006.

WARREN, R. E. et al. Control of infections due to extended-spectrum β -lactamase-producing organisms in hospitals and the community. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14, p. 124–133, jan. 2008.

WEI, J.-R.; LAI, H.-C. N-Acylhomoserine lactone-dependent cell-to-cell communication and social behavior in the genus *Serratia*. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 296, n. 2–3, p. 117–124, 6 abr. 2006.

XI, C. et al. Prevalence of antibiotic resistance in drinking water treatment and distribution systems. **Applied and environmental microbiology**, v. 75, n. 17, p. 5714–8, set. 2009.

YAMAZOE, K. et al. Distribution of the *cfiA* gene among *Bacteroides fragilis* strains in Japan and relatedness of *cfiA* to imipenem resistance. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 43, n. 11, p. 2808–10, nov. 1999.

YOH, M. et al. Importance of *Providencia* species as a major cause of travellers' diarrhoea. **Journal of Medical Microbiology**, v. 54, n. 11, p. 1077–1082, 1 nov. 2005.

ZHANG, D. et al. Functional characterisation of altered outer membrane proteins for tetracycline resistance in *Escherichia coli*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 32, n. 4, p. 315–319, 1 out. 2008.

ZHANG, X.-X.; ZHANG, T.; FANG, H. H. P. Antibiotic resistance genes in water environment. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 82, n. 3, p. 397–414, 8 mar. 2009.

ZHOU, Q. et al. Preparation of a novel magnetic powder resin for the rapid removal of tetracycline in the aquatic environment. **Chinese Chemical Letters**, v. 23, n. 6, p. 745–748, 1 jun. 2012.

ZOTTOLA, E. A.; SASAHARA, K. C. Microbial biofilms in the food processing industry—Should they be a concern? **International Journal of Food Microbiology**, v. 23, n. 2, p. 125–148, 1 out. 1994.

9. ANEXOS

9.1 Meios de Cultura

Ágar Conservação

Extrato de levedura – 3g

Peptona – 10g

NaCl – 8g

Fosfato de sódio bibásico – 2g

Ágar – 15g

Água destilada – 1L

Ágar MacConkey

Digestão pancreática de gelatina – 17g

Peptona – 3g

Lactose – 10g

Sais biliares – 1,5g

Cloreto de sódio – 5g

Vermelho Neutro: 0,03g

Cristal violeta – 0,001g

Ágar – 15g

Água destilada – 1

Ágar Muller-Hinton

Extrato de carne – 2g

Ácidos casamínos – 17,5g

Amido – 1,5g

Ágar – 17g

Água destilada – 1L

Ágar TSA

Hidrolisado enzimático de caseína – 15g

Peptona de soja – 5g

Cloreto de sódio – 5g

Ágar – 15g

Água destilada – 1000 ml

Ágar CFA

Casaminoácido – 10g

Extrato de levedura – 1,5g

MgSO₄ – 0,05g

MnCl₂ – 0,005g

Ágar bacteriológico – 20g

Água destilada – 1000mL

Autoclavar por 15 minutos a 121°C com pH final a 7,4.

Caldo BHI

Infusão de cérebro de vitelo – 200g

Infusão de coração bovino – 250g

Peptona proteose – 10g

Dextrose – 2,0g

Cloreto de sódio – 5,0g

Fosfato dissódico – 2,5g

Água destilada – 1000mL

Suspender 37g de pó em 1000mL de água destilada e autoclavar por 15 minutos a 121C° com pH final a 7,4.

Caldo TSB

Peptona de caseína – 17g

Peptona de soja – 3,0g

Dextrose – 2,5g

Cloreto de sódio – 5,0g

Fosfato bibásico de potássio – 2,5g

Água destilada – 1000mL

9.2 Soluções

Catalase

Peróxido de hidrogênio – 3g

Água – 100mL

Tampão TE

Tris-HCl 1M pH 8,0 – 1mL [10mM]

EDTA 0,5M pH 8,0 – 2mL [1mM]

Água destilada – 100mL

Tampão TES

TRIS-Base pH 7,5 – 10mM

EDTA pH 8,0 – 1mM

SDS – 0,5%

SDS

SDS – 0,5g

Água destilada – 100mL

Gel de agarose a 1,5%

Agarose – 1,5g

Tampão TAE – 100mL

Tampão TAE 50X

Tris-Base – 242g

Ácido acético glacial- 57,1mL

EDTA 0,5M pH 8,0 – 100mL

Água destilada – 1000mL

Tampão PBS 1x

NaCl - 137 mM

Fosfato - 10 mM

KCl - 2.7 mM

pH – 7,4

9.3 Antimicrobianos

Tabela 10: Antimicrobianos utilizados para análise do perfil de suscetibilidade

Classe/Sub-classe	Antimicrobianos	Concentração do disco	Sigla	Marca
Penicilínicos	Ampicilina;	10 µg	AMP	SENSIFAR
	Piperacilina-tazobactam	110 µg	PPT	OXOID
	Amoxicilina-ácido clavulânico	30 µg	AMC	OXOID
Cefalosporinas	Cefoxitina	30 µg	CFO	SENSIFAR
	Ceftazidima	30 µg	CAZ	OXOID
	Cefotaxima	30 µg	CTX	OXOID
	Cefepima	30 µg	CPM	OXOID
Carbapenêmicos	Imipenem	10 µg	IPM	OXOID
Monobactâmico	Aztreonam	30 µg	ATM	SENSIFAR
	Amicacina	30 µg	AMI	OXOID
Aminoglicosídeos	Gentamicina	10 µg	GEN	SENSIFAR
	Gentamicina	120 µg	GEN	SENSIFAR
	Estreptomina	300 µg	EST	SENSIFAR
Cloranfenicol	Cloranfenicol	30 µg	CLO	OXOID
Tetraciclina	Tetraciclina	30 µg	TET	SENSIFAR
	Tigeciclina	15 µg	TGC	OXOID
Glicopeptídeos	Vancomicina	30µg	VAN	OXOID
Sulfonamidas e trimetoprima	Sulfametoxazol-trimetoprima	25 µg	SUT	OXOID
Quinolonas; Fluorquinolonas	Norfloxacin	10 µg	NOR	OXOID
Nitroimidazólicos	Nitrofurantoína	300 µg	NIT	SENSIFAR

9.4 Identificação dos isolados.

Tabela 11: Relação entre o nome do isolado e a espécie.

Nome do isolado	Espécie
LT001	<i>S. marcescens</i>
LT002	
LT003	
LT004	
LT005	
LT006	
LT007	
LT008	
LT009	
LT010	
LT011	
LT012	
LT013	
LT014	
LT015	
LT016	<i>P.aeruginosa</i>
LT017	
LT018	
LT019	<i>M. morganii</i>
LT020	
LT021	
LT022	
LT023	
LT024	<i>C. freundii</i>
LT025	
LT026	<i>P. alcalifaciens</i>
LT027	
LT028	<i>E. coli</i>
LT029	

Nome do isolado	Espécie
LT030 LT031 LT032 LT033	<i>E. coli</i>
LT034 LT035 LT036 LT037	<i>E. faecium</i>