

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICA DA SAÚDE
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
ÊNFASE EM MICROBIOLOGIA AMBIENTAL

RAFAELLA SILVELLO BARICHELLO

Análise e relação entre perfil de resistência de
Pseudomonas aeruginosa e impacto antropogênico em
ambiente aquático litorâneo Laguna de Tramandaí - RS

Porto Alegre

2019

RAFAELLA SILVELLO BARICHELLO

Análise e relação entre perfil de resistência de *Pseudomonas aeruginosa* e impacto antropogênico em ambiente aquático litorâneo Laguna de Tramandaí - RS

Trabalho de Conclusão de curso apresentado como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas com ênfase em microbiologia ambiental na Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientadora Prof. Dr. Getrudes Corção

Porto Alegre

2019

SUMÁRIO

1 RESUMO	4
2. INTRODUÇÃO	5
2.1 Antibióticos e resistência	5
2.1.1. Betalactâmicos e a produção de beta-lactamases.....	6
2.1.2. Aminoglicosídeos e resistências.....	8
2.1.3. Quinolonas e resistência.....	9
2.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10
2.3. Resistência bacteriana em ambiente aquático	12
2.4. Laguna de Tramandaí – RS	14
3. O ARTIGO	15
3.1. Resumo.....	15
3.2. Introdução ao artigo.....	16
3.3. Material e Métodos.....	18
3.4. Resultados.....	20
3.4. Discussão.....	22
4. CONCLUSÃO	25
5. REFERÊNCIAS	26

Análise e relação entre perfil de resistência de *Pseudomonas aeruginosa* e impacto antropogênico em ambiente aquático litorâneo Laguna de Tramandaí - RS

RESUMO:

A influência das atividades humanas na geração de reservatórios ambientais de resistência a antibióticos vem sendo alvo de estudos devido ao crescente aumento das resistências bacterianas em todo o mundo. A pesquisa dedicou-se a avaliação de uma possível ocorrência de um reservatório de resistência em um ambiente costeiro no sul do Brasil. Definimos o perfil fenotípico de resistência a antimicrobianos em isolados de *Pseudomonas aeruginosa* obtidos a partir de amostras ambientais de água da Laguna de Tramandaí - RS, local com intensa atividade antrópica (pesca, exploração de petróleo, comércio, circulação de embarcações e pessoas etc). Quatro diferentes pontos de coleta haviam sido definidos conforme o grau de impacto perceptível, permitindo uma análise quanto a disseminação de bactérias resistentes e a relação com o grau de antropização. Para determinação do perfil fenotípico de resistência foi realizado teste de suscetibilidade a antimicrobianos, conforme padrão BrCAST – EUCAST, onde testamos doze antimicrobianos utilizados no tratamento das infecções causadas por esta bactéria. A maioria das cepas foram sensíveis a todos os antimicrobianos testados, entretanto nove cepas mostraram-se resistentes a pelo menos um antibiótico e uma cepa mostrou-se multirresistente. Esses dados mostram que apesar de a laguna veicular genes de resistência, conforme observado em estudos anteriores, a espécie de *P. aeruginosa* não parece ser influência alarmante, mas são necessários mais estudos e acompanhamento desse local, visto que quase todas as cepas que apresentaram resistência, resistiram ao grupo dos carbapenêmicos, classe de antibióticos mais amplamente utilizada na prática clínica.

Palavras-chave: *Pseudomonas aeruginosa*, resistência a antimicrobianos, impacto antropogênico, corpos hídricos, era pós-antibiótico.

Trabalho de Conclusão de Curso – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. Porto Alegre, RS, Brazil. 2019.

Análise e relação entre perfil de resistência de *Pseudomonas aeruginosa* e impacto antropogênico em ambiente aquático litorâneo Laguna de Tramandaí - RS

Autor: Rafaella Silvello Barichello Orientadora Prof. Dr. Gertrudes Corção.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Antibióticos e resistência

A descoberta dos antibióticos começou a partir da penicilina, pelo biólogo e bacteriologista Alexander Fleming em 1928, desde então foi evidente o progresso da saúde pública quanto ao combate à infecções microbianas em escala mundial. Fato que revolucionou a medicina e gerou grande otimismo, solucionando casos que antes pareciam impossíveis. Isso representou um marco científico, um passo em direção ao aumento da expectativa de vida humana. Mas Fleming já naquela época alertou, com base em suas observações, que o uso indiscriminado desses recursos poderia torná-los ineficazes. No entanto, a prescrição desses antimicrobianos nem sempre foi criteriosa e rapidamente começou a gerar dificuldades em seu uso, devido ao progressivo surgimento das resistências bacterianas a essas drogas (Montelli & Sadatsune, 2001, Tenover, 2006).

Já é sabido que as bactérias utilizam de elementos transponíveis para gerar variabilidade em seu genoma e compartilham genes entre as cepas através de transformação, transdução e conjugação. Esses mecanismos possibilitam a disseminação de genes de resistência (Davison J. 1999). Os genes de resistência adquiridos permitem que uma bactéria produza enzimas capazes de desarranjar a estrutura da droga, ou expressem sistemas de efluxo que impedem que a droga consiga atingir seu alvo intracelular, e até mesmo modificar o local alvo da droga ou produzir uma via metabólica alternativa que ignore a ação da droga (Tenover, 2006). São

conhecidas resistências para todas as classes de antibióticos já desenvolvidos, de compostos naturais e sintéticos (D'Costa, 2006).

A indústria farmacêutica procura versatilizar os compostos já existentes afim de ampliar seus efeitos, mas assim como existe grande diversidade de fármacos, temos observado diversos tipos de resistência. Antibióticos são moléculas complexas e podem ser classificados pela sua origem, estrutura química e mecanismo de ação (Kümmerer, 2009). Conforme Tenover (2006) podem afetar a viabilidade dos microrganismos em alguns processos principais que incluem: a interferência na síntese da parede celular, inibição da síntese de proteínas, interferência na síntese de ácidos nucleicos, inibição de uma via metabólica, e perturbação da estrutura da membrana bacteriana.

1.1.1. Beta-lactâmicos e a produção de beta-lactamases:

Os beta-lactâmicos constituem a família mais numerosa de antimicrobianos e as mais usadas na prática clínica. Seu anel beta-lactâmico atua inibindo a síntese do peptídeoglicano na última fase da construção da parede celular bacteriana (Martin e Gudiol, 2003, Sauvage et al, 2008). São antibióticos de ação bactericida lenta, pouca toxicidade e ampla margem terapêutica. Algumas modificações da molécula original resultaram em um maior espectro desses compostos, mas, o surgimento progressivo da resistência adquirida limitou o uso de betalactâmicos e sua eficácia em determinadas situações (Suarez e Gudiol, 2009). Os betalactâmicos são subdivididos em: penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos (Murray et al., 2004). Ao longo do tempo, algumas bactérias adquiriram a capacidade de produzir enzimas, denominadas beta-lactamases, que são capazes de promover a hidrólise do anel beta-lactâmico, inativando a ação destes antibióticos (Santana, 2010, Zafer et al, 2014).

As beta-lactamases podem ser encontradas no meio extracelular em bactérias Gram-positivas, ou no espaço periplasmático em bactérias Gram-negativas (Bush, 1988). Os genes que codificam a produção dessas enzimas podem ser de origem cromossômica, e neste caso são universais em algumas espécies bacterianas, e de origem plasmidial podendo variar muito e serem partilhados entre espécies. Através da enorme dinâmica dos transposons, os genes podem se realocar dos plasmídeos até os cromossomos, e assim se disseminar entre comunidades bacterianas (Williams, 1999).

A hidrólise do anel beta-lactâmico do núcleo estrutural das penicilinas gera a formação de ácido penicilínico. Os derivados desse composto são desprovidos de atividade antimicrobiana. O processo acontece com as cefalosporinas e carbapenêmicos de forma semelhante. (Tavares, 2001). Nas últimas décadas vem sendo observadas novas enzimas capazes de hidrolisar carbapenêmicos, como imipenem e meropenem. (Rasmussen & Bush, 1997). Os beta-lactâmicos são classificados pela semelhança estrutural adicionados de radicais que fornecem a estabilidade dessa droga (Figura 1).

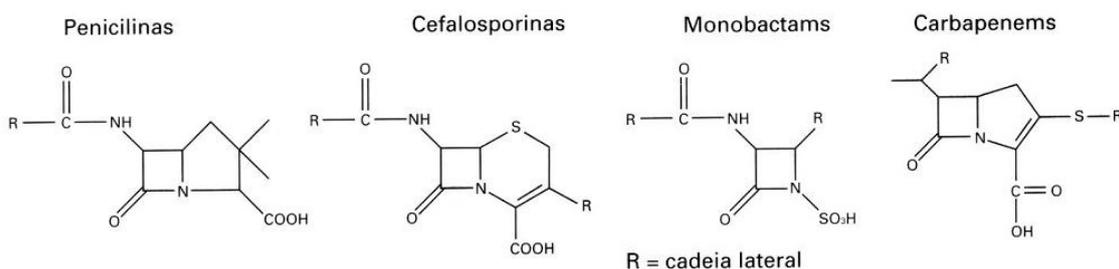


Figura 1. Estrutura dos antibióticos beta-lactâmicos (Williams, 1999).

As penicilinas são sintetizadas naturalmente pelos fungos do gênero *Penicillium*, o primeiro tipo isolado foi a penicilina G. Com os avanços da ciência já somos capazes de desenvolver outros tipos de penicilinas biossintéticas e semissintéticas seguindo basicamente duas estratégias respectivamente: a adição de precursores da cadeia lateral ao meio de cultura do fungo produtor e a modificação química da penicilina obtida pela fermentação biotecnológica (Cruegers e Brock, 1989).

As cefalosporinas são uma subclasse dos beta-lactâmicos, com estrutura química similar às penicilinas, são semissintéticas e apresentam resistência a ação das betalactamases. Sua eficiência depende da penetrabilidade através da membrana externa e da afinidade pelas enzimas-alvo. Podem ser subdivididas em primeira, segunda, terceira, quarta e quinta geração, de acordo com seu espectro de ação (Davies e Davies, 2010). As cefalosporinas de terceira e quarta geração têm sido mais efetivas contra bactérias Gram-negativas, produtoras de betalactamases de origem cromossomal (Dunn, 1982). Exemplos de cefalosporinas importantes: Cefotaxima (terceira geração), e

Cefepima (quarta geração). As de quinta geração não agem sobre *Pseudomonas* (Bazan et al., 2009).

Os Carbapenêmicos possuem um amplo espectro de ação incluindo para bacilos Gram-negativos não fermentadores, como *P. aeruginosa* e são relativamente resistentes à hidrólise pela maioria das beta-lactamases; em alguns casos, atuam como "substratos lentos" ou inibidores de beta-lactamases (Papp-Wallace, et al, 2011). São exemplos importantes do grupo: Imipenem, Meropenem, Ertapenem e Doripenem.

Os Monobactâmicos têm como único fármaco representante o Aztreonam, responsável por forte atividade contra *Pseudomonas aeruginosa* e resiste a maior parte das beta-lactamases (Goodman e Gilman, 2003).

Apesar das dificuldades atualmente reconhecidas no tratamento de infecções com os beta-lactâmicos, o grupo ainda é a escolha de tratamento para um muitas infecções clássicas, as cefalosporinas são muito usadas na profilaxia cirúrgica e em infecções graves adquiridas na comunidade, a subclasse dos carbapenêmicos são mais aplicados em infecções hospitalares e cepas multirresistentes (Suarez e Gudiol, 2009).

A associação de antibióticos deste grupo com drogas de ação inibidora de beta-lactamases, como o ácido clavulânico, sulbactam e o tazobactam, são capazes de restaurar a ação do antimicrobiano contra a bactéria produtora dessa enzima. Os inibidores de beta-lactamase são estruturas semelhantes às penicilinas, que podem reter a ligação amida do grupo beta-lactâmico, e possuem uma cadeia lateral modificada. E esses aspectos estruturais permitem que os inibidores liguem-se irreversivelmente às beta-lactamases como substratos suicidas, mantendo-as inativas (Williams, 1999).

1.1.2. Aminoglicosídeos e resistência:

O primeiro antibiótico aminoglicosídeo foi obtido a partir do fungo *Streptomyces griseus* em 1944. São fármacos capazes de ligar à fração 30S dos ribossomos inibindo a síntese proteica ou produzindo proteínas defeituosas. Para atuar, o fármaco liga-se à superfície da célula bacteriana e depois é transportado através da parede por um processo dependente de energia oxidativa (Silva e Carvalho, 2007, ANVISA 2007).

Existem três mecanismos reconhecidos de resistência bacteriana aos aminoglicosídeos: A alteração dos sítios de ligação no ribossomo; alteração na permeabilidade; e modificação enzimática da droga. Os genes que conferem resistência podem estar associados a plasmídeos conjugativos e não conjugativos e em transposons, e parecem ser constitutivos, não sendo induzidos pela presença do antimicrobiano. As principais drogas utilizadas para tratamento de infecções por *Pseudomonas aeruginosa*, são: Amicacina, Gentamicina e Netilmicina (ANVISA, 2007).

1.1.3. Quinolonas e resistência:

As quinolonas passaram a ser utilizadas a partir dos anos 60, com a introdução do ácido nalidíxico na prática clínica. Sua estrutura química característica é a presença do anel 4-quinolona. No início dos anos 80, com o acréscimo de um átomo de flúor na posição 6 do anel quinolônico, surgiram as fluorquinolonas. Seu mecanismo de ação consiste em inibir o funcionamento da enzima DNA girase ou topoisomerase II, que é essencial para manter a molécula de DNA compacta e biologicamente ativa, sendo essencial para a sobrevivência bacteriana. A inibição dessa enzima faz com que a molécula de DNA passe a ocupar um grande espaço no interior da célula e suas extremidades livres geram síntese descontrolada de RNA mensageiro e de proteínas, determinando a morte das bactérias (Alos, 2003).

A resistência ocorre, principalmente, por alteração na enzima DNA girase, que passa a não responder mais a ação do antimicrobiano. Ocorre por mutação cromossômica nos genes responsáveis pelas enzimas alvo (DNA girase e topoisomerase IV) ou alterações da permeabilidade à droga pela membrana celular bacteriana (porinas). Existe um mecanismo que aumente a retirada da droga do interior da célula (bomba de efluxo) (Hopkins et al., 2005; Giraud et al., 2006; ANVISA, 2007).

As Quinolonas formam o grupo de antibióticos mais tóxico atualmente em uso com mais de 40% dos usuários sofrendo de efeitos colaterais. A gatifloxacina foi retirada do mercado devido relatos de alterações glicêmicas, principalmente em pacientes idosos e diabéticos. As fluoroquinolonas estão associadas a rupturas subseqüentes de tendões e também podem contribuir para aneurismas da aorta (Daneman, Lu e Redelmeier, 2015).

As novas quinolonas têm espectro de ação contra a maioria dos bacilos gram-negativos, superponível ao das fluorquinolonas. Entretanto, nenhuma é mais potente contra *P. aeruginosa* que a ciprofloxacina.

Todos os mecanismos de resistência a antibióticos adquiridos por bactérias evoluem por meio de forças darwinianas, ou seja, mutações que ocorrem em genes preexistentes do cromossomo bacteriano e são positivamente selecionados por forças ambientais (Gullberg et al., 2011; Zhang et al., 2011). No entanto, a adaptação à pressão seletiva de antibióticos acelera a aquisição de genes de resistência a antibióticos por transferência horizontal de espécies doadoras (Wiedenbeck e Cohan, 2011).

A OMS, em novembro de 2018 publicou um relatório onde considerou alarmante a situação criada pelo mau uso de antibióticos, confirmando a necessidade de tomar medidas, pois as pessoas estão morrendo de infecções simples que já foram tratáveis.

O termo "superbactérias", atualmente muito popularizado, refere-se a micróbios com múltiplas mutações que conferem altos níveis de resistência às classes de antibióticos recomendadas para seu tratamento, e são poucas as opções terapêuticas para estes micróbios, gerando maior sofrimento do paciente e períodos de atendimento hospitalar prolongados e mais caros, portanto, uma preocupação e um território de indispensáveis pesquisas (Davies J. & Davies D, 2010).

1.2. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa é uma bactéria aeróbica, gram-negativa, naturalmente capaz de múltiplas resistências, É considerada cosmopolita em sua distribuição, podendo ser isolada do solo, da água, de plantas, de animais e de humanos. É capaz de crescer em água destilada evidenciando necessidades nutricionais mínimas (Pollack, 2000).

A espécie também está associada a vários quadros de infecções hospitalares (Giamarellou e Antoniadou, 2001). É o agente mais isolado em infecções do trato respiratório inferior na América Latina e o segundo principal na América do Norte, de acordo com dados de estudos de vigilância (Hoban & Biedenbach, 2003).

Pseudomonas aeruginosa é conhecida por causar infecções agudas caracterizadas pela produção de toxinas e infecções crônicas pela produção de espessa camada de biofilme (Alasil et al, 2015). Considerado oportunista, por sua patogenia estar diretamente ligada com a situação imunológica do hospedeiro que infecta, comumente acomete pacientes queimados, com fibrose cística e internados em UTI, e elevados índices de mortalidade (Pollack, 2000; Neves, 2011; Alasil et al, 2015).

As infecções por *P. aeruginosa* têm se tornado ainda mais difíceis de tratar em razão desse aumento das resistências aos antimicrobianos e as opções terapêuticas já defasadas. A resistência de *P. aeruginosa* ao antibiótico imipenem, da classe dos betalactâmicos, já foi relatada em diversas partes do mundo (Fluit, Verhoef e Schmitz, 2000; NNIS, 2001; Louie et al, 2010). O que torna o tratamento ainda mais difícil, visto que a resistência ao imipenem está constantemente relacionada com resistência a outras drogas de ação antipseudomonas (Troillet, Samore e Carmelli, 1997; Higging et al, 2002).

Já foram reportadas resistências de *P. aeruginosa* ao cloranfenicol, tetraciclina, novobiocina, trimetoprim e macrolídeos, devido a um sistema chamado MexCD de bombas de efluxo que fazem o bombeamento ativo de antimicrobianos do meio intracelular para o extracelular (Neves, 2011). Em uma pesquisa que identificava os principais mecanismos relacionados com fenótipos multirresistentes de *P. aeruginosa* em hospitais brasileiros foram destacados a produção de MBL do tipo SPM-1 e de metilase 16S rRNA RmtD, perda de porina OprD e superexpressão de bombas de efluxo, o que pode explicar os altos índices de resistência a carbapenêmicos e aminoglicosídeos (Neves, 2011).

O que torna *P. aeruginosa* excepcionalmente problemática é uma combinação de fatores: resistência inerente da espécie a muitas classes de drogas; sua capacidade de adquirir resistência, através de mutações, a todos os tratamentos relevantes; suas altas e crescentes taxas de resistência localmente; e seu papel frequente em infecções graves. Alguns isolados de *P. aeruginosa* são resistentes a todos os antibióticos confiáveis, e parece provável que esse problema cresça com o surgimento de integrons que transportam cassetes de genes que codificam tanto as carbapenemases como as amilacinas acetiltransferases (Livermore, 2002; Lincopan e Trabulsi, 2008).

1.3. Resistência bacteriana em ambiente aquático

A cerca do desenvolvimento das resistências, já é sabido que próprio meio ambiente funciona como um grande reservatório de resistência a antimicrobianos (D'Costa, 2006). Sabemos que organismos resistentes entram em ambientes aquáticos a partir de fontes humanas e animais, e são capazes de espalhar seus genes por bactérias nativas da água (Baqueiro, 2008). Os ambientes aquáticos, principalmente, aqueles com intensa ação antrópica, propiciam às bactérias condições para evolução e disseminação de genes resistentes, pois aumentam a taxa de mutações (Lupo A; Coyne S; Berendonk; T, 2012).

A resistência a antibióticos já tem sido observada em vários ambientes aquáticos incluindo rios, áreas costeiras, esgoto doméstico, esgoto hospitalar, sedimentos, águas superficiais, lagos, lagoas, oceanos e água potável (Baqueiro; Martínez; Canton; 2008). Segundo Baqueiro, Martinez e Cantón (2008) e Martinez e Baquero (2014), as bactérias encontradas em corpos hídricos muitas vezes podem ser exógenas e transitórias, ou seja, oriundas de animais, vegetais ou de solo superficial carregado pela chuva.

Jorgensen e colaboradores (2000) encontraram indícios de que o desenvolvimento de resistência antibiótica é favorecido por baixas concentrações de antibióticos distribuídos no ambiente. O despejo de agentes antimicrobianos, bactericidas, detergentes, desinfetantes, resíduos industriais e poluição como metais pesados, leva a progressiva acumulação dessas substâncias no meio, acabam exercendo pressão seletiva sobre as bactérias naturais e favorecendo as cepas resistentes que multiplicam-se e transformam as populações bacterianas sensíveis em populações resistentes (Baqueiro & Martinez, 2008).

É incontestável a influência das atividades humanas na geração de reservatórios ambientais de resistência a antibióticos. Quantidades significativas de antibióticos designados para aplicações humanas foram produzidas comercialmente, usadas clinicamente e liberadas no meio ambiente a partir da década de 1940. Não é possível precisar, mas podemos inferir que milhões de toneladas de compostos já foram dispensados durante o último meio século, promovendo a pressão seletiva constante que manteve populações de cepas resistentes em todos os ambientes. Porém o uso

terapêutico em humanos é responsável por menos da metade de todas as aplicações de antibióticos produzidos comercialmente (Davies J. & Davies D, 2010).

Antibióticos também são usados na produção animal para fins terapêuticos, mas também como promotores do crescimento e melhoria da eficiência alimentar (R. I. Mackie, et al, 2009). As bactérias gastrointestinais, sofrendo pressão seletiva, podem albergar genes de resistência, são excretadas no esterco e armazenadas em sistemas de contenção de resíduos. A aplicação desses resíduos animais em terra é um método comum e um meio de entrada de determinantes de resistência no ambiente (R. I. Mackie, et al, 2009).

Outros usos alternativos de agentes antimicrobianos são usos terapêuticos e profiláticos na aquicultura, e em animais domésticos, controle de pragas, clonagem de plantas e agricultura e o uso como biocidas em produtos de higiene pessoal e em produtos para cuidados com as mãos e produtos de limpeza doméstica, esterilidade, clonagem e seleção de culturas em pesquisa e indústria (Davies J. & Davies D, 2010).

Além disso, persiste em nosso país uma "cultura do antibiótico", em que pacientes esperam receber o remédio e em que médicos banalizam sua prescrição (Guimarães, 2017). A farmacocinética elucida que ao realizarmos um tratamento com um antibiótico, boa parte da droga não é metabolizada, nem mesmo absorvida, portanto não sofre biotransformação, e é eliminada intacta e na forma ativa, na maioria das vezes pela urina (Brunton, Laurence L. et al, 2010). Os afluentes urbanos não tratados adequadamente conduzem essas substâncias para corpos hídricos, onde se acumulam e atuam alterando todo o ecossistema microbiano do ambiente. O uso excessivo desses medicamentos deve ser contido se quisermos frear a expansão de bactérias resistentes (Guimaraes, 2017).

1.4. Laguna de Tramandaí - RS

Os isolados de *Pseudomonas aeruginosa* analisados são oriundos de amostras de água da Laguna Tramandaí (Leite e colaboradores, 2019). “A laguna está situada na porção norte da Planície Costeira do Rio Grande do Sul, entre as coordenadas 29°55’49” S e 30°00’56” S e 50°06’21” W e 50°11’20” W. Uma área de aproximadamente 18.8 km² que, através de um canal de 1,5 km ligam as águas da bacia do rio Tramandaí ao oceano Atlântico (Silva, Toldo e Weschenfelder, 2018).

A bacia atravessa e abastece 17 outras cidades arredores e é de extrema importância para atividades econômicas como: pesca, agricultura, turismo e exploração mineral, contendo um terminal de captura de petróleo, o Terminal Almirante Soares Dutra, Petrobrás Transporte AS (Silva; Toldo; Weschenfelder, 2016). Outros usos para as águas da Laguna são as atividades recreacionais associadas ao turismo, abastecimento público, irrigação de lavouras de arroz e diluição de esgotos doméstico e industrial (Loitzenbauer, Mendes, 2012, Leite e cols, 2019).

Durante os meses de verão, os municípios do Litoral Norte do RS têm um significativo aumento da população devido ao turismo. As flutuações populacionais sazonais podem ultrapassar cinco vezes a população local (Zuanazzi e Bartels, 2018). A falta de saneamento básico em alguns locais, resíduos dispostos inapropriadamente, os despejos de esgotos não tratados adequadamente e o uso intenso de agrotóxicos para produção de alimentos acabam prejudicando a qualidade dos recursos hídricos (Castro, Diston de, 2016).

As relações entre sociedade e natureza ampliaram-se nas últimas décadas e, em especial, na Zona Costeira por causa, entre outros fatores, do processo de urbanização. No entanto, esse rápido crescimento ocasionou uma série de problemas para um ambiente caracterizado por ecossistemas diversificados e de grande suscetibilidade. Os problemas ambientais mais significativos nos meses de dezembro a março, são relativos ao abastecimento e a qualidade das águas (Fugimoto, 2006). Podemos concluir então que a Laguna de Tramandaí – RS é um ambiente com intenso impacto antrópico, tratamento ineficiente, e presença detectada de microrganismos patogênicos humanos. Um ambiente que precisa ser estudado com relação a capacidade de veicular organismos resistentes a antimicrobianos.

Análise e relação entre perfil de resistência de *Pseudomonas aeruginosa* e impacto antropogênico em ambiente aquático litorâneo Laguna de Tramandaí - RS

RESUMO:

A influência das atividades humanas na geração de reservatórios ambientais de resistência a antibióticos vem sendo alvo de estudos devido ao crescente aumento das resistências bacterianas em todo o mundo. A pesquisa dedicou-se a avaliação de uma possível ocorrência de um reservatório de resistência em um ambiente costeiro no sul do Brasil. Definimos o perfil fenotípico de resistência a antimicrobianos em isolados de *Pseudomonas aeruginosa* obtidos a partir de amostras ambientais de água da Laguna de Tramandaí - RS, local com intensa atividade econômica e grande impacto antropogênico. Quatro diferentes pontos de coleta haviam sido definidos conforme o grau de impacto perceptível, permitindo uma análise quanto a disseminação de bactérias resistentes e a relação com o grau de antropização. Para determinação do perfil fenotípico de resistência foi realizado teste de suscetibilidade a antimicrobianos, conforme padrão BrCAST – EUCAST, onde testamos doze antimicrobianos utilizados no tratamento das infecções causadas por esta bactéria. A maioria das cepas foram sensíveis a todos os antimicrobianos testados, entretanto nove cepas mostraram-se resistentes a pelo menos um antibiótico e uma cepa mostrou-se multirresistente. Esses dados mostram que apesar de a laguna conter genes de resistência, conforme observado em estudos anteriores, a espécie de *P. aeruginosa* não parece ser influência alarmante, mas são necessários mais estudos e acompanhamento desse local, visto que quase todas as cepas que apresentaram resistência, resistiram ao grupo dos carbapenênicos, classe de antibióticos mais amplamente utilizada na prática clínica.

Palavras-chave: *Pseudomonas aeruginosa*, resistência a antimicrobianos, impacto antropogênico, corpos hídricos, era pós-antibiótico.

INTRODUÇÃO

A descoberta dos antibióticos e sua ampla aplicação revolucionaram a forma de tratamento de processos infecciosos, um marco e um grande passo para o aumento da expectativa de vida humana. Apesar disso, a eficácia dos agentes antibacterianos vem sendo superadas pela capacidade das bactérias de se tornar resistentes à sua ação (Tenover, 2006).

Sabemos que, as bactérias podem adquirir resistência aos antimicrobianos através de transferência de genes entre cepas bacterianas, promovida por plasmídeos, fagos ou elementos transponíveis, além de produzirem modificações próprias do seu genoma através de mutações (Ferreira, 2014). Essa característica resultou no desenvolvimento da resistência aos antibióticos já desenvolvidos e novos problemas de saúde pública. As resistências abrangem todas as classes conhecidas de compostos naturais e sintéticos (D'Costa, 2006). Seu desenvolvimento nos leva a um rumo perigoso, pois causa sofrimento prolongado aos indivíduos acometidos por bacteremias e aumento dos custos com cuidados de saúde pública.

Pseudomonas aeruginosa é um organismo aeróbico, gram-negativo, naturalmente capaz de múltiplas resistências e está associada a vários quadros de infecções hospitalares. É considerada uma bactéria oportunista, pois sua patogenia está diretamente ligada com a situação imunológica do hospedeiro que infecta. (Pollack, 2000; Neves, 2011). As infecções por *P. aeruginosa* se tornam cada vez mais difíceis de tratar em razão desse aumento das resistências aos antimicrobianos e às limitadas opções terapêuticas (Daryl J. Hoban, et al, 2000, Ortega, Groeneveld e Schiltsz, 2004).

A resistência da *P. aeruginosa* ao imipenem tem sido frequentemente reportada em todo o mundo na última década, o que pode resultar na falha do tratamento (John P. Quinn et al , 1988). Fato que tem gerado preocupações, uma vez que a resistência ao imipenem em *P. aeruginosa* está relacionada com resistência a outras drogas com atividade antipseudomonas (Higging et al, 2002).

A cerca do desenvolvimento das resistências, temos conhecimento de que o próprio meio ambiente funciona como um grande reservatório de resistência a antimicrobianos (D'Costa, 2006). Sabemos que organismos resistentes entram em ambientes aquáticos a partir de fontes humanas e animais, e são capazes de espalhar seus genes em micróbios nativos da água (Baqueiro, 2008). Os ambientes aquáticos e de água doce, principalmente, aqueles com intensa ação antrópica, propiciam às bactérias

condições para evolução e disseminação de genes resistentes, pois aumentam a taxa de mutações (Lupo A; Coyne S; Berendonk; T, 2012). A resistência a antibióticos já tem sido observada em vários ambientes aquáticos incluindo rios, áreas costeiras, esgoto doméstico, esgoto hospitalar, sedimentos, águas superficiais, lagos, lagoas, oceanos e água potável (Baqueiro; Martínez; Canton; 2008).

Jorgensen e colaboradores (2000) encontraram indícios de que o desenvolvimento de resistência antibiótica é favorecido por baixas concentrações de antibióticos distribuídos no ambiente. O despejo de agentes antimicrobianos, bactericidas, detergentes, desinfetantes, resíduos industriais e poluição como metais pesados, leva a progressiva acumulação dessas substâncias no meio, acabam exercendo pressão seletiva sobre as bactérias naturais e favorecendo as cepas resistentes que multiplicam-se e transformam as populações bacterianas sensíveis em populações resistentes (Baqueiro & Martinez, 2008).

A farmacocinética elucida que ao realizarmos um tratamento com um antibiótico, boa parte da droga não é metabolizada, nem mesmo absorvida, portanto não sofre biotransformação, e é eliminada intacta e na forma ativa, na maioria das vezes pela urina (Brunton, Laurence L. et al, 2010). Os afluentes urbanos não tratados adequadamente conduzem essas substâncias para corpos hídricos, onde se acumulam e atuam alterando todo o ecossistema microbiano do ambiente. Outra importante fonte de resistência bacteriana no meio ambiente é a produção animal, em muitos países a utilização desses medicamentos como promotor de crescimento é comum (Thiele-Bruhn, 2003; Gowda et al., 2015). As bactérias comensais podem albergar genes de resistência com capacidade de transferência para as bactérias patogênicas (Marshall; J; Levy, 2009). Determinar o perfil de resistência de *P. aeruginosa* da Laguna de Tramandaí é importante para elucidarmos o nível de disseminação de genes de resistência nessa espécie, em um local que possivelmente esteja atuando como reservatório devido a intensas atividades antrópicas.

2. Material e Métodos

A área de estudo, Laguna de Tramandaí, está localizada na costa norte do estado do Rio grande do sul. Uma área de aproximadamente 18.8 km² que, através de um canal de 1,5 km ligam as águas da bacia do rio Tramandaí ao oceano Atlântico. A bacia atravessa e abastece 17 outras cidades arredores e é de extrema importância para atividades econômicas como: Pesca, agricultura, turismo e exploração mineral, contendo um terminal de captura de petróleo, o Terminal Almirante Soares Dutra, Petrobrás Transporte AS. (Silva; Toldo; Weschenfelder, 2016).

Conforme o aumento da ocupação urbana nas regiões litorâneas do Estado e a dinâmica de uso das águas da bacia hidrográfica do Rio Tramandaí, a degradação ambiental se intensifica e traz como consequência a diminuição da qualidade destes corpos hídricos (Castro, Diston de, 2016). A falta de saneamento básico em alguns locais, o lixo, os esgotos não tratados adequadamente e o uso intenso de agrotóxicos para produção de alimentos acabam acentuando o problema (Castro, Diston de., 2016).

Durante os meses de verão, os municípios do Litoral Norte do RS têm um significativo aumento da população devido ao turismo, que consequentemente aumentam também a demanda de recursos, consumo de água e defluência de esgoto urbano, dejetos e resíduos líquidos, por vezes tóxicos e contaminantes, acabam sendo lançados na Laguna de Tramandaí (Zuanazzi, 2016). Um ambiente que carece de estudos quanto sua capacidade de promover condições para desenvolvimento de resistências.

As coletas foram realizadas durante pesquisas anteriores de Leite e colaboradores (2019) em dois momentos distintos: baixa temporada (agosto de 2014) e alta temporada (janeiro de 2015). Além da variável estacional, os quatro pontos de coleta foram estabelecidos de acordo com o nível de impacto antrópico observado: o Ponto 1 foi fixado próximo a praia de Tramandaí, local com maior fluxo de pessoas, tornando-se mais expressivo durante a alta temporada. O Ponto 2 foi estabelecido junto a margem em uma região com grandes condomínios residenciais. Ponto 3 praticamente no centro da lagoa, área com menor impacto observado, tido como controle e Ponto 4 adjacente à áreas com atividade econômica, como por exemplo, o plantio de arroz.

Os isolados de *Pseudomonas aeruginosa* foram processados e identificados a partir de amostras de água da Laguna de Tramandaí. Foram identificados sequencialmente a partir do ponto 1, como: P1, P2 e assim por diante com exceção de

A20 que foi confundido anteriormente com cepas de *Alcaligenes faecalis* (Leite et al, 2019). Foram adicionados 2 ml de Caldo BHI - Brain Heart Infusion em crio tubo contendo amostras e incubados a 37° C por período aproximado de 24 horas. Foi feita a semeadura em superfície, utilizando meios de cultivo sólido: TSA - Trypticase Soy Agar (meio muito rico) e depois transferidos para Ágar cetrimide - meio de cultura seletivo e diferencial para espécie de *Pseudomonas aeruginosa*. Os esfregaços das colônias isoladas foram corados com técnica de Gram e observados em microscopia óptica para análise morfológica que auxiliou na determinação a nível de espécie. Algumas cepas confirmadas por método MALDI-TOF. Foram obtidos 49 isolados de *Pseudomonas aeruginosa* viáveis que deram início na nossa pesquisa, destes, 15 coletados no Ponto 1, 12 no Ponto 2, 12 no Ponto 3 e 10 no Ponto 4.

Para análise fenotípica do perfil de resistência dos isolados aplicamos o teste de sensibilidade aos antimicrobianos, executado conforme método de disco-difusão em ágar, em concordância com O Comitê Europeu de Testes de Susceptibilidade Antimicrobiana BrCAST - (EUCAST). BrCAST – EUCAST válido a partir de 30-07-2018 . Foram testados 12 antimicrobianos: Piperacilina tazobactam, Ceftazidima, Cefepima, Imipenem, Meropenem, Doripenem (da família dos betalactâmicos). Aztreonam (grupo Monobactam), Gentamicina, Amicacina, Netilmicina (Aminoglicosídeos). Ciprofloxacina e Levofloxacina.(Quinolonas). A leitura do resultado do teste foi feita obedecendo os parâmetros de pontos de corte clínicos do BrCAST – EUCAST. Assim foram caracterizados os organismos como: Sensível, intermediário ou resistente em relação a cada antibiótico. Intermediários foram considerados como resistentes. Foram feitas comparações da distribuição de bactérias resistentes conforme ponto onde foram coletadas para uma possível relação das resistências com o nível de impacto antrópico. Foram consideradas multirresistentes apenas bactérias que apresentaram resistência a um ou mais antimicrobianos de três ou mais categorias testadas (Magiorakos et al, 2012).

RESULTADOS

Dos 49 isolados de *P. aeruginosa* a grande maioria mostrou-se sensível a todos os 12 fármacos testados, foram estes os isolados: P1, P4, P9, P14, A20, P22,

P30,P31, P39, P45, P49, P50, P51, P52, P54, P55, P57, P61, P62, P63, P66, P67, P69, P70, P71, P72, P78, P79, P81, P85, P86, P89, P92, P93, P95, P98, P104, P107, P11 e P113. Os isolados P32, P40, P53, P75, P80, P83, P101, P111, P154 apresentaram resistência a pelo menos um antibiótico. (Quadro 1). Somente um isolado foi multirresistente, P154 (COM, CAZ, IPM, MER, GEN,DOR, LVX, NET).

Não houve cepas resistentes aos antimicrobianos Piperacilina tazobactam, Ciprofloxacina e Amicacina. Dentre os antimicrobianos com cepas resistentes, o Imipenem apresentou o maior número de resistências com cinco cepas resistentes, seguido do Meropenem com quatro cepas resistentes (Quadro 2). Ambos antibióticos pertencentes a classe dos carbapenêmicos.

Quadro 1. Perfil de resistência in vitro de *Pseudomonas aeruginosa* aos fármacos testados.

Isolados Antibióticos aos quais resistiram.

P32	(ATM)
P40	(MER, DOR)
P53	(MER)
P57	(IPM)
P80	(IPM)
P83	(IPM)
P101	(IPM, MER)
P111	(LVX)
P154	(CPM, CAZ, IPM, MER, GEN, DOR, LVX, NET)

Legenda: (ATM) – Astreonom, (MER) – Meropenem, (DOR) – Doripenem, (IMP) – Imipenem, (LVX) – Levofloxacina, (CAZ) – Ceftazidima, (NET) – Netilmicina, (GEN) – Gentamicina, (COM) – Cefepima.

Quadro 2. Número de cepas resistentes por antibiótico testado.

IMIPENEM	5
MEROPENEM	4
DORIPENEM	2
LEVOFLOXACINA	2
CEFEPIMA	1
CEFTAZIDIMA	1
AZTREONAM	1
GENTAMICINA	1
NETILMICINA	1

Ao relacionarmos o número de cepas resistentes com a distribuição entre os Pontos de coleta, notamos que a maioria das cepas resistentes, incluindo P154 (multiresistente) encontrava-se no Ponto 4, cujo impacto antrópico maior deriva de atividades econômicas como plantações de arroz. (Quadro 3).

Quadro 3. Distribuição de cepas resistentes por pontos de coleta e estação de coleta.

Isolados	Ponto de coleta	Estação de coleta
P32	3	Inverno
P40	4	Inverno
P53	1	Verão
P57	1	Verão
P80	2	Verão
P83	3	Verão
P101	4	verão
P111	4	Verão
P154	4	Verão

Vinculando os resultados dos testes de sensibilidade a antimicrobianos com as estações de coleta, notou-se que o maior número de cepas resistentes haviam sido coletadas na alta temporada sete, enquanto que na baixa temporada apenas 2 foram resistentes (Quadro 3).

Discussão:

Estudos anteriores de Leite e cols, 2019 realizados na Laguna de Tramandaí puderam compreender de forma geral a distribuição dos genes de resistência no ambiente a partir da análise de DNA total de amostras do corpo hídrico. Metodologia que reduziu o tempo e o custo da análise. O estudo de Leite detectou a presença de 31 genes relacionados a diferentes fenótipos resistentes - alguns ainda reportados somente no ambiente hospitalar. Estes dados caracterizaram a Laguna como um ambiente que atua como reservatório de bactérias resistentes e genes de resistência.

Neste estudo trouxemos uma definição mais precisa do perfil de resistência fenotípico de *Pseudomonas aeruginosa*, com a utilização de métodos de isolamento em culturas puras e do uso de discos de antibiótico. Foram feitos testes de sensibilidade em relação a 12 antimicrobianos utilizados no tratamento de infecções desse microrganismo e nos propomos a classificar as cepas isoladas quanto ao grau de resistência. Entretanto ainda não existe um consenso sobre uso de termos e definições para bactérias resistentes. Estudos recentes tem destacado a importância de definir os microrganismos conforme o número de classes de antimicrobianos aos quais resistem. A ausência de um consenso ainda é um fato que prejudica as comparações de dados de vigilância e limitam a compreensão do problema de resistência antimicrobiana (Magiorakos et al, 2012).

Numa iniciativa conjunta do Centro Europeu de Doença Prevenção e Controle (CEPCD) e os Centros de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), no ano de 2008 em Estocolmo, foi proposto criar definições para bactérias altamente resistentes e multirresistentes associadas a infecções e aos cuidados de saúde. O grupo de especialistas decidiu concentrar-se na aplicação das definições a *S. aureus*, *Enterococcus spp.*, *Enterobacteriaceae* (com exceção de *Salmonella* e *Shigella*), *P. aeruginosa* e *Acinetobacter spp*, pois são organismos de grande importância clínica. (Magiorakos et al, 2012).

O termo Multidrug-resistant (MDR) refere-se a bactérias resistentes a um ou mais antimicrobianos de três ou mais categorias testadas. Extensively drug-resistant (XDR) é quando os microorganismos são resistentes a um ou mais antimicrobianos em quase todas as categorias (exceto uma ou duas). E Pandrug-resistant (PDR) quando há resistência a todos os agentes antimicrobianos testados. (Cohen et al, 2008). Muitas definições estão sendo usadas para caracterizar padrões de resistência dentro de MDR em Gram-positivos e Gram-negativos (Falagas, Koletsi e Bliziotis, 2006).

Conforme classificação proposta por Magiorakos et al (2012), a partir do nosso N amostral de 49 cepas da espécie de *P. aeruginosa*, nove (18%) apresentaram resistência a pelo menos um antibiótico testado e apenas uma cepa, a P154 mostrou-se multirresistente e a grande maioria mostrou-se sensível a todos os antimicrobianos testados. O resultado nos surpreendeu, pois esperávamos um número maior de multirresistências nos isolados, visto que a Laguna havia sido caracterizada como reator genético em estudos anteriores. Entretanto, ao compararmos com outros trabalhos de pesquisa a cerca da resistência de bactérias em corpos hídricos, observamos coerência. Os estudos de Oliveira e cols (2017) avaliaram o mecanismo de resistência a antibióticos β -lactâmicos em 40 isolados de esgoto hospitalar e águas superficiais do rio Dilúvio na cidade de Porto Alegre usando técnica de PCR multiplex. Foi possível a detecção vários genes de resistência das β -lactamases: β -lactamases de espectro estendido (ESBLs), carbapenemases e β -lactamase AmpC. Os genes estavam presentes em 85% dos isolados. Portanto 18% representa um percentual interessante quando se trata de uma amostra derivada do ambiente, sem pressão direta de antimicrobianos como, por exemplo, um esgoto hospitalar.

Apesar do cenário da Laguna não ter se mostrado alarmante para a espécie de *Pseudomonas aeruginosa*, são necessários mais estudos e frequente acompanhamento, visto que 18% das cepas apresentaram resistência a pelo menos um fármaco testado, e este cenário pode modificar-se rapidamente, visto que a urbanização da região aumenta a cada ano. Além disso, o ambiente se encontra em uma região de transição entre rio e mar, caracterizando um estuário, que são sistemas altamente dinâmicos e complexos. Por isso é muito importante avaliar a variabilidade das populações bacterianas em uma maior escala de tempo a fim de detectar a veiculação de linhagens resistentes e prevenir surtos de infecções de difícil tratamento (Leite e Colaboradores, 2019).

Em nossos resultados observamos que que três dos antimicrobianos que apresentaram mais casos de resistência, o Imipenem, Meropenem e Doripenem, pertencem a classe dos carbapenêmicos. É importante salientar que os carbapenens compreendem uma classe amplamente utilizada no tratamento de infecções envolvendo *Enterobacteriaceae* multirresistente e vários são os mecanismos de resistência que podem impedir a ação dos carbapenens. (Dienstmann e cols 2010).

Importante também destacar o antibiótico que mais apresentou resistência em nosso estudo, o Imipenem, corroborando com ocorrências que tem sido reportado em todo o mundo em relação a problemas de resistência a este fármaco e que geram preocupação. (NNIS, 2001). A resistência ao imipenem tem se tornado comum e está associada a outros tipos de resistência em *Pseudomonas*.

Notamos também que o maior numero de cepas resistentes, inclusive P154, encontravam-se no Ponto de coleta 4 estabelecido próximo a atividades de agricultura como plantações de arroz. Estudos tem demonstrado que agrotóxicos podem deixar patógenos humanos mais resistentes a drogas, pois esses químicos na vegetação tem efeitos sobre pragas como fungos e bactérias que vivem associados a plantas, e o contato com os agrotóxicos permite os microrganismos adquirir resistência/tolerância a drogas ainda no ambiente (Bastos, 2018). Durante o trabalho de Leite e cols, (2019) foi detectada a presença de 3 compostos pesticidas distribuídos ao longo da Laguna, o que foi atribuído a atividades agrícolas do entorno.

Nosso país já é bastante conhecido pelo uso permissivo de agrotóxicos e pesticidas usados na agricultura, e é considerado um problema de saúde pública (Rigoto, 2014). Mas nunca se liberou tanto agrotóxico no país quanto no primeiro semestre deste ano. Só em setembro deste ano, foi concedido o uso de 63 agrotóxicos. Conforme listagem publicada no Diário Oficial da União (DOU).

Os riscos e efeitos diretos que a exposição a essas substâncias altamente tóxicas causam sobre a saúde humana já são bem conhecidos. No entanto, pouco se sabe, ainda, sobre os efeitos indiretos que podem causar, como, por exemplo, em toda a problemática envolvida quanto a resistência de microrganismos no meio ambiente.

Portanto se fazem necessários mais estudos quanto ao impacto desses agrotóxicos na Laguna de Tramandaí- RS. Além de acompanhamento da dispersão dos genes de resistência no local e perfil de resistências das principais bactérias de importância clínica.

CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou que apesar da Laguna de Tramandaí – RS ser qualificada como ambiente reservatório para vários genes de resistência, o cenário ainda não é alarmante para casos de *P. aeruginosas* com múltiplas resistências, mas representa um percentual interessante para um ambiente natural que não sofre pressão direta de antimicrobianos. São importantes mais estudos e acompanhamento do local, pois a resistência dos microrganismos aos carbapenêmicos foi expressiva dentre as cepas de *P. aeruginosa* que apresentaram resistência e a cenário pode piorar, visto que o ambiente sofre com impacto antrópico maior a cada ano.

BIBLIOGRAFIA

ALASIL.; SAAD; MUSBAH. Et. Al.: **Inhibition of quorum sensing-controlled virulence factors and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* by culture extract from novel bacterial species of *paenibacillus* using a rat Model of Chronic Lung Infection.** International Journal of Bacteriology Vol. 15. 2015.

ALÓS JI.: - **Enfermedades infecciosas y microbiología clínica: Quinolonas.** Elsevier. vol. 21, p. 261 - 268. 2003..

ANVISA: **Curso Antimicrobianos - Bases teóricas e uso clínico.** Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controlere/rede_rm/cursos/rm_controlere/opas_web/modulo1/bibliografia.htm Acesso em: 10 out 2019.

BQUERO, F.; MARTÍNEZ, J. L.; CANTÓN, R. **Antibiotics and antibiotic resistance in water environments.** Rev. Current Opinion in Biotechnology. Vol. 19, p. 260 - 265, Jun. 2008.

BASTOS RW. **Influência de antifúngicos ambientais sobre a tolerabilidade aos antifúngicos clínicos, morfo-fisiologia e virulência em *Cryptococcus gattii* e *C. neoformans*.** Tese (Doutorado em Ciências Biológicas-Microbiologia). Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte-MG, p. 104, 2018.

BELIZE, L.; CHAVES, MA.; NUNES, A.; JANK, L.; CORÇÃO, G.: **Antibiotic resistance in surface Waters from a coastal lagoon of Southern Brazil under the impact of anthropogenic activities.** Rev. Ambiente e água. Vol. 14 n. 5, p. 1-17, Taubaté, 2019.

BRASIL. DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO. Órgão: **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento/Secretaria de Defesa Agropecuária/Departamento de Sanidade Vegetal e Insumos Agrícolas/Coordenação-Geral de Agrotóxicos e Afins: Ato nº 62** Edição: 180. p. 4 Set. 2019.

BUSH, K. **β -lactamase inhibitors from laboratory to clinic.** Ver. Clin. Microbiol. P. 109-123, 1988.

CASTRO DE, D.; ROCHA C.M.: **Qualidade das águas na bacia hidrográfica do rio Tramandaí.** Ver. Via Sapiens. Porto Alegre. 2016.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION et al. **National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) system report, data summary from January 1992 through June 2003, issued August 2003.** Rev. Am J Infect Control, v. 31, p. 481-498, 2003.

CHEE-SANFORD J. C., R. I. MACKIE, S. KOIKE, I. G. KRAPAC, Y.-F. LIN, A. C. Yannarell, S. Maxwell, and R. I.: **Fate and transport of antibiotic residues and antibiotic resistance genes following land application of manure waste.** J. Environ.. 38: p. 1086-1106. 2009.

DANEMAN, Lu H, REDELMEIER, DA.: **Fluoroquinolones and collagen associated severe adverse events: a longitudinal cohort study.** BMJ Open. 5:ed 2015.

DAVIES JULIAN. & DAVIES D DOROTHY. **Origin and Evolution of Antibiotic Resistance.** Microbiology and Molecular Biology Reviews. American society for microbiology Journals. 2010; Vol. 74,n. 3 p. 417-433. Set. 2010.

DAVISON, J. **Genetic Exchange between Bacteria in the Environment.** Elsevier. Vol. 42. N. 2. p. 73-91. Set 1999.

D' COSTA V. M. MCGRANN KM; HUGHES DW; WRIGHT GD.. **Sampling the antibiotic resistome.** Ver. Science. vol. 311, p. 374 - 377, Jan. 2006.

DIENSTMANN R. PICOLI S.U. MEYER G. Et al: **Avaliação fenotípica da enzima *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) em Enterobacteriaceae de ambiente hospitalar.** Jornal brasileiro de patologia e medicina laboratorial. Vol. 46. Rio de Janeiro. 2010

FAKUDA, KEIJI. **Antimicrobial resistance global report n Surveillance**. World Health Organization. França, junho 2014.

FLUIT AC.; VERHOEF, J.; SCHMITZ, FJ.; **Antimicrobial resistance in European isolates of *Pseudomonas aeruginosa***. European SENTRY participants. Eur J Clin Microbiol Infect Dis vol.19. p. 370-74, 2000.

FUJIMOTO, N.; STROHAECKER T.; GRUBER N.; KUNST A.; FERREIRA A. “**Litoral norte do estado do Rio Grande do Sul: indicadores socioeconômicos e principais problemas ambientais**”. Ver. Desenvolvimento e Meio Ambiente. n. 13. Editora UFPR p. 99-124, 2006.

GALES, AC.; SADER HS.; JONES RN. **Respiratory tract pathogens isolated from patients hospitalized with suspected pneumonia in Latin America: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility profile: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2000)**. Diagn Microbiol Infect Dis. v. 44, p. 301-311, 2002.

GIAMARELLOU, H.; ANTONIADOU, A. **Antipseudomonal antibiotics**. Ver. Med Clin North Am. Vol. 85, p. 19-42, 2001.

GIRAUD, E.; BAUCHERON, S.; CLOECKAERT, A.: **Resistance to fluoroquinolones in Salmonella: emerging mechanisms and resistance prevention strategies**. Rev. Microbes and Infection. p. 1937-1944, 2006.

GOODMAN E GILMAN: **As bases farmacológicas da terapêutica**" 10ª ed Farmacocinética e farmacodinâmica Dinâmicas de absorção, distribuição, ação e eliminação dos fármacos. P. 3 – 24.

GUDIOL F, MARÍN M: **Antibióticos betalactâmicos Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica** p. 42-55. 2003.

HIGGINS, PG.; FLUIT, AC.; MILATOVIC, D.; VERHOEF, J.; SCHMITZ, FJ.: **Antimicrobial susceptibility of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa***. J Antimicrob Chemother vol. 50, p. 299-301, 2002.

HOBAN DJ, BIEDENBACH DJ, MUTNICK AH, JONES RN. **Pathogen of occurrence and susceptibility patterns associated with pneumonia in hospitalized patients in North America: results of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Study (2000)**. Diagn Microbiol Infect Dis, 45:279-85. 2003.

HOPKINS, K.L., DAVIES, R.H. and THRELFALL, E.J.: **Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella*: recent developments**. International journal of antimicrobial agents, vol. 25(5), p.358-373. 2005.

JORGENSEN, S. E.; HALLING-SORENSEN, B. **Drugs in the environment**. Chemosphere. Chemosphere v. 40, p. 691- 699, 2000.

LIVERMORE, DM. **Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare ?** Rev. Clin Infect Dis, 34: p. 634-40, 2002.

LOITZENBAUER, E., e MENDES, C. A. B.: **Salinity dynamics as a tool for water resources management in coastal zones: An application in the Tramandaí River basin, southern Brazil**. Ocean & Coastal Management. 2012. Disponível em: <http://doi.org/10.1016/j.ocecoaman.2011.10.011.2012>. (Acesso em 2 de out 2019).

LUPO A.; COYNE S.; BERENDONK. **Origin and evolution of antibiotic resistance: the common mechanisms of emergence and spread in water bodies**. Frontiers in microbiology. Jan, 2012.

MAGIORAKOS, AP.; SRINIVASAN, A. CAREY, RB. Et al. **Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance**, Clin Microbiol Infect, vol. 18 p. 268-81, 2012.

MAI, ZAFER; MOHAMED, H. Et al. **Antimicrobial Resistance Pattern and Their BetaLactamase Encoding Genes among Pseudomonas aeruginosa Strains Isolated from Cancer Patients.** BioMed Research International. Vol.14. 2014.

MARSHALL, B. M.; OCHLENG J.; LEVY, S. **Commensals: Underappreciated Reservoir of Antibiotic Resistance: Probing the role of commensals in propagating antibiotic resistance should help preserve the efficacy of these critical drugs.** Microbe, Boston, v. 4, p. 231-238, maio 2009.

MONTELLI, A.C.; SADATSUNE, T. **Antibioticoterapia para o clínico.** Sociedade Brasileira de Microbiologia. P. 7. Rio de Janeiro. 2001.

National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. Rev. A report from NNIS System. **Ajic Special Article.** Atlanta, Georgia, p. 470-485. dez. 2004.

NEVES, Patrícia R.; MAMIZUKA, Elsa M.; LEVY, Carlos E. and LINCOPAN, Nilton. **Pseudomonas aeruginosa multirresistente: um problema endêmico no Brasil.** J. Bras. Patol. Med. Lab. [online], vol.47, n.4, pp.409-420. 2011.

NNIS: National nosocomial infections surveillance (NNIS) system report, data summary from January 1992 – June 2001, issued August 2001. Am J Infect Control. Vol. 29 p. 404-21. 2001.

OLIVEIRA, D.V., NUNES, L.S., BARTH, A.L. et al: **Genetic Background of β -Lactamases in Enterobacteriaceae Isolates from Environmental Samples.** Rev. Microb Ecol 74, 599–607. 2017. doi:10.1007/s00248-017-0970-6

ORTEGA B, GROENEVELD AB, SCHULTSZ C. **Endemic multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa in critically ill patients.** Infect Control Hosp Epidemiol.; 25(10): 825-3, 2004.

PALLASCH, TJ: **Antibiotic resistance.** Dent Clin North AM. , 47:623–629, 2003.

PAPPA-WALLACE, PM.; ENDIMANI, A.; TARACILA, MA.; BONOMO, RA.: **Carbapenems: Past, Present and Future.** Antimicrob Agents Chemother. Vol. 55(11). P. 4943–4960, 2011.

POLLACK, M. MANDELL, G. L.; BENNETT, J. E.; DOLIN, R. **Principles and practice of infectious diseases.** 5 ed. New York: Chuchill Livingstone,. p. 2310-35, 2000.

POLLACK, M.: **Pseudomonas aeruginosa.** In: Mandell GL, Bernnett JE, Dolin R. **Principles and practice of infectious diseases.** New York: Churchill Livingstone. p. 2310-35, 2000.

QUINN JP, STUDEMEISTER; AE, DIVICENZO; CA, LEMER SA. **Resistance to imipenem in Pseudomonas aeruginosa: clinical experience and biochemical mechanisms.** Rev. Infect Dis. P. 892-898, 1988.

RIGOTTO, RM. PAIXÃO, D. VASCONCELOS E ROCHA.: **Pesticide use in Brazil and problems for public health** *Cadernos de Saúde Pública*, 30 (7) 2014. Disponível em : <http://dx.doi.org/10.1590/0102-311XPE020714>. Acesso em 30 de novembro 2019.

SANTANA, C Rodrigo. **PENICILINAS. Curso Básico de Antimicrobianos.** Divisão MI- CMFMRP-USP. 2010.

SAUVAGE, E.; KERFF, F.; TERRAK,; M, AYALA.; JA, CHARLIER,P. **The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis.** FEMS Microbiol Rev. 32 (2):234-58. 2008.

SANTOS AV, MRP da, CARVALHO, MM de et al. **Perfil das infecções hospitalares nas unidades de terapia intensiva de um hospital de urgência.** Revista de enfermagem. Recife: Ufpe On Line, 15 jan. 2016.

SILVA, AF. ; TOLDO JR., ELÍRIO E. ; WESCHENFELDER, J.: **Morfodinâmica da desembocadura da Lagoa de Tramandaí (RS, Brasil)**. PESQUISAS EM GEOCIÊNCIAS (ONLINE) , vol. 44, n. 1 p. 155-166, 2018.

SUAREZ, C. e GUDIOL, F.: **Beta-lactam antibiotics. Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica**, 27, p. 116-129, 2009.

TENOVER, Fred C.. **Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria**. The American Journal Of Medicine. Atlanta, Georgia Usa, p. 3-10. jun. 2006.

TROILLET, N.; SAMORE.; MH, CARMELLI Y: **Imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: risk factors and antibiotic susceptibility patterns**. Clin Infect Dis vol. 25, p. 1094-98, 1997.

WILLIAMS, J.D. **β -lactamases and β -lactamase inhibitors**. Rev. Inter. J. Antimicrob. Agents, vol. 12: p. 3-7, Aug, 1999.

ZAHA A.; FERREIRA H.; PASSAGLIA L. **Biologia Molecular Básica: Elementos Genéticos Móveis**. 5º Edição. Porto Alegre: Artmed, 2014.

ZUANAZZI, P. T.; BARTELS, M. **Estimativas para a população flutuante do Litoral Norte do RS. Porto Alegre: FEE, 2016. Disponível em: <http://www.fee.rs.gov.br/wp-content/uploads/2016/07/20160711relatorio-populacao-flutuante-do-litoral-norte.pdf/> (Acesso em 2 de out 2019).**