

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
COMISSÃO DE GRADUAÇÃO DO CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Avaliação do perfil de resistência de isolados de enterobactérias oriundas
do Arroio Dilúvio, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil**

Milena Conci de Araujo

Porto Alegre, 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
COMISSÃO DE GRADUAÇÃO DO CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Avaliação do perfil de resistência de isolados de enterobactérias oriundas
do Arroio Dilúvio, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil**

Milena Conci de Araujo

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado à Comissão de Graduação do curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sueli T. Van der Sand

Coorientadora: Amanda Muliterno Domingues
Lourenço de Lima

Porto Alegre, 2019

APRESENTAÇÃO

Optou-se por apresentar este trabalho em forma de monografia, conforme possibilitado pela Decisão 01/2018 da Comissão de Graduação em Ciências Biológicas (<http://www.ufrgs.br/comgradbio/>). O presente trabalho obedece aos padrões de apresentação exigidos pelas normas ABNT.

RESUMO

O Arroio Dilúvio é um dos principais cursos d'água de Porto Alegre. Ao longo de seu percurso com 17 km de extensão recebe águas residuais de diversos bairros e cerca de 50 m³ de lixo anualmente; e por conta disso, é um córrego extremamente poluído. Nos últimos anos, diversos estudos têm se dedicado a investigar a relação entre a contaminação dos ambientes aquáticos com os processos de evolução e disseminação de resistência bacteriana. A introdução e acúmulo de poluentes na água resultam em um ambiente com alta pressão de seleção favorecendo a prevalência de microrganismos resistentes. Além disso, por ser um meio altamente conectivo, o sistema aquático acaba atuando como uma interface para o compartilhamento genético entre as comunidades microbianas contribuindo para a dispersão de genes de resistência. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar o perfil de resistência de isolados de enterobactérias provenientes das águas do Arroio Dilúvio, a fim de compreender quais são os mecanismos de resistência presentes em um cenário de grande poluição aquática. Um total de 40 amostras isoladas em um estudo anterior do nosso grupo de pesquisa foram identificadas pelo método de espectrometria de massa através do MALDI-TOF MS Biotyper 4.0. As espécies identificadas foram *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*. Após, foi analisado o perfil de susceptibilidade antimicrobiana pelo método de disco-difusão com 14 antibióticos. Como resultado, sete isolados apresentaram resistência a pelo menos um antibiótico, sendo dois deles considerados multirresistentes. Dentre os microrganismos resistentes, grande parte apresentou resistência à classe de antibióticos β -lactâmicos. Assim, a fim de verificar a produção de enzimas β -lactamases de espectro estendido (ESBL), foi realizado o teste de sinergismo de disco duplo (TSDD). Ao todo, 33% dos isolados foram positivos para o teste, inclusive um dos multirresistentes. Além disso, verificou-se a presença dos genes codificantes de ESBL *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM} e *bla*_{SHV} pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR). As análises indicaram o predomínio do gene *bla*_{TEM} num total de oito isolados. Por fim, através do MALDI-TOF, foram realizadas duas análises dos espectros gerados pelas expressões proteicas dos isolados. Os resultados demonstram certas similaridades entre os isolados que apresentaram resistência e a formação de três grupos distintos entre as *E. coli* avaliadas. A partir destas caracterizações, é possível observar os mecanismos de resistência que estão sendo utilizados pelas enterobactérias presentes no Arroio.

Palavras-chave: Resistência, antimicrobianos, Enterobacteriaceae, ESBL, arroio.

ABSTRACT

The Arroio Diluvio is one of the main water courses in Porto Alegre. Along with its 17 km long route, it receives wastewater from several districts and about 50 m³ of garbage annually; and because of that, it's an extremely polluted stream. In the last years, several studies have been dedicated to investigate the relation between the contamination of the aquatic environments with the processes of evolution and dissemination of bacterial resistance. The introduction and accumulation of pollutants in the water results in an environment with high selection pressure, favoring the prevalence of resistant microorganisms. In addition, because it's highly connective medium, the aquatic system ends up acting as an interface for the genetic sharing between the microbial communities, contributing to the dispersion of resistance genes. The objective of this study was to evaluate the resistance profile of enterobacterias isolates from the Arroio Diluvio waters in order to understand the mechanisms of resistance present in a scenario of high aquatic pollution. A total of 40 isolates isolated in a previous study from our research group were identified by mass spectrometry method using MALDI-TOF MS Biotyper 4.0. The species identified were *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. Afterwards, the profile of antimicrobial susceptibility was analyzed by the disc-diffusion method with 14 antibiotics. As a result, seven isolates showed resistance to at least one antibiotic, two of which were considered multiresistant. Among the resistant microorganisms, the majority presented resistance to the class of β -lactam antibiotics. Thus, in order to verify the production of extended-spectrum β -lactamases (ESBL), the double-disc synergy test (DDST) was performed. In all, 33% of the isolates were positive for the test, including one of the multiresistants. In addition, the genes coding ESBL *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM} and *bla*_{SHV} were verified by the polymerase chain reaction (PCR) technique. The analyzes indicated the predominance of the *bla*_{TEM} gene in a total of eight isolates. Finally, through MALDI-TOF, two spectrum analysis of the protein expressions of the isolates were performed. The results show certain similarities between the resistant isolates and the formation of three groups among *E. coli*. From these characterizations it's possible to observe the resistance mechanisms that are being used by the enterobacteria present in the Arroio.

Key words: Resistance, antimicrobials, Enterobacteriaceae, ESBL, stream.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
1.1 Resistência a antimicrobianos	7
1.2 Resistência a classe dos β -lactâmicos por enterobactérias	9
1.3 Contaminação de ambientes aquáticos	11
1.4 Arroio Dilúvio	13
1.5 Objetivo	15
2. METODOLOGIA	16
2.1 Amostras	16
2.2 Identificação bacteriana.....	16
2.2.1 Análise de dendrogramas pelo MALDI-TOF MS.....	16
2.2.2 Análise de PCA	17
2.3 Teste de susceptibilidade a antimicrobianos	18
2.4 Teste de sinergismo de disco duplo (TSDD)	18
2.5 Identificação molecular dos genes de resistência aos β -lactâmicos.....	19
2.5.1 Extração de DNA dos isolados	19
2.5.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	19
2.5.3 Eletroforese em gel de agarose	20
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
3.1 Identificação bacteriana.....	21
3.2 Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos.....	22
3.3 Teste de sinergismo de disco duplo (TSDD)	27
3.4 Detecção de genes de resistência aos antimicrobianos da classe dos β -lactâmicos.....	30
3.5 Análise de dendrograma pelo MALDI-TOF MS.....	33
3.6 Análise de PCA pelo MALDI-TOF MS.....	37
4. CONCLUSÃO	41
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

1. INTRODUÇÃO

1.1 Resistência a antimicrobianos

Antimicrobianos são substâncias - naturais ou sintéticas - capazes de inibir o crescimento ou causar a morte dos microrganismos. Esses agentes são amplamente utilizados no tratamento de infecções bacterianas em humanos e animais, além de atuarem como biocidas químicos para desinfecção em ambientes clínicos e de processamento de alimentos (VERRAES *et al.*, 2013). A descoberta e comercialização destes compostos, em meados do século XX, desencadearam uma série de avanços na medicina, produção animal e economia mundial, resultando em uma grande revolução (HILTUNEN *et al.*, 2016).

Os diferentes antimicrobianos e seus mecanismos de ação visam comprometer a fisiologia bacteriana, através de processos como: danos à membrana plasmática, inibição da síntese de parede celular, inibição da síntese proteica, inibição da produção de metabólitos essenciais ou da replicação e transcrição de ácidos nucleicos (TORTORA; FUNKE; CASE, 2017). Contudo, uma das implicações na utilização destes agentes é que seus efeitos não se restringem somente a organismos patogênicos, afetando também as bactérias comensais do hospedeiro durante o tratamento (CANSIZOGLU e TOPRAK, 2017).

O consumo de antimicrobianos perturba o equilíbrio das populações bacterianas, pois ao afetar qualquer organismo sensível, acaba resultando no aumento de organismos resistentes e, conseqüentemente, em mudanças nos padrões de infecções, de forma que seus efeitos acabam sendo seletivos (WHO, 2018). Assim, ao fazer o uso de antibióticos, acaba sendo exercida uma pressão de seleção sobre a microbiota, o que favorece o predomínio de microrganismos resistentes e pode levar à disseminação de genes de resistência para outras espécies.

A resistência bacteriana ocorre quando um organismo anteriormente suscetível a um antibiótico se torna resistente à droga, como resultado de um processo adaptativo da célula. Isso acontece por meio de mutações, que são eventos espontâneos e aleatórios dentro de uma população bacteriana, ou por aquisição de genes de resistência através de transferência horizontal entre os microrganismos (VERRAES *et al.*, 2013).

Estudos têm constatado que o desenvolvimento de resistência a antimicrobianos ocorre mais rapidamente em resposta ao uso extensivo dos compostos, tendo relação com a quantidade e tempo de administração, de modo que quanto maior o consumo, maiores serão as chances de apresentar resistência. Isso é resultado da adaptação genética contínua de

bactérias a várias condições de crescimento em ambientes naturais e hospedeiros, gerando variações permanentes nas quais a seleção poderia atuar para enriquecer mutantes resistentes quando a exposição ao antibiótico ocorre (KNÖPPEL *et al.*, 2017). Além disso, através de reconstruções filogenéticas é possível observar que as recentes histórias evolutivas de numerosos patógenos bacterianos foram moldadas quase que exclusivamente pela exposição antimicrobiana sustentada (BAKER, 2015).

As bactérias contam com duas grandes estratégias genéticas para se adaptar aos mecanismos de ação dos agentes antimicrobianos: i) mutações no (s) gene (s) frequentemente associadas ao mecanismo de ação do composto, e ii) aquisição de codificação de DNA estranho para determinantes de resistência. Além disso, os mecanismos de resistência podem ser categorizados de acordo com a rota bioquímica envolvida no processo: i) modificações da molécula antimicrobiana, ii) prevenção para atingir o alvo antibiótico (diminuindo a penetração ou expulsando ativamente o composto antimicrobiano), iii) alterações e/ou desvios de sítios-alvo, e iv) resistência devido a processos adaptativos das células (MUNITA e ARIAS, 2016).

Atualmente, o aumento de microrganismos resistentes e a consequente ineficácia dos antimicrobianos representam uma grande ameaça global. As principais doenças infecciosas matam mais de 11 milhões de pessoas anualmente por conta da resistência bacteriana; e a menos que ações sejam tomadas em todo o mundo, corremos o risco de retornar à era pré-antibiótica (WHO, 2005). O problema é que mesmo que novos antibióticos sejam desenvolvidos, a resistência a eles também se desenvolveria. Além disso, a fabricação destes agentes envolve um processo longo e dispendioso e, devido a limitações naturais e econômicas, o número de novos compostos antimicrobianos aprovados diminuiu na última década (CANSIZOGLU e TOPRAK, 2017).

Para combater o desafio da resistência aos antimicrobianos, a Organização Mundial da Saúde desenvolveu um plano de ação global, chamado One Health, com o objetivo de assegurar pelo maior tempo possível a continuidade e prevenção dos tratamentos. O plano possui cinco objetivos: (i) melhorar a conscientização e a compreensão da resistência antimicrobiana em formuladores de políticas e profissionais; (ii) fortalecer a vigilância e a pesquisa; (iii) reduzir a infecção; (iv) encorajar o uso racional de medicamentos em saúde humana e animal; (v) e aumentar o investimento no desenvolvimento de novos medicamentos, diagnósticos e vacinas. Para que estas premissas sejam alcançadas, usa-se a abordagem de “uma única saúde”, refletindo a relação entre a saúde humana, animal e o meio ambiente, e

exigindo que setores diversos se unam para coordenadamente combater o problema (WHO, 2015).

1.2 Resistência a classe dos β -lactâmicos por enterobactérias

Os antimicrobianos β -lactâmicos são agentes quimioterápicos amplamente utilizados no tratamento de infecções causadas por bactérias Gram negativas. Esta classe é composta pelos antibióticos penicilínicos, carbapenêmicos, monobactâmicos e cefalosporinas (SAGA e YAMAGUCHI, 2009). Seus efeitos se detêm à inibição da síntese de parede bacteriana ou indução de autólise. O anel β -lactâmico presente nestes compostos é semelhante à região em que enzimas transpeptidases se ligam para formar a parede bacteriana. Assim, através da ação das PBPS (proteínas ligantes de penicilinas), estes antibióticos ligam-se às transpeptidases e interferem na síntese da parede. Além disso, os β -lactâmicos também podem desencadear processos de autólise endógena, destruindo a camada de peptidoglicanos presentes na célula e gerando a morte do microrganismo (SUÁREZ e GUDIOL, 2009).

Devido à ampla utilização destes antibióticos, bactérias - especialmente as pertencentes à família Enterobacteriaceae - estão cada vez mais resistentes a eles. Os mecanismos de resistência aos β -lactâmicos podem ocorrer através de inativação enzimática, alteração nos receptores do alvo ou transporte alterado do antibiótico (DROPA *et al.*, 2009; OLIVEIRA, 2011). A estratégia predominante em bactérias Gram negativas é a produção de enzimas β -lactamases, que por suas altas taxas de mutação e consequente diversificação, são grandes alvos de estudos. As β -lactamases de espectro estendido (ESBLs) são as enzimas que mais geram preocupação uma vez que são produzidas por bactérias que degradam β -lactâmicos de espectro estendido, como as penicilinas, cefalosporinas (1ª, 2ª e 3ª geração) e aztreonam, através da hidrólise destes antibióticos (BROLUND, 2014). É justamente devido a este efeito sobre os antibióticos β -lactâmicos de espectro estendido que as enzimas receberam o nome de ESBL.

Por ser uma estratégia adotada principalmente por bactérias Gram negativas, tem sido sugerido que este mecanismo de resistência está relacionado à presença da membrana externa, que permite "controlar" a entrada de moléculas no periplasma. Como grande parte dos β -lactâmicos requer porinas específicas para alcançar as PBPs localizadas na membrana interna, a célula bacteriana controla o acesso dessas moléculas ao periplasma, permitindo a produção de β -lactamases em concentrações suficientes para aumentar a cinética em favor da destruição da molécula antibiótica (MUNITA e ARIAS, 2016).

As bactérias Gram negativas tornam-se resistentes a essa classe de agentes quando adquirem um gene codificante para ESBL e produzem as enzimas (DOI *et al.*, 2017). Esses genes são geralmente denominados *bla*, seguidos pelo nome da enzima específica e podem ser encontrados no cromossomo, em elementos genéticos móveis, como parte do genoma acessório, ou em íntegrans, o que facilita ainda mais a disseminação. Além disso, a transcrição pode ser constitutiva ou pode exigir um sinal externo para induzir a produção (MUNITA e ARIAS, 2016).

Nas últimas décadas, centenas de ESBLs foram descritas e classificadas de acordo com suas propriedades moleculares e bioquímicas. Dentre elas, as enzimas do grupo TEM, SHV e CTX-M destacam-se por serem amplamente relatadas e por seu consequente impacto clínico. As ESBL do tipo TEM foram observadas pela primeira vez em *Escherichia coli*, no ano de 1965, em um paciente grego chamado Temoneira - por isso foram denominadas TEM. Elas possuem uma alta capacidade hidrolítica sobre ampicilina, penicilinas e cefalosporinas de primeira geração (DATTA e KONTOMICHALOU, 1965; PATERSON e BONOMO, 2005). Já as do tipo CTX receberam esta designação devido ao efeito hidrolítico que possuem sobre o antibiótico cefotaxima; enquanto as ESBL do tipo SHV apresentam maior efeito sobre as penicilinas e cefalosporinas de primeira geração. O nome SHV refere-se à variável sulfidríla, uma vez que a atividade destas enzimas está relacionada ao substrato utilizado por elas (PATERSON e BONOMO, 2005).

As ESBLs do grupo CTX-M são as mais predominantes globalmente e seus principais hospedeiros são as espécies *E. coli* e *K. pneumoniae* (DOI *et al.*, 2017). Neste cenário, as enterobactérias possuem grande importância, uma vez que causam infecções no sistema nervoso central, trato respiratório inferior, corrente sanguínea, trato gastrointestinal e urinário fazendo parte também da microbiota intestinal (BROLUND, 2014). A família Enterobacteriaceae - especialmente *Klebsiella spp.* - produtoras de ESBLs estão sendo estabelecidas, desde 1980, como uma das principais causas de infecções hospitalares, tais como pneumonia, infecções da corrente sanguínea, infecções em recém-nascidos e em pacientes em tratamento de terapia intensiva (RAWAT e NAIR, 2010; WHO, 2018). Além disso, *E. coli* produtoras de ESBL estão sendo relatadas como as maiores causadoras de infecções do trato urinário adquiridas (HERTZ *et al.*, 2015; DODDS, 2016; GREENHOUSE, *et al.*, 2017).

Segundo a OMS, dentre os patógenos que representam as maiores ameaças em relação à resistência antimicrobiana encontram-se *E. coli* resistentes a cefalosporinas de 3ª geração e a

beta-lactâmicos conferidos por ESBLs, e *K. pneumoniae* resistentes a cefalosporinas e carbapenemases de 3ª geração. Ações integradas de vigilância destes organismos estão sendo desenvolvidas em todos os continentes (DODDS, 2016; WHO, 2018).

Em relação aos riscos associados à disseminação e aquisição destes patógenos, diversos fatores estão envolvidos, desde hábitos cotidianos até a exposição a ambientes hospitalares e antimicrobianos. De acordo com DOI *et al.* (2017), cinco fontes foram postuladas como principais vetores contribuintes para a crescente prevalência de colonização por Enterobacteriaceae produtoras de ESBL em países desenvolvidos: (i) alimentos de origem animal, devido a grande carga de antimicrobianos utilizados na criação; (ii) animais domésticos, devido ao contato e proximidade física com seus donos; (iii) humanos, pelo contato de pessoa para pessoa, especialmente entre membros da família; (iv) ambiente, pela contaminação de águas residuais; e (v) viagens internacionais, que criam oportunidades para que esses microrganismos sejam transportados por diversos locais. Além disso, tratamentos com antimicrobianos de outras classes, que possuem mecanismos de ação diferentes dos β -lactâmicos - como aminoglicosídeos -, também estão sendo considerados fatores de riscos potentes para a infecção ou colonização por Enterobacteriaceae produtoras de ESBLs (NAKAI *et al.*, 2016).

O que chama atenção dos pesquisadores, é que a maior concentração de portadores de ESBL produzidas por enterobactérias encontra-se no sudeste Asiático, seguido do Pacífico Ocidental, Mediterrâneo Oriental e da África, enquanto a América e a Europa possuem uma concentração menor. Esses dados sugerem que o acesso precário à água potável, a pobreza e a alta densidade populacional são os grandes fatores no que diz respeito à disseminação de ESBLs, e a água possui um papel crucial neste processo (WOERTHER *et al.*, 2013).

1.3 Contaminação de ambientes aquáticos

O ambiente aquático é um dos ecossistemas mais impactados pela poluição. A constante introdução de dejetos e consequente contaminação do meio por microrganismos patogênicos são responsáveis por uma série de infecções em humanos e animais. Mundialmente, estima-se que as principais doenças transmissíveis pela água matam mais de 2 milhões de pessoas por ano (TORTORA; FUNKE; CASE, 2017). Além disso, a poluição química da água tem sido associada a diversos processos envolvidos com a aquisição e dispersão de resistência bacteriana na natureza.

Diversos autores têm se dedicado à investigação da contaminação da água por moléculas e substâncias, seus efeitos na disseminação de microrganismos resistentes a antimicrobianos e sua contribuição com os mecanismos evolutivos envolvidos na dispersão de genes de resistência (ALLEN *et al.*, 2010; HOLMES *et al.*, 2016; MARTI *et al.*, 2014). Os estudos apontam que os ambientes aquáticos e suas populações bacterianas podem atuar como potentes reservatórios para os genes de resistência, mas a dinâmica envolvida na aquisição, manutenção e dispersão desses elementos ainda é pouco compreendida (HILTUNEN *et al.*, 2016). Contudo, a ação antropogênica é apontada como a grande responsável pelas fontes de contaminação direta ou indiretamente.

O depósito e acúmulo progressivo no ambiente de agentes antimicrobianos, detergentes, desinfetantes, resíduos da poluição industrial, como metais pesados, e da agricultura, têm sido considerados como os principais contribuintes para a evolução e disseminação dos organismos resistentes (BAQUERO *et al.*, 2008). A presença desses componentes na água resulta em um quadro de estresse para a microbiota do meio e, conseqüentemente, em um aumento de pressão seletiva, uma vez que frente ao ambiente poluído, os microrganismos com maior adaptabilidade - ou *fitness* - são selecionados. Neste cenário, os processos envolvidos na transferência e compartilhamento de conteúdo genético são facilitados (HOLMES *et al.*, 2016).

A aquisição de genes de resistência pode ocorrer por eventos de mutações, recombinação gênica ou transferência horizontal. Além disso, eles podem ser disseminados através de elementos genéticos móveis, incluindo plasmídeos, sequências de inserção, transposons, integrons, ilhas genômicas, elementos conjugativos integrantes, bacteriófagos, entre outros; e uma vez que o conteúdo genético esteja nessas plataformas a probabilidade de sua manutenção no ecossistema aumenta. Por esta razão, os genes de resistência estão sendo considerados, por si só, como agentes poluentes (MARTI *et al.*, 2014; MARTINEZ, 2009).

Sabe-se que a água desempenha um papel crucial nestes processos. As populações microbianas são formadas por complexas redes evolutivas, as quais estão diretamente relacionadas a fatores ambientais (BERENDONK *et al.*, 2015). Microrganismos resistentes a antimicrobianos podem ser facilmente encontrados em fontes de água potável tratada, relacionados com antibióticos que entram no ciclo da água através de esgotos domésticos e eliminação de águas residuais industriais, agricultura, pecuária intensiva e aquicultura (ONU, 2019). Além disso, a dinâmica das comunidades microbianas em águas residuais está sob influência de diversos fatores bióticos e abióticos que colaboram com a propagação dos genes

de resistência (ALLEN *et al.*, 2010), tais como: condições de tratamento, região geográfica, salinidade, concentração de oxigênio dissolvido na água, abundância e tipo de substratos orgânicos e temperatura, sendo estes dois últimos os fatores mais efetivos (ZHANG *et al.*, 2012; NOVO *et al.*, 2013), juntamente com a prevalência de determinadas espécies na comunidade microbiana presente nos ambientes aquáticos; o que possibilita a dispersão de genes de resistência. Assim, por ser um meio altamente conectivo e de sua grande pressão seletiva, o ambiente aquático acaba atuando como uma interface para a interação das comunidades microbianas possibilitando uma maior manutenção e dispersão dos elementos genéticos móveis e, conseqüentemente, contribuindo com o desenvolvimento de resistência.

Assim, avaliar o perfil de resistência de populações microbianas de ambientes aquáticos é um dos passos precursores para aumentar nossa compreensão a respeito da ecologia envolvida nestes processos, de modo que seja possível futuramente sugerir e implementar estratégias de combate.

1.4 Arroio Dilúvio

O Arroio Dilúvio é um dos principais cursos d'água de Porto Alegre. Sua nascente está localizada no Parque Natural Municipal Saint'Hilaire, no município de Viamão, e sua foz no Lago Guaíba, entre os parques Maurício Sirotsky Sobrinho e Marinha do Brasil, em Porto Alegre. A microbacia do Dilúvio tem cerca de 80 km², dos quais 19% estão localizados em Viamão (Prefeitura Municipal de Porto Alegre, 2018). Ao longo do seu percurso, recebe as águas de importantes afluentes, como o Arroio dos Marianos, Beco do Salso, São Vicente, Mato Grosso, Agronomia, Moinho, Cascata e Águas Mortas. Próximo às cabeceiras, une-se aos Arroios Vitorino, Taquara, Pequeno, Casa Velha e Sem Nome, formando a Represa da Lomba do Sabão (YOUNG, 2010).

O Arroio possui 17 km de extensão total, atravessando a cidade no sentido leste-oeste, além de cerca de 12 km de área canalizada ao longo da Avenida Ipiranga, em Porto Alegre (DMAE, 2018). A canalização do Dilúvio foi iniciada na primeira metade do século XX, juntamente com a alteração de sua foz, com o objetivo de evitar alagamentos em diversos pontos da cidade. É justamente devido a esses frequentes alagamentos que o Arroio recebeu o nome de Dilúvio. Além disso, a canalização acabou também por urbanizar, valorizar e remodelar uma imensa região da cidade (DEVOS *et al.*, 2010).

Atualmente, o Arroio Dilúvio percorre mais de 15 km em áreas de grande concentração populacional, tornando-se um dos córregos mais poluídos de Porto Alegre e

tendo em sua foz, um dos principais pontos de entrada da poluição orgânica e de metais pesados no Lago Guaíba (ANDRADE, 2018). Ainda, recebe um volume significativo de águas servidas (por deficiência nas redes cloacais ou ligações clandestinas) e cerca de 50 mil metros cúbicos de lixo anualmente (Prefeitura Municipal de Porto Alegre, 2018), o que contribui diretamente para a deterioração da qualidade da água, fato observado por monitoramento do Departamento Municipal de Águas e Esgotos (DMAE) e, visualmente, pela população que circula nas imediações da Avenida Ipiranga. Também pode-se constatar um acúmulo de sedimentos no canal do Arroio, cuja principal causa é a expansão da cidade em direção às cabeceiras e topos de morros (YOUNG, 2010).

Devido à alta carga de materiais e poluentes depositados diariamente no Arroio Dilúvio, ele necessita de dragagens periódicas. Este trabalho é realizado pelo Departamento de Esgoto Pluviais de Porto Alegre (DEP), em um programa independente em relação às demais dragagens realizadas na cidade. Porém, de acordo com a Prefeitura de Porto Alegre, nenhum outro procedimento químico, físico ou biológico para a redução de contaminantes e consequente tratamento da água é realizado.

O Arroio Dilúvio desempenha um importante papel ecossistêmico para Porto Alegre, pois ao longo de sua extensão, recebe esgoto cloacal sem tratamento e com a provável presença de antibióticos, desinfetantes, resíduos industriais e metais pesados de diversos bairros da cidade. A presença desses contaminantes pode estar levando ao aumento da pressão de seleção dos microrganismos, permitindo a disseminação de bactérias resistentes e dispersão de elementos genéticos móveis que conferem resistência aos organismos. Devido a sua alta conectividade biológica intra e interespecífica, o Arroio Dilúvio atua como um reator genético (BAQUERO *et al.*, 2008) em potencial, propiciando o aumento da variabilidade genética dos microrganismos. Uma vez que não há ainda um tratamento que seja ao mesmo tempo barato, eficiente e seguro para a retirada de antibióticos e de genes de resistência dos ambientes aquáticos, estes acabam sendo re-introduzidos através da captação da água para consumo da população de Porto Alegre; o que acaba se tornando não apenas um problema de saúde pública, mas também um problema ambiental. Aumentar a nossa compreensão a respeito do Arroio Dilúvio e os processos envolvidos com a resistência a antimicrobianos é crucial para que medidas de combate sejam tomadas.

Além disso, ao demonstrar a ocorrência de antibióticos no ambiente natural como um fator importante para a seleção de resistência, é dado o subsídio necessário para que novas abordagens sejam desenvolvidas a fim de considerar a seleção de resistência no ambiente

natural como um ponto crucial na avaliação de segurança de novas substâncias antibióticas (BOXALL *et al.*, 2012).

1.5 Objetivo

O presente estudo teve como objetivo principal avaliar do perfil de resistência a antimicrobianos de isolados pertencentes à família Enterobacteriaceae provenientes das águas do Arroio Dilúvio, de modo a compreender a relação deste ambiente com o desenvolvimento de resistência bacteriana.

2. METODOLOGIA

O presente estudo foi realizado no Laboratório de Microbiologia Aplicada do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

2.1 Amostras

As amostras são provenientes de água do Arroio Dilúvio e pertencem à coleção do Laboratório de Microbiologia Aplicada. Elas foram coletadas e isoladas em um estudo anterior (OLIVEIRA e VAN DER SAND, 2011). Um total de 40 isolados foi utilizado neste trabalho. Todos estavam mantidos em caldo tripticaseína de soja (TSB), sob refrigeração. Inicialmente, foi feito o isolamento das amostras em ágar triptona de soja (TSA) para verificar a pureza e morfologia das colônias.

2.2 Identificação bacteriana

A identificação dos isolados foi realizada pelo método de espectrometria de massa através do MALDI-TOF Biotyper 4.0 (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany) (DALTONICS, 2015) utilizando o protocolo de transferência direta de acordo com as instruções do fabricante. Inicialmente, as colônias isoladas em meio TSA são transferidas para uma placa de aço inoxidável e sobre elas é adicionada uma matriz proteica. O equipamento possui um laser capaz de ionizar essa matriz, acelerando as moléculas presentes na mesma. Através de um tubo de vôo a vácuo, as moléculas ionizadas são separadas de acordo com seu peso molecular e o tempo de chegada no detector do equipamento. As mais leves chegam primeiro, enquanto as mais pesadas chegam depois.

Essa diferença entre o tempo de chegada das moléculas no detector resulta na formação de um espectro, o qual é comparado com outros espectros presentes no banco de dados do equipamento, informando então, a qual espécie pertence aquele padrão detectado.

2.2.1 Análise de dendrogramas pelo MALDI-TOF MS

Para avaliar quantitativamente se o MALDI-TOF MS poderia distinguir os diferentes isolados foi realizado uma análise de agrupamento de ligação única de todos os espectros e

originado um dendrograma para representar graficamente os resultados. Os espectros principais ou projeção média de espectros (MSPs) foram os componentes fundamentais sobre os quais foi realizada a identificação do espectro no MALDI Biotyper, embasada em um algoritmo de reconhecimento de padrões usando posições, distribuições de intensidade e frequências dos picos. O dendrograma de MSP foi criado pela correspondência de MSPs dos isolados aos espectros de referência armazenados no banco de dados da biblioteca de MSPs do Biotyper 4.0. No dendrograma, os MSPs foram atribuídos a nós taxonômicos ordenados hierarquicamente. No agrupamento hierárquico foi utilizado um algoritmo baseado em dendrogramas a partir da distância das espécies e um algoritmo de ligação que os unia.

Um dendrograma de todos os isolados do estudo foi construído usando o método padrão de criação de dendrograma do software Biotyper 4.0 (Bruker Daltonics, Alemanha). A medida de distância utilizada para a montagem dos dendrogramas foi de correlação medida pelo algoritmo de ligação médio. Os clusters foram consequentemente analisados de acordo com os níveis de distância arbitrários orientados pelos valores de escores de 300 a 0 (valor limite de escore de 300 para um único organismo e valor limite de escore de 0, para os organismos relacionados). No dendrograma a proximidade das relações dos organismos entre si é refletida por um nível de distância arbitrário. A semelhança numérica entre dois isolados é o valor de similaridade do ponto em que os dois ramos divergem.

2.2.2 Análise de PCA

A análise de componentes principais (PCA) foi utilizada para determinar os clusters com a expressão de proteína similar. Esta análise estatística fornece informações sobre a hetero/homogeneidade do conjunto de dados. O PCA de todos os isolados do estudo foi construído usando o método padrão de criação de PCA do software Biotyper 4.0 (Bruker Daltonics, Alemanha). A medida de distância utilizada para a montagem dos PCAs foi de correlação medida pelo algoritmo de ligação médio. O limite inferior foi estabelecido em 3.000 unidades arbitrárias, limite superior a 15.000 unidades arbitrárias e resolução 2. O PCA é usado principalmente como um método de redução de dados e ferramenta de visualização. A plotagem de dados no sistema de coordenadas com base nos componentes principais geralmente destaca relacionamentos e clusters que não seriam aparentes se os dados fossem plotados usando as coordenadas originais.

2.3 Teste de susceptibilidade a antimicrobianos

Os testes de susceptibilidade antimicrobiana foram realizados de acordo com as normas estabelecidas pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2017). O método consiste na suspensão direta das colônias em solução salina 0,9% de modo a obter densidade equivalente ao padrão de turbidez 0,5 da escala McFarland (aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL). Essa suspensão é preparada a partir de um crescimento de 16h das amostras no meio de cultura ágar Mueller-Hinton a 35°C. Com o auxílio de um swab estéril o inóculo é espalhado uniformemente em três direções sobre a superfície de uma placa com meio de cultura ágar Mueller-Hinton. Por fim, há a aplicação dos discos de antimicrobianos sobre o meio e incubação a 35°C \pm 1 por 16/18h. Após este período, mede-se o halo de inibição resultante com um paquímetro.

Para validação do teste, foi utilizada uma cepa padrão *Escherichia coli* ATCC 25922. Os antimicrobianos testados foram: Amoxicilina/Ácido clavulânico (AMC 30µg), Ampicilina (AMP 10µg), Cefalotina (CFL 30µg), Cefoxitina (CFO 30µg), Ceftriaxona (CRO 30µg), Ciprofloxacina (CIP 5µg), Clorafenicol (CLO 30µg), Estreptomomicina (EST 10µg), Gentamicina (GEN 10µg), Imipenem (IMP 10µg), Nitrofurantoína (NIT 300µg), Norfloxacin (NOR 10µg), Sulfazotrim (SUT 25µg) e Tetraciclina (TET 30µg).

2.4 Teste de sinergismo de disco duplo (TSDD)

Após a verificação da susceptibilidade antimicrobiana, os isolados resistentes e intermediários foram submetidos ao teste fenotípico de detecção de Enterobacteriaceae produtoras de ESBL. O ensaio é o mesmo utilizado para os testes de susceptibilidade, com a diferença de que no TSDD há a aplicação de três discos contendo cefalosporinas (Cefotaxima 30µg, Ceftazidima 30µg, Cefepima 30µg) próximos a um disco com ácido clavulânico (Amoxicilina/Ácido Clavulânico 30µg) sobre o meio de cultura. Após a incubação a 35°C \pm 1 por 16/18h, mede-se o halo de inibição resultante com um paquímetro. O resultado é positivo quando as zonas de inibição em torno de qualquer disco de cefalosporinas são aumentadas na direção do disco contendo ácido clavulânico.

Os testes foram realizados de acordo com as normas estabelecidas pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2017), e para validação, foi utilizada uma cepa padrão *E. coli* ATCC 25922.

2.5 Identificação molecular dos genes de resistência aos β -lactâmicos

Os isolados foram submetidos a identificação dos genes de resistência a β -lactâmicos, utilizando os genes *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM} e *bla*_{SHV} pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR). As condições para a PCR foram realizados de acordo com estudos anteriores (OLIVEIRA e VAN DER SAND, 2011; MOOSAVIAN *et al.*, 2016), com modificações.

As amostras utilizadas como controles positivos para os três genes foram cedidas pelo professor Dr. Afonso Luís Barth e pertenciam à coleção do Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

2.5.1 Extração de DNA dos isolados

A extração de DNA foi efetuada através da técnica de lise térmica, de acordo com o protocolo descrito por Lentz *et al.* (2017). Os isolados foram, primeiramente, cultivados em ágar Mueller-Hinton a 35°C por um período de 18 a 24h. A técnica consiste na suspensão direta das colônias em um microtubo contendo 700 μ L de tampão TE (10mM Tris, 1mM EDTA, pH 7,8), de modo a obter densidade equivalente ao padrão de turbidez 0,5 da escala McFarland. Após, os tubos são incubados em banho seco a 80°C durante 20 minutos e, em seguida, colocados no freezer a 20°C por pelo menos 20 minutos antes da utilização.

2.5.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 25 μ L. A mistura da reação conteve: DNA (30ng); 1,5 mM de MgCl₂ para o *bla*_{TEM} e o *bla*_{CTX-M} e 2,5 mM de MgCl₂ para o *bla*_{SHV}; tampão de reação 1x; 0,4 μ M de cada primer; 0,2 mM de deoxinucleotídeos para o *bla*_{TEM} e para o *bla*_{CTX-M} e 0,3 mM para o *bla*_{SHV}; 200 ng de soro albumina bovino (BSA); 1 U unidade de Taq polimerase; água mili-Q estéril para completar o volume final. As sequências de cada *primer* específico estão apresentadas na Tabela 1. As reações foram realizadas em termociclador (ProFlex™ PCR System, ThermoFisher Scientific).

Tabela 1: Sequências dos *primers* específicos dos genes que codificam as enzimas β -lactamases TEM, SHV e CTX-M.

Genes	Primers (5' - 3')	Temperatura de anelamento (°C)	Amplicon (pb)
<i>bla</i> _{TEM}	F: GTGCGCGGAACCCCTATT R: TTACCAATGCTTAATCAGTGAGGC	55	968
<i>bla</i> _{SHV}	F: AGCCGCTTGAGCAAATTAAC R: ATCCCGCAGATAAATCACCAC	59	861
<i>bla</i> _{CTX-M}	F:TTTGCGATGTGCAGTACCAGTAA R:CGATATCGTTGGTGGTGCCATA	55	590

Fonte: Adaptado de OLIVEIRA e VAN DER SAND, 2011; MOOSAVIAN *et al.*, 2016.

As condições de amplificação utilizadas nas reações de PCR para detecção dos genes de resistência estão indicadas na tabela 2.

Tabela 2: Condições de amplificação das reações de PCR para os genes analisados.

Gene	Desnaturação inicial	Ciclos	Extensão final
<i>bla</i> _{TEM}	5 min a 94°C	35x 1 min – 94°C	
		1 min – 55°C	
		1 min – 72°C	
<i>bla</i> _{SHV}	5 min a 95°C	35x 1 min – 95°C	5 min a 72°C
		1 min – 59°C	
		1 min – 72°C	
<i>bla</i> _{CTX-M}	5 min a 94°C	30x 1 min – 94°C	
		45 seg – 55°C	
		1 min – 72°C	

Mín: minutos; Seg: segundos.

2.5.3 Eletroforese em gel de agarose

Os fragmentos obtidos através da técnica da PCR foram revelados de acordo com o protocolo descrito por Green e Sambrook (2012). Houve a adição de tampão de corrida 6x na proporção 1:3 de DNA em gel de agarose 1,2 %, juntamente com o marcador molecular Ladder 100 pb (Ludwig Biotecnologia Ltda.). O gel foi submetido a 100V de voltagem, 80mA de corrente e 80W de potência em tampão TAE 1 x, por 40 minutos. Após, o gel foi suspenso por 1 hora em uma solução contendo água destilada, tampão TAE 50x e o corante SYBRTM Gold (Invitrogen, Carlsbad, CA). Por fim, o gel foi visualizado e digitalizado em fotodocumentador (SmartView Pro Imager, CMOS, UVCI-1200, Major Science)

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Identificação bacteriana

Após o isolamento para verificação da pureza e morfologia das colônias, os isolados foram identificados pelo método de espectrometria de massa. As espécies predominantes foram *E. coli* (95%) e *K. pneumoniae* (5%). Este resultado é compatível com o estudo anterior no qual as amostras foram coletadas. Oliveira e Van der Sand (2011) verificaram que no Arroio Dilúvio houve prevalência dos gêneros *Escherichia* e *Klebsiella*, seguido por *Citobacter* e *Shigella*. O predomínio destas espécies pode estar relacionado à alta descarga de resíduos e esgotos domésticos que são depositados constantemente no Arroio.

Em ambientes aquáticos, a estrutura das comunidades bacterianas é um dos fatores que influenciam na dinâmica dos organismos resistentes, podendo promover o aumento e a disseminação de resistência (NOVO *et al.*, 2013). Assim, conhecer as espécies microbianas presentes no meio em questão é fundamental para inferir suas relações com o ambiente e avaliar os efeitos da poluição no desenvolvimento de resistência.

No presente estudo, foi constatada uma alta prevalência de *E. coli*, o que pode estar relacionado à contaminação do Arroio Dilúvio. Os agentes presentes na água fazem com que os microrganismos sejam expostos a um ambiente com condições estressantes, causando um desequilíbrio nas comunidades bacterianas e fazendo com que algumas espécies mais adaptadas prevaleçam sobre outras, como é o caso de *E. coli*. Devido à associação destes microrganismos com aquisição de infecções hospitalares, diversos estudos têm se dedicado a compreender a dinâmica de *E. coli* no ambiente, a fim de evitar a disseminação de cepas resistentes (JANG *et al.*, 2017).

E. coli é uma enterobactéria, ou seja, faz parte da família Enterobacteriaceae e é uma das espécies que compõem a microbiota intestinal de humanos e outros mamíferos. Por isso, estes microrganismos são comumente utilizados como bioindicadores em análises de qualidade da água podendo revelar quadros de grande contaminação fecal (WANJUGI *et al.*, 2016). Ainda, devido ao seu habitat, estas bactérias são comumente expostas a antimicrobianos - tanto no hospedeiro quanto no ambiente -, sendo diretamente submetidas a uma grande pressão de seleção (LOOFT *et al.*, 2012), e como sabemos, isso possui grandes implicações no desenvolvimento de resistência.

No presente estudo, a alta prevalência de *E. coli* nas águas do Arroio Dilúvio pode refletir este cenário de contaminação fecal, pois uma vez que ele recebe o esgoto cloacal de

diversos bairros de Porto Alegre, o domínio desta espécie pode estar associado à quantidade de dejetos diariamente recebidos. Além disso, no Dilúvio deságuam uma série de efluentes domésticos e hospitalares, fazendo com que *E. coli* associadas à humanos, patogênicas ou não, sejam constantemente disseminadas para este ambiente.

3.2 Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos

A análise do perfil de resistência aos antimicrobianos revelou a presença de sete (17,5%) isolados resistentes a pelo menos um antimicrobiano. Os microrganismos apresentaram maior resistência a classe dos β -lactâmicos (12,5%), seguido por aminoglicosídeos (5%), afenicois (2,5%) e tetraciclinas (2,5%). Além disso, nove (22,5%) isolados apresentaram resistência intermediária, indicando uma eficácia indefinida dos antibióticos sobre esses microrganismos. Dentre eles, onze (27,5%) foram intermediários para pelo menos um antibiótico da classe dos β -lactâmicos e um (2,5%) para aminoglicosídeos. A cefalotina foi o antibiótico que mais obteve isolados resistentes (10%) e intermediários (12,5%). Resultados semelhantes foram encontrados por Belachew *et al.* (2017) em um estudo realizado com águas de efluente urbano, onde houve uma alta prevalência de enterobactérias resistentes a cefalotina, juntamente com outros β -lactâmicos.

Além disso, no presente estudo, dois (5%) isolados apresentaram resistência a três classes distintas de antimicrobianos - penicilinas, cefalosporinas e aminoglicosídeos - o que caracteriza um perfil de multirresistência. Esta classificação segue os parâmetros estabelecidos por MAGIORAKOS *et al.*, 2011. Um cenário semelhante foi observado em sistemas aquáticos, por Tacão *et al.* (2014), no qual constataram altos níveis de multirresistência entre isolados resistentes a cefalosporinas de terceira geração.

Já em relação aos antimicrobianos aos quais os isolados foram mais suscetíveis, destacam-se a ciprofloxacina, nitrofurantoína, norfloxacin, sulfazotrim e o imipenem. A tabela 3 ilustra estes resultados juntamente com os dos demais isolados analisados.

Tabela 3: Perfil de resistência dos isolados provenientes do Arroio Dilúvio.

Amostra	Antimicrobianos													
	AMC	AMP	CFL	CFO	CRO	CIP	CLO	EST	GEN	IMP	NIT	NOR	SUT	TET
<i>E. coli</i> ATCC 25922	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
1BE08	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
2EC10	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	R
1AE09	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
1BC02	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
1EC10	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
1AE12	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
1BC01	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
1D502	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
1EC09	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
1EE08	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
1DT21	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
1AE01	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
CC03	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
2DE04	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

CONTINUA

2BE28	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
1BE23	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
1AE05	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
1AT10	S	S	I	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S
1OC09	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
1DE04	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
CA01	I	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
1EE06	S	S	S	R	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S
1AT11	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
1CE01	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
2CE06	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
1B516	R	S	R	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S
2DE02	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
2DE11	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
2BE03	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
2C517	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
2EC04	R	R	R	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S
1CE03	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

CONTINUA

1CT21	S	I	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
1CC05	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
2EE07	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
1AT05	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
1BE05	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
2AC01	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
1CC02	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
1DE08	S	I	I	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S

S: Sensível; I: Intermediário; R: Resistente; AMC: Amoxicilina/Ác. Clavulânico; AMP: Ampicilina; CFL: Cefalotina; CFO: Cefoxitina; CRO: Ceftriaxona; CIP: Ciprofloxacina; CLO: Clorafenicol; EST: Estreptomicina; GEN: Gentamicina; IMP: Imipenem; NIT: Nitrofurantoína; NOR: Norfloxacin; SUT: Sulfazotrim; TET: Tetraciclina.

No presente estudo, os isolados apresentaram maior resistência ou resistência intermediária às cefalosporinas e penicilinas, que são agentes que compõem a classe dos antimicrobianos β -lactâmicos. Um quadro semelhante foi observado em outros trabalhos sobre resistência antimicrobiana em ambientes aquáticos brasileiros, como lagos (FREITAS *et al.*, 2019), rios (CONTE *et al.*, 2017) e águas residuais (PRADO *et al.*, 2008; CHAGAS *et al.*, 2011; CONTE *et al.*, 2017).

A presença de enterobactérias resistentes aos β -lactâmicos em ambientes aquáticos é decorrente de múltiplos fatores. Os antimicrobianos desta classe são amplamente utilizados na medicina humana e veterinária no combate de bactérias Gram-negativas devido aos seus efeitos na inibição de síntese de parede bacteriana e indução de autólise (SUÁREZ e GUDIOL, 2009). Uma vez que estes antibióticos são eliminados no ambiente, a resistência pode estar relacionada ao consumo indiscriminado destes agentes pela população. Como o Arroio Dilúvio recebe uma série de efluentes de origem doméstica e hospitalar, há uma constante introdução e acúmulo de antimicrobianos na água, o que potencializa a troca de material genético e a disseminação de microrganismos resistentes.

O consumo excessivo de antibióticos para fins terapêuticos e profiláticos na prática clínica, bem como na produção animal, é um dos principais fatores associados ao desenvolvimento de resistência bacteriana (ALANIS, 2005). A pressão seletiva gerada pela exposição a esses agentes aumenta a cada utilização e consequente depósito no ambiente. Diversos são os motivos que levam ao uso indiscriminado destes fármacos, desde a negligência por parte de profissionais da saúde no momento de prescrição de antibióticos sem necessidade até à devida instrução dos consumidores. A escassez de diagnósticos laboratoriais ou a não utilização destes quando disponíveis, são fatores que refletem os equívocos cometidos pelos profissionais da área clínica ao prescrever antibióticos desnecessários. Já a subdosagem e/ou suspensão do tratamento perante a melhora, refletem a carência de informação por parte dos pacientes e produtores (MOTA *et al.*, 2005).

Além disso, após o consumo, os antimicrobianos são expelidos para o sistema de esgoto e se dissipam rapidamente pelo ambiente, contaminando a água e o solo (BOXALL *et al.*, 2012). Estudos têm demonstrado uma alta prevalência de enterobactérias resistentes a β -lactâmicos em amostras ambientais, como solo, verduras e água de irrigação (HOLVOET *et al.*, 2013). Este é um dos grandes desafios atuais de saúde pública, pois uma vez que ocorre o depósito de antibióticos no meio, pode ocorrer uma re-exposição da população a esses compostos, juntamente com a captação de bactérias resistentes e genes de resistência.

Humanos e animais podem ser expostos a estes contaminantes direta ou indiretamente, através de diversas vias, como: 1) consumo de cultivos que tiveram contato com lama, esterco e chorume contaminados; 2) consumo de animais e vegetais que acumularam antimicrobianos através de tratamentos; 3) exposição a fármacos liberados em águas residuais intencionalmente (aquicultura) ou não; 4) resíduos de produtos farmacêuticos presentes em águas subterrâneas e superficiais que são utilizadas para consumo; e 5) contato com águas costeiras para fins recreativos ou pesca (WELLINGTON *et al.*, 2013). Estes fatores ilustram a importância de estudos que relacionam a resistência aos antimicrobianos em ambientes naturais, pois apesar da utilização destes fármacos advir das práticas clínicas e produções alimentícias, seus efeitos são perpetuados para muito além do local de origem.

Através da análise do perfil de resistência de enterobactérias isoladas das águas do Arroio Dilúvio, é possível verificar se estes processos estão ocorrendo em um dos cursos d'água fundamentais de Porto Alegre. Como o Arroio desemboca na principal fonte de abastecimento de água da cidade (OLIVEIRA e VAN DER SAND, 2011), pode estar havendo a re-exposição da população a esses contaminantes e organismos resistentes, o que implica em várias questões de saúde pública. Assim, ao alertar sobre os riscos da poluição aquática em ambientes urbanos, pesquisas como esta auxiliam os órgãos responsáveis pelo saneamento do município a obter os subsídios necessários para o desenvolvimento de estratégias de combate e é de extrema importância que se dê a devida prioridade a implementação de medidas de contenção.

3.3 Teste de sinergismo de disco duplo (TSDD)

A fim de verificar se a ocorrência de enterobactérias resistentes aos antimicrobianos β -lactâmicos estava relacionada com a produção de β -lactamases de espectro estendido (ESBL), foi realizado o teste de sinergismo de disco duplo, uma análise que constata fenotipicamente a produção destas enzimas. Ao todo, doze isolados foram analisados. Dentre eles, sete apresentaram resistência e nove foram intermediários a pelo menos um antimicrobiano na análise de perfil de susceptibilidade (Tabela 4).

Tabela 4: Perfil de resistência dos isolados submetidos ao TSDD.

Amostras	Antimicrobianos								
	AMC	AMP	CFL	CFO	CRO	CLO	TET	EST	GEN
E. coli ATCC 25922	S	S	S	S	S	S	S	S	S
2EC10	S	S	S	S	S	S	R	S	I
CA01	I	S	R	S	S	S	S	S	S
1EE06	S	S	S	R	I	S	S	S	S
1B516	R	S	R	S	R	S	S	R	S
2DE02	S	S	R	R	S	S	S	S	S
2EC04	R	R	R	S	R	S	S	R	S
1DE08	S	I	I	S	S	R	S	S	S
1AE01	S	S	I	S	S	S	S	S	S
1AE05	S	S	I	S	S	S	S	S	S
1AT10	S	S	I	S	I	S	S	S	S
1CE21	S	I	S	S	S	S	S	S	S
1CT21	S	I	I	S	S	S	S	S	S

S: Sensível; I: Intermediário; R: Resistente; AMC: Amoxicilina/Ác. Clavulânico; AMP: Ampicilina; CFL: Cefalotina; CFO: Cefoxitina; CRO: Ceftriaxona; CLO: Clorafenicol; TET: Tetraciclina; EST: Estreptomicina; GEN: Gentamicina.

Como resultado, quatro (33%) isolados foram positivos para produção de ESBL. Dentre eles, dois (17%) apresentavam resistência e um (8,3%) foi intermediário a cefalosporinas nos testes de susceptibilidade antimicrobiana. Além disso, o quarto (8,3%) isolado ESBL positivo era multirresistente, apresentando resistência a quatro antibióticos β -lactâmicos (amoxicilina/ác. clavulânico, ampicilina, cefalotina e ceftriaxona) e um aminoglicosídeo (estreptomicina) (Tabela 5).

Tabela 5: Produção de ESBL pelos isolados.

Amostra	Antimicrobianos			ESBL
	CAZ	CTX	CPM	
<i>E. coli</i> ATCC 25922	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
CA01	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
1EE06	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo
2EC04	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
1AT10	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
1B516	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
2EC10	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
2DE02	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
1DE08	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
1AE01	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
1AE05	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
1CE21	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
1CT21	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

CAZ: Cefazidima; CTX: Cefotaxima; CPM: Cefepima.

Através destes resultados, é possível constatar que a produção de ESBL está sendo utilizada por algumas enterobactérias para o desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos β -lactâmicos no Arroio Dilúvio. Este cenário também foi observado por Oliveira e Van der Sand (2016) em um estudo anterior, o qual constatou uma alta prevalência (85%) de enterobactérias ESBL positivas nas águas do Arroio através de testes fenotípicos.

Os testes como o TSDD têm sido utilizados como uma importante ferramenta na caracterização do perfil de resistência de Enterobacteriaceae. A realização destas análises secundárias, após a verificação do perfil de susceptibilidade a antimicrobianos, é altamente eficaz na identificação de bactérias produtoras de ESBL e possui uma grande aplicabilidade na prática clínica, uma vez que análises como PCR não são muito adequadas para testes de rotina (STURENBURG *et al.*, 2004; GARREC *et al.*, 2011). Apesar das avaliações genotípicas permitirem uma caracterização precisa dos mecanismos de resistência utilizados pelas bactérias, os métodos empregados ainda possuem um alto custo e necessita de uma boa estrutura para sua realização, o que acaba muitas vezes limitando alguns laboratórios de

análises clínicas (CORREA-MARTÍNEZ *et al.*, 2019). Neste cenário, os testes fenotípicos, como o TSDD, são considerados ótimas alternativas para a detecção de ESBLs.

No presente estudo, todos os isolados que obtiveram resultados positivos para a produção de β -lactamases de espectro estendido foram anteriormente identificados como *E. coli*, e dentre eles, um ainda foi considerado multirresistente a quatro antibióticos β -lactâmicos. Este dado é alarmante, pois a produção destas enzimas por *E. coli* é uma das maiores causas de infecções adquiridas em UTIs mundialmente, tais como cistite, colangite aguda, peritonite e pneumonia (RODRIGUEZ-BAÑO *et al.*, 2008). Uma vez que as ESBLs conferem resistência bacteriana às penicilinas, cefalosporinas e aztreonam (BHASKAR *et al.*, 2019), o aumento de infecções ocasionadas por patógenos produtores destas enzimas dificulta e inviabiliza a utilização dos antimicrobianos β -lactâmicos no tratamento de algumas doenças, deixando os profissionais da área clínica muitas vezes sem opção. Geralmente, as infecções causadas por bactérias produtoras de ESBLs são tratadas com antibióticos carbapenêmicos - como o imipenem e o meropenem -, agentes que também fazem parte da classe dos β -lactâmicos. Contudo, altas prevalências de enterobactérias resistentes a esses compostos já foram observadas e o aumento do consumo está sendo associado ao desenvolvimento de resistência por organismos que não fazem parte de *Enterobacteriaceae*, como *Acinetobacter* spp., *Stenotrophomonas maltophilia* e *Pseudomonas* spp. (RUPP e FEY, 2003).

A presença de enterobactérias produtoras de ESBL no Arroio Dilúvio representa um grave risco para a população. Este cenário reforça a ideia do ambiente aquático desempenhar um importante papel no desenvolvimento e disseminação de organismos resistentes. Uma vez que os microrganismos produtores destas enzimas estão associados a diversas infecções hospitalares, é possível que eles sejam constantemente depositados no corpo d'água através dos efluentes advindos de hospitais e domicílios. Ainda, ao entrarem em contato com a água, estes patógenos interagem com as demais comunidades microbianas, favorecendo a transferência e o compartilhamento de conteúdo genético em resposta ao ambiente poluído. Esta é mais uma consequência das altas taxas de contaminação do Arroio Dilúvio, o que reflete a urgência de se discutir questões relacionadas ao saneamento básico de Porto Alegre.

3.4 Detecção de genes de resistência aos antimicrobianos da classe dos β -lactâmicos

De acordo com os resultados obtidos na caracterização do perfil de susceptibilidade antimicrobiana e no teste de sinergismo de disco duplo, os isolados apresentaram resistência

predominantemente aos antibióticos da classe dos β -lactâmicos e ainda foi constatada a produção de enzimas β -lactamases de espectro estendido por alguns microrganismos. Assim, com o intuito de verificar a presença dos genes codificantes de ESBL *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM} e *bla*_{SHV} nos isolados, foi realizada a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) para identificação dos mesmos. Todos os isolados do presente estudo foram submetidos a essa análise, pois apesar de não apresentarem resistência nos testes fenotípicos, é possível que contenham os genes codificantes de ESBL e não os expressem.

Como resultado, foi detectada a presença do gene *bla*_{TEM} em 20% (8/40) dos isolados analisados (Figura 1).

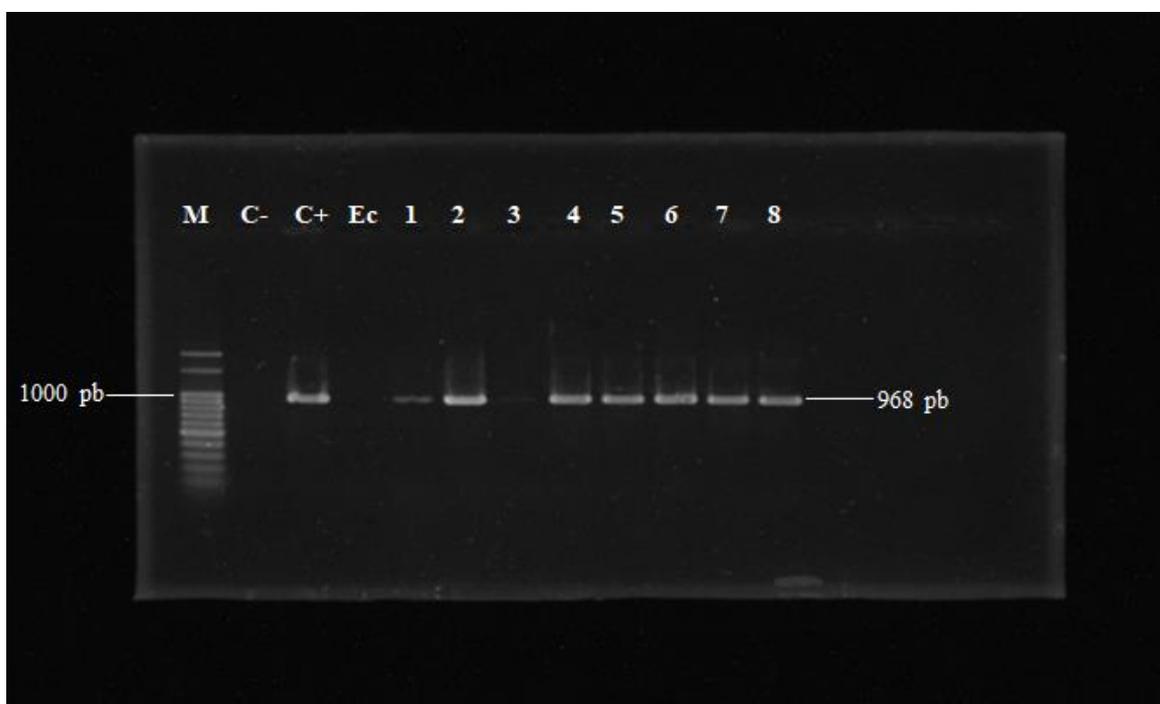


Figura 1: Fotografia do gel de agarose 1,2%, com os fragmentos obtidos na PCR para o gene *bla*_{TEM}. M: Marcador molecular Ladder 100pb; C-: Controle negativo; C+: Controle positivo; Ec: *E. coli* ATCC 25922; Canaletas 1-8: Isolados do Arroio positivos para o gene *bla*_{TEM}. Em sequência: 1BC01, 2EC04, 1D502, 1EC10, 2EC10, 2BE03, 1CE01 e 1CT21.

Dentre os microrganismos que apresentaram o gene *bla*_{TEM}, um (2,5%) havia sido considerado multirresistente e produtor de ESBL nos testes fenotípicos. Além disso, 2,5% (1/40) dos isolados apresentaram quadros de resistência intermediária a β -lactâmicos, enquanto outros 2,5% (1/40) foram resistentes à tetraciclina e intermediários a gentamicina. Por fim, 12,5% (5/40) dos isolados foram sensíveis a todos os antimicrobianos testados, o que indica que eles apenas possuem o gene, mas não o estão expressando (Tabela 6).

Tabela 6: Características fenotípicas dos isolados identificados com o gene *bla*_{TEM}.

Amostra	Susceptibilidade antimicrobiana		ESBL
	Resistente	Intermediário	
1BC01	-	-	Negativo
1D502	-	-	Negativo
1EC10	-	-	Negativo
2BE03	-	-	Negativo
1CE01	-	-	Negativo
1CT21	-	AMP; CFL	Negativo
2EC10	TET	GEN	Negativo
2EC04	AMC; AMP; CFL; CTX; EST	-	Positivo

AMP: Ampicilina; CFL: Cefalotina; TET: Tetraciclina; GEN: Gentamicina; CTX: Ceftriaxona; AMC: Amoxicilina/Ác. clavulânico; EST: Estreptomicina.

No presente estudo, os genes *bla*_{SHV} e *bla*_{CTX-M} não foram detectados em nenhum dos isolados analisados, ocorrendo uma prevalência do gene *bla*_{TEM}. Um cenário semelhante foi observado por Oliveira e Van der Sand (2011) em um estudo anterior, o qual identificou a presença do *bla*_{TEM} em 33,87% e do *bla*_{SHV} em 9,67% dos isolados Gram-negativos provenientes das águas do Arroio Dilúvio.

Além disso, foi detectada a presença de isolados resistentes aos antibióticos β -lactâmicos, mas que não continham os genes de resistência. Essas diferenças entre as análises fenotípicas e genotípicas podem estar relacionadas com fatores como mutações, alterações na permeabilidade da membrana e regulação da expressão do gene (ANDRADE *et al.*, 2014). Ou seja, nestes casos, a resistência pode estar sendo conferida pela produção de β -lactamases diferentes das analisadas neste estudo ou por conta de outras estratégias de resistência. Já em relação aos isolados que possuíam os genes, mas que não foram resistentes nos testes de susceptibilidade, a ideia de as comunidades microbianas do meio aquático atuarem como reservatórios ambientais para esses componentes é reforçada, tudo isso como resultado das trocas genéticas realizadas neste ambiente.

Os crescentes relatos de enterobactérias produtoras de ESBL no Brasil ilustram o enorme risco que estes organismos representam para a sociedade, tanto em questões de saúde

pública, quanto ambientais. Ferreira *et al.* (2019) avaliaram amostras de *K. pneumoniae* produtoras de ESBL isoladas de pacientes hospitalizados em uma unidade de terapia intensiva no Tocantins e constataram o predomínio do gene *bla*_{TEM} em 100% (25/25) dos microrganismos analisados. Já Chagas *et al.* (2011) identificaram a presença deste gene em 82% (82/100) dos isolados provenientes de esgoto hospitalar no Rio de Janeiro. Em um estudo realizado com amostras clínicas provenientes de dois hospitais de Porto Alegre, Jaskulski *et al.* (2013) relataram uma maior prevalência para o gene *bla*_{TEM}, seguido de *bla*_{CTX-M}, em enterobactérias produtoras de ESBL.

Existem diversas variações das β -lactamases do tipo TEM. A enzima TEM-1 é responsável por conferir resistência à ampicilina, penicilina e cefalosporinas de primeira geração. Ao longo do tempo, com o aumento da pressão seletiva antibacteriana, o acúmulo de mutações dentro do gene *bla*_{TEM-1} permitiram o surgimento de variantes desta enzima com capacidades hidrolíticas mais eficientes, o que estendeu seus efeitos às cefalosporinas de espectro estendido e o aztreonam - aí o nome ESBL (RUPP e FEY., 2003). Essas enzimas diferem em relação aos substratos utilizados, composição de aminoácidos e susceptibilidade a compostos inibidores (PATERSON e BONOMO, 2005).

Além disso, os genes codificantes de ESBL, como o *bla*_{TEM}, localizam-se em elementos genéticos móveis, o que facilita sua disseminação. Esses genes podem ser adquiridos por meio de transferência horizontal, em processos de conjugação (plasmídeos e transposons conjugativos), transformação (aquisição do DNA livre no ambiente) e tradução (bacteriófagos) (MARTI *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2015). A presença dos genes de resistência nos microrganismos não é essencial, mas pode conferir vantagens adaptativas (VERRAES *et al.*, 2013). Através de análises moleculares que visam caracterizar o perfil de resistência de microrganismos patogênicos, é possível compreender cada vez mais os mecanismos envolvidos na aquisição, manutenção e disseminação de resistência bacteriana. Tudo isso não somente em locais que colocam a saúde da população em risco, mas que também são prejudiciais para o meio ambiente.

3.5 Análise de dendrograma pelo MALDI-TOF MS

A partir dos espectros gerados pela expressão das proteínas dos isolados, o MALDI-TOF MS realizou uma análise de similaridade entre as amostras, avaliando-as individualmente. Este método também pode ser denominado “filoproteômica” (CONWAY *et al.*, 2001). Como resultado, foi formado um dendrograma para representação gráfica dos

agrupamentos e ordenação hierárquica ascendente de todos os isolados analisados, de forma que permaneceram próximas as amostras que obtiveram semelhanças na expressão fenotípica de suas proteínas (Figura 2). Neste dendrograma, é possível visualizar uma clara separação entre os ramos de *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*, justamente por se tratarem de espécies diferentes, que possuem expressões fenotípicas características de seu grupo.

Além disso, ao analisar somente o ramo pertencente a *E. coli* (Figura 3), observa-se certos agrupamentos dentro desta espécie entre isolados que possuem fenótipos semelhantes.

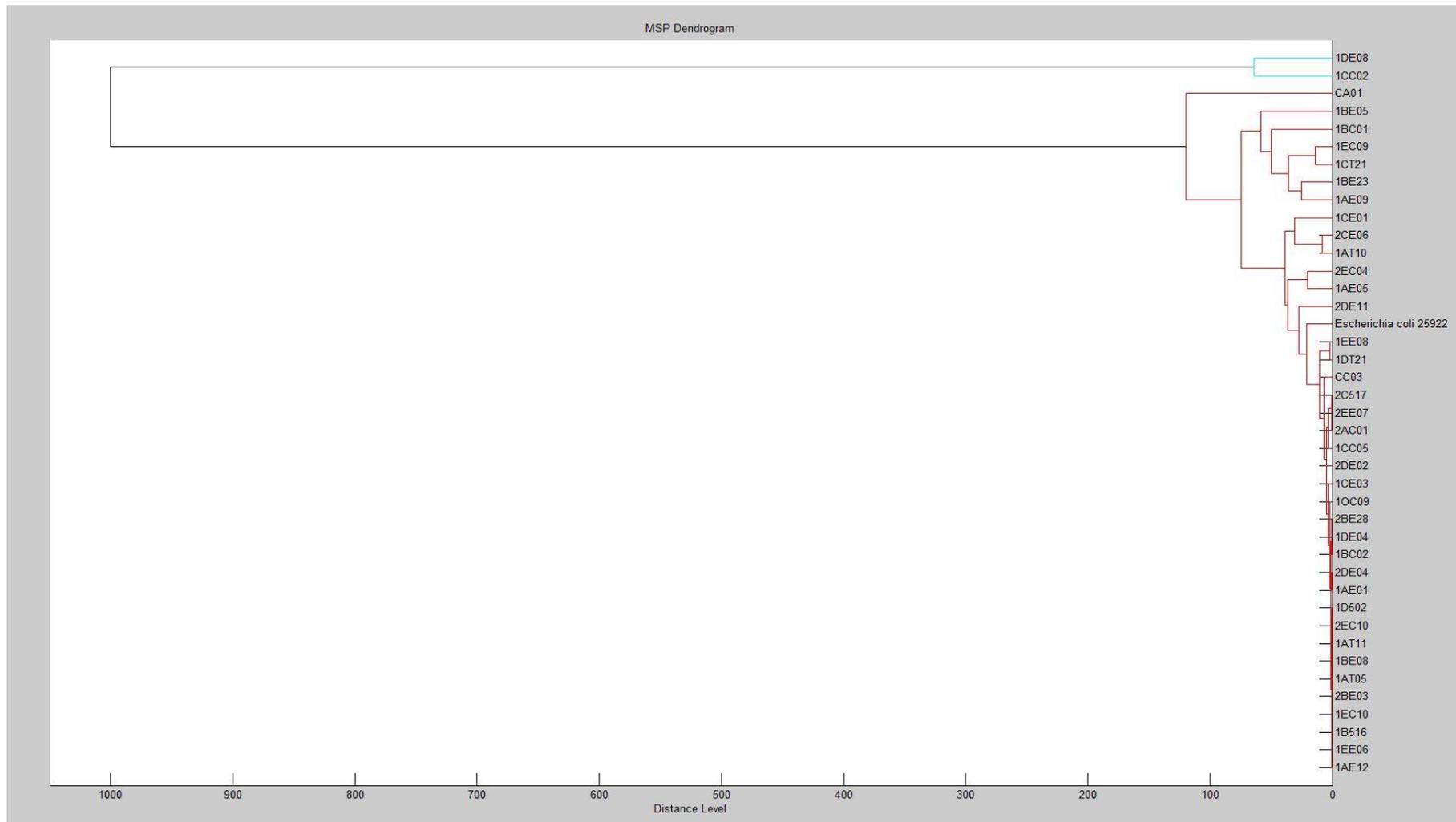


Figura 2: Dendrograma resultante da análise da expressão das proteínas de todos os isolados, o qual evidencia a separação entre espécies. As duas primeiras amostras no canto superior direito foram identificadas como *Klebsiella pneumoniae* e as demais, como *Escherichia coli*.

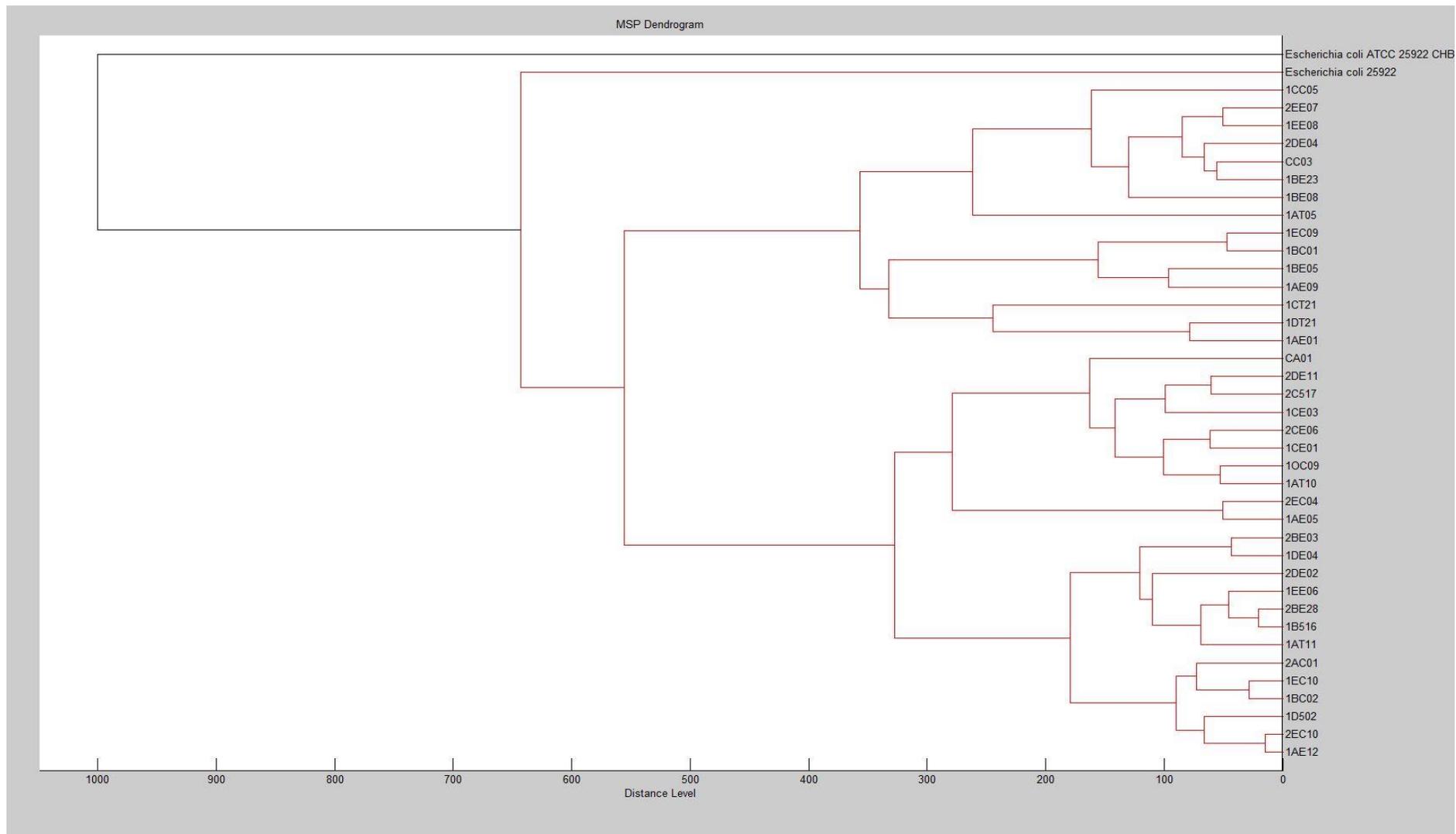


Figura 3: Parte do dendrograma na qual foram agrupados todos os isolados de *Escherichia coli*, ilustrando as aproximações entre eles de acordo com sua expressão proteica.

Na figura 2, é possível observar que a cepa padrão utilizada neste estudo – *E. coli* ATCC 25922 – permaneceu próxima à cepa ATCC utilizada pelo equipamento como referência. Já as amostras 2DE02, 1EE06 e 1B516, as quais apresentaram resistência às cefalosporinas, foram agrupadas com a amostra 2BE03, a qual continha o gene *bla*_{TEM}.

Houve proximidade também entre as amostras 1CT21 e 1AE01, que foram intermediárias para o antibiótico cefalotina, além de uma ser ESBL positiva e a outra possuir o gene *bla*_{TEM}. Outro agrupamento observado foi entre o isolado 1AE05, intermediário às cefalosporinas, com o isolado multirresistente 2EC04, que foi ESBL positivo, resistente a três classes de antimicrobianos e que continha o gene *bla*_{TEM}. Por fim, constatou-se uma proximidade entre os isolados 1EC10, 1D502 e 2EC10, sendo todos portadores do gene *bla*_{TEM}.

Os resultados desta análise sugerem que bactérias resistentes, produtoras de ESBL ou portadoras de genes de resistência podem apresentar similaridades na expressão de suas proteínas, indicando quais isolados podem ser correlacionados ou não. Diversos autores têm recomendado este tipo de abordagem para auxiliar na detecção de Enterobacteriaceae resistentes na rotina clínica, uma vez que as análises moleculares dispõem de mais tempo e possuem um alto custo (EGLI *et al.*, 2015). Seng *et al.* (2010) relataram que este método é capaz de distinguir *E. coli* resistentes à ampicilina de cepas de *E. coli* selvagens, além de *K. pneumoniae* produtoras de ESBL com uma especificidade de 92% se comparada a análises moleculares.

No presente estudo, é possível observar que os isolados com perfis de resistência semelhantes foram agrupados ou aproximados, o que sugere que os efeitos dos componentes determinantes de resistência podem ser detectados em nível de expressão proteica. Além disso, através destas observações, pode-se avaliar o potencial de um isolado para a aquisição de resistência, comparando sua similaridade a dos organismos que já foram determinados como resistentes. Este tipo de análise é mais uma das perspectivas que se pode ter sobre o perfil de resistência das bactérias, que auxilia a encontrar pontos comuns entre os microrganismos analisados, dando um panorama geral das amostras.

3.6 Análise de PCA pelo MALDI-TOF MS

Outra investigação realizada pelo MALDI TOF MS, a partir dos espectros gerados pela expressão de proteínas dos isolados, foi a análise de componentes principais (PCA). Esta abordagem avalia conjuntos de variáveis detectadas pelo equipamento, na expressão proteica

dos isolados, que possivelmente podem estar relacionadas. Como resultado, foi formado um gráfico tridimensional, o qual ilustra os grupos formados de acordo com o grau de similaridade das amostras (Figura 4).

Diferente da análise de dendrograma, a PCA avalia as amostras em conjunto, a fim de detectar grupos pré-definidos. Na figura 4, há uma separação entre as espécies. É possível observar no canto superior do gráfico dois pontos amarelos, os quais representam os isolados de *K. pneumoniae*. Já na parte inferior do gráfico, encontram-se todos os isolados de *E. coli*.

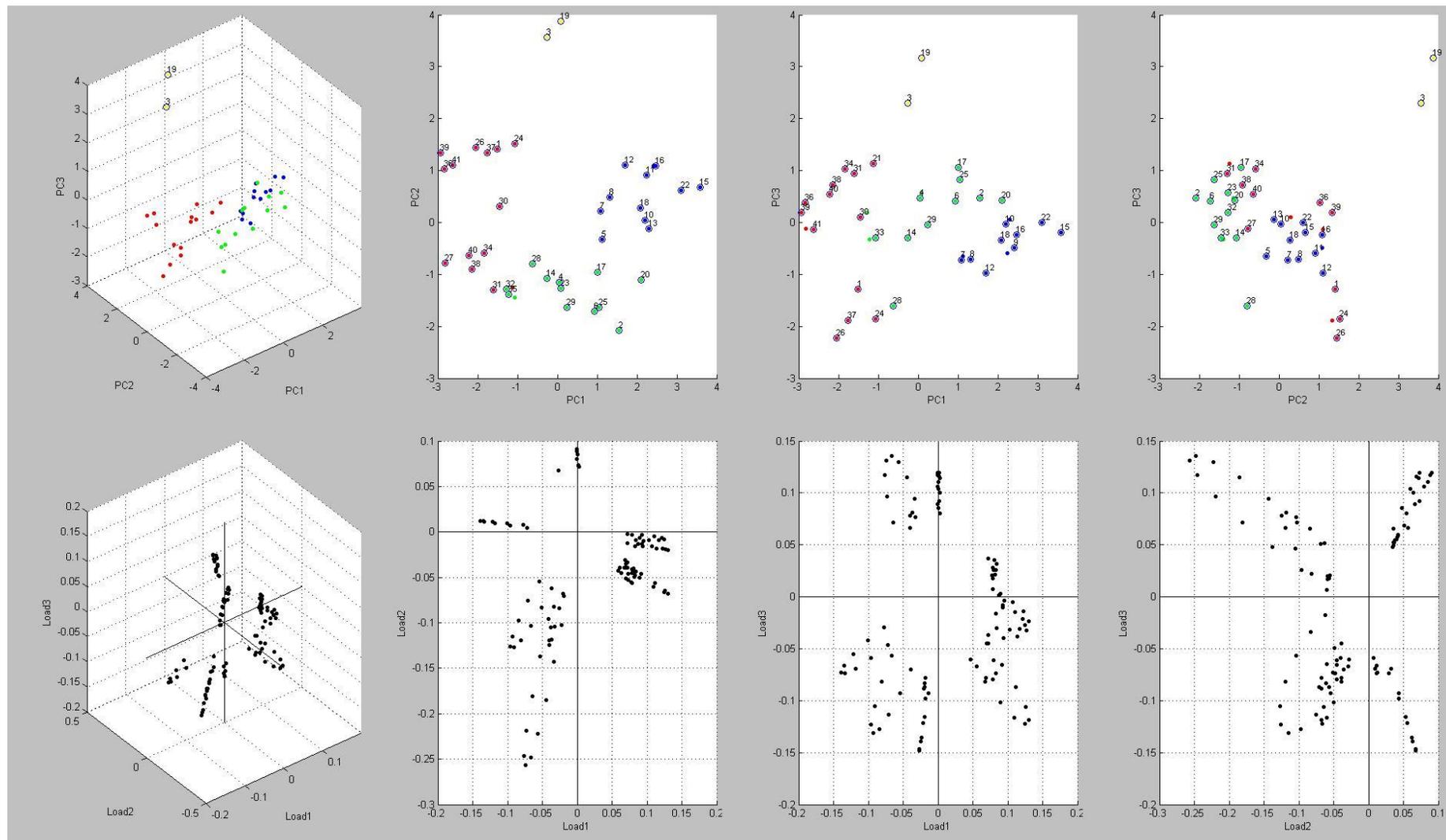


Figura 4: Gráfico resultante da análise de PCA, o qual separa as duas espécies analisadas e indica a formação de três grupos distintos dentro de *Escherichia coli*.

Outro dado interessante gerado pelo MALDI foi que dentro de *E. coli* há a formação de três grupos distintos, os quais são indicados pelos pontos vermelhos, verdes e azuis. Assim, a fim de analisar os possíveis aspectos em comum destas amostras e seus respectivos grupos, os isolados foram comparados quanto à resistência, produção de ESBL e presença do gene *bla*_{TEM}.

Como resultado, não houve relação entre os grupos de *E. coli* e a produção de ESBL, tampouco com a presença do gene de resistência. Já quanto ao teste de susceptibilidade, cinco (12%) isolados resistentes ou intermediários a penicilinas e cefalosporinas – incluindo uma cepa multirresistente – pertenciam ao grupo vermelho. Contudo, apesar deste padrão ser detectado, não necessariamente a formação destes grupos está relacionada ao perfil de resistência dos isolados, podendo ser vinculada a fatores de virulência ou até mesmo ao tipo de *E. coli* quanto à sua origem.

Assim, buscou-se comparar os aspectos relacionados ao perfil de resistência dos isolados, de modo a avaliar se estes grupos estão correlacionados quanto a suas expressões proteicas. Não foi detectado um padrão específico entre os grupos pelos aspectos que foram avaliados, porém, mais análises são necessárias, como por exemplo, a avaliação da origem destas *E. coli*, as quais poderiam conceber informações valiosas quanto ao perfil de resistência dos isolados de enterobactérias oriundas do Arroio Dilúvio.

4. CONCLUSÃO

A resistência antibacteriana é um problema de âmbito global e seus efeitos são observados nos mais diversos ecossistemas. Neste cenário, os ambientes aquáticos podem atuar como importantes meios pelos quais o desenvolvimento, a manutenção e a disseminação de organismos resistentes são facilitados. Estes processos se acentuam devido à alta pressão seletiva nos ambientes, ocasionada pela constante introdução e acúmulo de agentes contaminantes na água.

No presente estudo, buscou-se caracterizar o perfil de resistência de enterobactérias isoladas de um dos corpos d'água mais poluídos de Porto Alegre: O Arroio Dilúvio. Através de análises de identificação, constatou-se a prevalência da espécie *Escherichia coli* nas amostras provenientes do Arroio. Além disso, foi possível observar os efeitos do amplo consumo de antimicrobianos pela população através das análises de susceptibilidade antimicrobiana, as quais revelaram um alto índice de resistência aos antibióticos β -lactâmicos, como a cefalotina, amoxicilina/ác. clavulânico, cefoxitina, ceftriaxona e estreptomicina. Os organismos foram mais suscetíveis a antibióticos como a ciprofloxacina, nitrofurantoína, norfloxacina, sulfazotrim e o imipenem.

A produção de β -lactamases de espectro estendido (ESBL) foi uma das estratégias empregadas pelas bactérias na aquisição de resistência aos β -lactâmicos. Além disso, as análises genotípicas revelaram o predomínio do gene *bla*_{TEM} nos isolados. Em nível de expressão proteica, também foram observadas semelhantes entre os organismos resistentes.

Neste estudo, é possível observar os efeitos da poluição sobre as comunidades microbianas do Arroio Dilúvio. A presença de enterobactérias resistentes, produtoras de ESBL e portadoras de genes de resistência reforça a ideia de o ambiente aquático poder atuar como um meio que possibilita a dinâmica dos organismos. Os resíduos hospitalares e domésticos, além da grande quantidade de lixo constantemente depositados no Arroio, podem afetar diretamente nos processos de aquisição de resistência, ocasionando desequilíbrios na microbiota e contribuindo com o compartilhamento de material genético entre os microrganismos.

Os resultados ilustram a urgência na detecção de bactérias resistentes, uma vez que o uso indiscriminado de antibióticos, bem como o depósito de agentes antimicrobianos no Arroio Dilúvio, podem aumentar a prevalência e disseminação destes organismos. A avaliação dos efeitos das águas residuais na contaminação ambiental é, portanto, fundamental

para auxiliar os órgãos responsáveis pelo saneamento básico de Porto Alegre na implementação de políticas públicas eficazes.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALANIS, Alfonso J. 2005. Resistance to antibiotics: Are we in the post-antibiotic era? *Archives of Medical Research*, 36: 697-705.
- ALLEN, Heather K., DONATO, Justin, WANG, Helena Huimi, CLOUD-HANSEN, Karen A., DAVIES, Julian & HANDELSMAN, Jo. Call of the wild: Antibiotic resistance genes in natural environments. 2010. *Nature Reviews*, 8: 251-259.
- ANDRADE, Leonardo N., VITALI, Lúcia, GASPAR, Gilberto G., BELLISSIMO-RODRIGUES, Fernando, MARTINEZ, Roberto & DARINI, Ana Lúcia C. 2014. Expansion and evolution of a virulent, extensively drug-resistant (polymyxin B-resistant), QnrS1-, CTX-M-2, and KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST11 international high-risk clone. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(7): 2530-2535.
- BAKER, Stephen. 2015. A return to the pre-antimicrobial era? *Science*, 347: 1064–1066.
- BAQUERO, Fernando, MARTÍNEZ, José-Luis & CANTÓN, Rafael. 2008. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Current opinion in biotechnology*, 19(3): 260-265.
- BELACHEW, Teshome, MIHRET, Amete, LEGESSE, Tesfaye, MILLION, Yihenew & DESTA, Kassu. 2018. High level of drug resistance by gram-negative bacteria from selected sewage polluted urban rivers in Addis Ababa, Ethiopia. *BMC Research Notes*, 11(524).
- BERENDONK, Thomas, MANAIA, Célia, MERLIN, Christophe, FATTA-KASSINOS, Despo, CYTRYN, Despo & WALSH, Fiona. 2015. Tackling antibiotic resistance: the environmental framework. *Nature reviews*, 13: 310-317.
- BHASKAR, Beena H., MULKI, Shalini S., JOSHI, Sangeetha, ADHIKARY, Ranjeeta & VENKATESH, Bhavana M. 2019. Molecular characterization of extended-spectrum β -lactamase and carbapenemase producing *Klebsiella pneumoniae* from a tertiary care hospital. *Indian Journal of Critical Care Medicine*, 23(2): 61-66.
- BOXALL, Alistair B. A., RUDD, Murray A., BROOKS, Bryan W., CALDWELL, Daniel J., CHOI, Kyungho, HICKMANN, Silke & INNES, Elizabeth. 2012. Pharmaceuticals and

personal care products in the environment: What are the big questions? *Environmental Health Perspectives*, 120(9): 1221-1229.

BROLUND, Alma. Overview of ESBL-producing Enterobacteriaceae from a Nordic perspective. 2014. *Infection Ecology & Epidemiology*, 4(1).

CHAGAS, T. P. G., SEKI, L. M., CURY, J. C., OLIVEIRA, J. A. L., DÁVILA, A. M. R., SILVA, D. M. & ASENSI, M. D. 2011. Multiresistance beta-lactamase-encoding genes and bacterial diversity in hospital wastewater in Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Applied Microbiology*, 111: 572-581.

CLSI. Performance of standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standards 2017. 27 ed. *CLSI guideline M100*.

CLSI. Methods for the Identification of Cultured Microorganisms Using Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. 2017. 1st ed. *CLSI guideline M58*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

CONTE, Danieli, PALMEIRO, Jussara, NOGUEIRA, Keite, LIMA, Thiago, CARDOSO, Marco, PONTAROLO, Roberto, PONTES, Flávia & DALLA-COSTA, Libera. 2017. Characterization of CTX-M enzymes, quinolone resistance determinants, and antimicrobial residues from hospital sewage, wastewater treatment plant and river water. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 136: 62-69.

CONWAY, Gregory, SMOLE, Sandra, SARRACINO, David, ARBEIT, Robert & LEOPOLD, Peter. 2001. Phyloproteomics: species identification of Enterobacteriaceae using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 3(1): 103-112.

CORREA-MARTÍNEZ, Carlos L., IDELEVICH, Evgeny A., SPARBIER, Katrin, KOSTRZEWA, Markus & BECKER, Karsten. 2019. Rapid detection of extended-spectrum β -lactamases (ESBL) and AmpC β -lactamases in Enterobacterales: Development of a screening panel using the MALDI-TOF MS-based direct-on-target microdroplet growth assay. *Frontiers in Microbiology*, 10(13).

DALLENNE, Caroline. 2010. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important β -lactamases in Enterobacteriaceae. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(3): 490-495.

DALTONICS, Bruker. 2015. MALDI BioTyper 4.0 User Manual. *Bruker Daltonics*, Bremen, Germany.

DATTA, Naomi & KONTOMICHALOU, Polyxeni. 1965. Penicillinase synthesis controlled by infectious *R* factors in Enterobacteriaceae. *Nature*, 208(5007): 239-241.

DODDS, David R. 2016. Antibiotic Resistance; a Current Epilogue. *Biochemical Pharmacology*, 134: 139-146.

DOI, Yohei, IOVLEVA, Alina & BONOMO, Robert A. 2017. The ecology of extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) in the developed world. *Journal of Travel Medicine*, 24(1): 44-51.

DROPA, Milena. 2009. Extended-spectrum beta-lactamases among Enterobacteriaceae isolated in a public hospital in Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 51(4): 203-209.

EGLI, Adrian, TSCHUDIN-SUTTER, Sarah, OBERLE, Michael, GOLDENBERGER, Daniel, FREI, Reno & WIDMER, Andreas F. 2015. Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass-espectrometry (MALDI-TOF MS) based typing of extended-spectrum β -lactamase producing *E. coli* – a novel tool for real-time outbreak investigation. *PLoS ONE*, 10(4).

FERREIRA, Roumayne L., DA SILVA, Brenda C. M., REZENDE, Graziela S., NAKAMURA-SILVA, Rafael, PITONDO-SILVA, André, CAMPANINI, Emeline Boni, BRITO, Márcia C. A., DA SILVA, Eulália M. L., FREIRE, Caio C. M., CUNHA, Anderson F. & PRANCHEVICIUS, Maria-Cristina S. 2019. High Prevalence of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* harboring several virulence and β -lactamase encoding genes in a Brazilian intensive care unit. *Frontiers in Microbiology*, 9:3198.

FREITAS, Dhara Y., ARAÚJO, Susana, FOLADOR, Adriana R. C., RAMOS, Rommel T. J., AZEVEDO, Juliana S. N., TACÃO, Marta, SILVA, Artur, HENRIQUES, Isabel & BARAÚNA, Rafael A. 2019. Extended spectrum beta-lactamase-producing gram-negative

bacteria recovered from an amazonian lake near the city of Belém, Brazil. *Frontiers in Microbiology*, 10:364.

GARREC, Hélène, DRIEUX-ROUZET, Laurence, GOLMARD, Jean-Louis, JARLIER, Vincent & ROBERT, Jérôme. 2011. Comparison of nine phenotypic methods for detection of extended-spectrum β -lactamase production by Enterobacteriaceae. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(3): 1048-1057.

GREEN, Michael R. & SAMBROOK, Joseph. 2012. Molecular cloning: A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*. 4^a ed.

GREENHOUSE, Inbal, BABUSHKIN, Frida, FINN, Talya, SHIMONI, Zvi, ALIMAN, Moran, BEN-AMI, Ronen & COHEN, Regev. 2017. Long term outcomes of inappropriate antibiotic therapy for upper urinary tract infections caused by extended-spectrum beta-lactamase producing Enterobacteriaceae: a retrospective cohort study. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 89(3): 222-229.

HERTZ Frederik B, SCHSØNNING, Kristian, RASMUSSEN, Steen C, LITTAUER, Pia, KNUDSEN, Jenny D, LØBNER-OLESEN, Anders & FRIMODT-MØLLER, Niels. 2015. Epidemiological factors associated with ESBL- and non ESBL-producing *E. coli* causing urinary tract infection in general practice. *Infectious Diseases*, 48(3): 241-245.

HILTUNEN, Teppo, VIRTALA, Marko & LAINE, Anna-Liisa. 2016. Antibiotic resistance in the wild: an eco-evolutionary perspective. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 372(1712).

HOLMES, Alison H., MOORE, Luke S. P., SUNDSFJORD, Arnfinn, STEINBAKK, Martin, REGMI, Sadie, KARKEY, Abhilasha, GUERIN, Philippe J. & PIDDOCK, Laura J. V. 2016. Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. *Lancet*, 387: 176-187.

HOLVOET, Kevin, SAMPERS, Imca, CALLENS, Benedicte, DEWULF, Joroen & UYTENDAELE, Mieke. 2013. Moderate prevalence of antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolates from lettuce, irrigation water and soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(21): 6677-6683.

- JANG, J., HUR, H., SADOWSKY, M. J., BYAPPANAHALLI, M. N., YAN, T. & ISHII, S. 2017. Environmental *Escherichia coli*: Ecology and public health implications - A review. *Journal of Applied Microbiology*, 123(3): 570-581.
- JASKULSKI, M. R., MEDEIROS, B. C., BORGES, J. V., ZALEWSKY, R., FONSECA, M. E. C., MARINOWIC, D. R., ROCHA, M. P., NODARI, P. & MACHADO, D. C. 2013. Assessment of extended-spectrum β -lactamase, KPC carbapenemase and porin resistance mechanisms in clinical samples of *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter* spp. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 42(1): 76-79.
- LENTZ, Silvia M., MARTINS, Andreza F. & MOTTA, Amanda S. 2017. Prevalência de genes de resistência em isolados de *E. coli* provenientes de frangos de corte.
- LOOFT, Torey, JOHNSON, Timothy A., ALLEN, Heather K., BAYLES, Darrell O., ALT, David P., STEDTFELD, Robert D., JUN SUL, Woo, STEDTFELD, Tiffany M., CHAI, Benli, COLE, James R., HASHSHAM, Syed A., TIEDJE, James M. & STANTON, Thad B. 2012. In-feed antibiotics effects on the swine intestinal microbiome. *PNAS*, 109(5): 1691-1696.
- MAGIORAKOS, A., SRINIVASAN, A., CAREY, R. B., CARMELI, Y., FALAGAS, M. E., GISKE, C. G., HARBARATH, S., HINDLER, J. F., KAHLMETER, G., OLSSON-LILJEQUIST, B., PATERSON, D. L., RICEL, L. B., STELLING, J., STRUELENS, M. J., VATOPOULOS, WEBER, J. T. & MONNET, D. L. 2011. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(3): 268-281.
- MARTI, Elisabet, VARIATZA, Eleni & BALCAZAR, Jose Luis. 2014. The role of aquatic ecosystems as reservoirs of antibiotic resistance. *Trends in microbiology*, 22(1): 36-41.
- MARTINEZ, Jose Luis. 2009. Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environmental pollution*, 157:(11): 2893-2902.
- MOOSAVIAN, Mojtaba & AHMADKHOSRAVY, Nazanin. 2016. Survey of CTX-M Gene Frequency in Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae Isolates Using the Combination Disk and PCR Methods in Ahvaz, Iran. *Jundishapur J Microbiol*, 9(11).

MOTA, Rinaldo A., SILVA, Karla P. C., FREITAS, Manuela F. L., PORTO, Wagner J. N. & SILVA, Leonildo B. G. 2005. The abuse of antimicrobials drugs and the appearance of resistance. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 42(6): 465-470.

NAKAI, Hazuki, HAGIHARA, Mao, KATO, Hideo, HIRAI, Jun, NISHIYAMA, Naoya, KOIZUMI, Yusuke, SAKANASHI, Daisuke, HIROYUKI, Suematsu, YUKA, Yamagishi & MIKAMO, Hiroshige. 2016. Prevalence and risk factors of infections caused by extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing Enterobacteriaceae. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 22(5): 319-326.

NOVO, Ana, ANDRÉ, Sandra, VIANA, Paula, NUNES, Olga & MANAIA, Célia. 2013. Antibiotic resistance, antimicrobial residues and bacterial community composition in urban wastewater. *Water research*, 47(5): 1875-1887.

OLIVEIRA, Daniele V. & VAN DER SAND, Sueli T. 2011. Avaliação do perfil de resistência a antimicrobianos de bactérias gram-negativas isoladas nas águas do Arroio Dilúvio.

OLIVEIRA, Daniele V. & VAN DER SAND, Sueli T. 2016. Phenotypic tests for the detection of β -lactamases-producing Enterobacteriaceae isolated from different environments. *Current Microbiology*, 73(1): 132-138.

ONU, United Nations. 2019. United Nations Environment Assembly of the United Nations Environment Programme.

PATERSON, David L. & BONOMO, Robert A. 2005. Extended-Spectrum β -lactamases: A Clinical Update. *Clinical Microbiology Reviews - American Society for Microbiology*, 18(4): 657-686.

PREFEITURA MUNICIPAL DE PORTO ALEGRE. O Arroio Dilúvio. Disponível em: <http://www2.portoalegre.rs.gov.br/dep/default.php?p_secao=71> . Acesso em: 18 de junho de 2018.

PRADO, T., PEREIRA, W. C., SILVA, D. M., SEKI, L. M., CARVALHO, A. P. D' A. & ASENSI, M. D. 2008. Detection of extended-spectrum- β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in effluents and sludge of a hospital sewage treatment plant. *Letters in Applied Microbiology*, 46: 136-141.

RAWAT, Deepti & NAIR, Deepti. 2010. Extended-spectrum β -lactamases in Gram Negative Bacteria. *Journal of Global Infectious Diseases*, 2(3): 263-274.

RODRÍGUEZ-BAÑO, Jesús, ALCALÁ, Juan C., CISNEROS, Jose M., GRILL, Fabio, OLIVER, Antonio, HORCAJADA, Juan P., TÓRTOLA, Teresa, MIRELIS, Beatriz, NAVARRO, Gemma, CUENCA, María, ESTEVE, María, PEÑA, Carmen, Llanos, Ana C., CANTÓN, Rafael & PASCUAL, Álvaro. 2008. Community infections caused by extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli*. *Archives of Internal Medicine*, 168(17): 1897-1902.

RUPP, Mark E. & FEY, Paul D. 2003. Extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing Enterobacteriaceae: Considerations for diagnosis, prevention and drug treatment. *Drugs*, 63(4): 353-365.

SAMA, Tomoo & YAMAGUCHI, Keizo. 2009. History of antimicrobial agents and resistant bacteria. *JMAJ*, 52(2): 103-108.

SENG, Piseth, ROLAIN, Jean-Marc, FOURNIER, Pierre, LA SCOLA, Bernard, DRANCOURT, Michel & RAOULT, Didier. 2010. MALDI-TOF-mass spectrometry applications in clinical microbiology. *Future Microbiology*, 5(11): 1733-1754.

SHAO, Changli, TIAN, Yaping, DONG, Zhennan, GAO, Jing, GAO, Yanhong, JIA, Xingwang, GUO, Guanghong, WEN, Xinyu, JIANG, Chaoguang & ZHANG, Xueji. 2012. The use of principal component analysis in MALDI-TOF MS: a powerful tool for establishing a mini-optimized proteomic profile. *American Journal of Biomedical Sciences*, 4(1): 85-101.

STÜRENBURG, Enno, SOBOTTKA, Ingo, NOOR, Djanesh, LAUFS, Rainer & MACK, Dietrich. 2004. Evaluation of a new cefepime-clavulanate ESBL Etest to detect extended-spectrum β -lactamases in an Enterobacteriaceae strain collection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 54(1): 134-138.

SUÁREZ, Cristina & GUDIOL, Francesc. 2009. Beta-lactam antibiotics. *Infectious Diseases and Clinical Microbiology*, 27: 116-129.

TACÃO, Marta, MOURA, Alexandra, CORREIA, António & HENRIQUES, Isabel. 2014. Co-resistance to different classes of antibiotics among ESBL-producers from aquatic systems. *Water research*, 48: 100-107.

TORTORA, Gerard J., FUNKE, Berdell R., CASE, Christine L. 2017. *Microbiologia. Artmed*, 12^a ed., Porto Alegre.

VERRAES, Claire, VAN BOXSTAEL, Sigrid, VAN MEERVENNE, Eva, VAN COILLIE, Els, BUTAYE, Patrick, CATRY, Boudewijn, SCHAETZEN, Marie, VAN HUFFEL, Xavier, IMBERECHTS, Hein, DIERICK, Katelijne, DAUBE, Georges, SAEGERMAN, Claude, DE BLOCK, Jan, DEWULF, Jeroen & HERMAN, Lieve. 2013. Antimicrobial resistance in the food chain: a review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10: 2643-2669.

WANG, Juan, STEPHAN, Roger, ZURFLUH, Katrin, HÄCHLER, Herbert & FANNING, Séamus. 2015. Characterization of the genetic environment of *blaesbl* genes, integrons and toxin-antitoxin systems identified on large transferrable plasmids in multi-drug resistant *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology*, 5(716).

WANJUGI, P., FOX, G. A. & HARWOOD, V. J. 2016. The interplay between predation, competition and nutrient levels influences the survival of *Escherichia coli* in aquatic environments. *Microb. Ecol.*, 72: 526-537.

WELLINGTON, Elizabeth M. H., BOXALL, Alistair B. A., CROSS, Paul, FEIL, Edward J., GAZE, William H., HAWKEY, Peter M., JOHNSON-ROLLINGS, Ashley S., JONES, Davey L., LEE, Nicholas M., OTTEN, Wilfred, THOMAS, Christopher M. & WILLIAMS, Prysor A. 2013. The role of the natural environment in the emergence of antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *The Lancet Infectious Diseases*, 13: 155-165.

WHO, World Health Organization. 2005. Containing antimicrobial resistance. *WHO Policy Perspectives on Medicines*.

WHO, World Health Organization. 2015. Global action plan on antimicrobial resistance. *WHO Library Cataloguing-in-Publication Data*.

WHO, World Health Organization. 2018. Global antimicrobial resistance surveillance system (GLASS) report: Early implementation 2017-2018.

WHO HEALTH TOPICS: ANTIMICROBIAL RESISTANCE. World Health Organization, 2018. Disponível em: <<https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>>. Acesso: 07 de março de 2019.