



INAH FRANCISCO DE PAULA DO ARTE

**Bactérias multirresistentes aos antibióticos isoladas de
águas do Rio Douro**

-

***Enterobacteriaceae* produtoras de ESBL e
Carbapenemases**

Dissertação do 2º Ciclo de Estudos Conducente ao Grau de Mestre em Controlo de
Qualidade

Trabalho realizado sob a orientação da Professora
Doutora Helena Ferreira e coorientação do Doutor
Josman Dantas Palmeira

Porto

Setembro 2021

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA DISSERTAÇÃO/TESE
APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA
DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.

Agradecimentos

Quero agradecer primeiramente à Deus por permitir que eu conseguisse chegar até aqui com saúde.

Gostaria de agradecer em especial à minha família pelo apoio e suporte dado durante todo esse tempo apesar da distância.

À minha orientadora, Professora Doutora Helena Ferreira, por toda dedicação, paciência, empenho e compreensão. Obrigada por compartilhar todo o seu conhecimento na área e por fazer parte não somente do meu crescimento profissional, mas também pessoal.

Ao meu co-orientador, Josman Dantas, pelos ensinamentos passados, pela ajuda, e principalmente pelo incentivo em todos os momentos.

Aos amigos da turma do Mestrado, que me acolheram nos momentos que mais precisei, por todo companheirismo, apoio, incentivo e carinho.

E a todos que colaboraram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

Obrigada a todos!

Resumo

A água é um dos maiores recursos naturais que existe, apesar de estar em fase de escassez em todo planeta. Os rios além de possuírem um caráter histórico, têm importância socioeconómica e permitem a manutenção hídrica local. A gestão adequada dos recursos hídricos deve ser feita de modo a assegurar que as águas provenientes de rios e lagos estejam próprias para banho ou consumo. Falhas apresentadas tanto no manuseio e controlo microbiológico da água, quanto no uso inadequado e falta de saneamento básico, podem contribuir para o aparecimento de doenças e comorbidades provenientes do contacto e utilização dessas fontes de água.

O presente trabalho teve como principal objetivo analisar e caracterizar a presença de *Enterobacteriaceae* produtoras de β -lactamases de espectro alargado (ESBL), β -lactamases do tipo AmpC e carbapenemases, nas águas do rio Douro. Foram analisados 92 isolados de 10 áreas de colheita diferentes. As amostras de água colhidas foram filtradas através do método de filtração por membrana, sendo posteriormente estas semeadas em meio de cultura MacConkey, MacConkey com Ampicilina, MacConkey com Cefotaxima e MacConkey com Meropenemo. As bactérias fermentadoras de lactose que cresceram nos meios contendo os antibióticos foram sujeitas a avaliação da suscetibilidade aos antibióticos pelo método de difusão em Agar. Os halos de inibição de crescimento apresentados no antibiograma foram analisados e avaliados de acordo com as *guidelines* do EUCAST. A identificação das bactérias resistentes foi realizada através do meio *Chromagar Orientation* e API 20 E. Os antibiogramas que indicaram a presença de isolados produtores de β -lactamases do tipo ESBL foram submetidos a testes fenotípicos e moleculares (PCR). Os isolados que apresentaram resistência aos carbapenemos foram submetidos ao teste de confirmação através do método de inativação de carbapenemos (CIM) e também por métodos moleculares. Dos 92 isolados analisados, 79 foram característicos de *Enterobacteriaceae*, apresentando 53 isolados de *E. coli*, 26 pertencentes ao grupo KESC, 12 não identificados e 1 *Pseudomonas* spp. Os resultados demonstraram que 70/92 isolados apresentaram resistência a cefotaxima, 69/92 a ceftazidima, 39/92 a ciprofloxacina e 21/92 ao sulfametoxazol+trimetoprim. Setenta e sete dos isolados apresentaram característica de *Enterobacteriaceae* multirresistente (EMDR). O total de isolados de *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBL foi de 12 sendo a maioria *E. coli*, apresentando resistência à cefotaxima e ceftazidima.

As ESBL detetadas foram do tipo CTX-M, OXA e SHV, com predomínio de CTX-M com 3 variantes detetadas, CTX-M grupo 1 (7/12), CTX-M grupo 2 (1/12) e CTX-M grupo 9

(2/12). Quanto às carbapenemases, em 15 isolados foram identificadas como KPC havendo predominância de outros genes do tipo CTX-M, TEM e OXA, sendo CTX-M grupo 1 (3/15), CTX-M grupo 2 (7/15), CTX-M grupo 8 (1/15), OXA (3/15), TEM (5/15). Alguns isolados apresentaram acúmulo de genes em um único isolado. Na análise de transferência de genes de resistência por conjugação não foi detectado nenhum isolado que apresentasse essa característica. A presença de bactérias produtoras de carbapenemases nas amostras analisadas da água do rio foi um dos resultados mais relevantes para o estudo no ponto de vista de saúde pública. Foi possível observar que existe uma zona no concelho de Gaia onde ocorre uma contaminação focal. Os resultados também sugerem um espelhamento da colonização instestinal da população nas águas do rio. A presença de *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBL, AmpC e carbapenemases configura um sério problema de saúde pública, pois esses isolados são capazes de tornar ineficaz a atuação de antibióticos contra infecções decorrentes dessas bactérias. Contudo, este trabalho vem ressaltar a relevância do impacto que a resistência aos antimicrobianos pode constituir em termos de ameaça para a saúde pública e também alertar que bactérias multirresistentes fora do seu contexto fisiológico, indicam contaminação, uma vez que as mesmas, com alterações genéticas adquiridas, podem criar novos riscos de infecção com capacidade de se instalar como agente infeccioso e disseminar-se através do meio ambiente.

Palavras-chave: *Enterobacteriaceae*; ESBL; Carbapenemases; Controlo Microbiológico de água; Multirresistência aos antibióticos; β -lactamâmicos.

Abstract

Water is one of the greatest natural resources that exists, despite being in a phase of scarcity across the planet. Rivers are the main sources of water hydric resources, in addition to having a regional historical character, they have socioeconomic importance in addition to allowing local water maintenance. Proper management of water resources must be carried out to ensure that water from rivers and lakes is suitable for bathing or drinking. Failures presented both in the handling and microbiological control of water, as in the inadequate use and lack of basic sanitation, can contribute to the appearance of diseases and comorbidities arising from the contact and use of these water sources. The main objective of the present work was to analyze and characterize the presence of *Enterobacteriaceae* producing extended spectrum β -lactamases (ESBL), AmpC β -lactamases and carbapenemases, in the waters of the Douro river. Ninety-two isolates from 10 different harvest areas were analyzed. The water samples collected were filtered by the membrane filtration method, and subsequently seeded in MacConkey, MacConkey with Ampicillin, MacConkey with Cefotaxime and MacConkey with Meropenem culture medium. Lactose fermenting bacteria that grew on the media containing the antibiotics were subjected to antibiotic susceptibility assessment by the agar diffusion method. Growth inhibition halos shown on the antibiogram were analyzed and evaluated according to EUCAST guidelines. The identification of resistant bacteria was performed using *Chromagar Orientation* and API 20 E. Antibiograms that indicated the presence of ESBL were submitted to phenotypic and molecular tests (PCR). Isolates that showed resistance to carbapenems were submitted to confirmation testing using the carbapenem inactivation method (CIM) and by molecular methods. Of the 92 isolates analyzed, 79 were characteristic of *Enterobacteriaceae*, with 53 isolates were *E. coli*, 26 belonging to the KESC group, 12 unidentified and 1 *Pseudomonas* spp. The results showed that 70/92 isolates were resistant to cefotaxime, 69/92 to ceftazidime, 39/92 to ciprofloxacin and 21/92 to sulfamethoxazole+trimethoprim. Seventy-seven of the isolates showed characteristics of multiresistant *Enterobacteriaceae* (EMDR). The total number of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* isolates was 12, the majority being *E. coli*, showing resistance to cefotaxime and ceftazidime. The ESBL detected were of the CTX-M, OXA and SHV type, with a predominance of CTX-M with 3 variants detected, CTX-M group 1 (7/12), CTX-M group 2 (1/12) and CTX-M group 9 (2/12). For carbapenemases, 15 isolates were identified as KPC producer's presence of other genes of the CTX-M, TEM and OXA type, being CTX-M group 1 (3/15), CTX-M group 2 (7/15), CTX-M group 8 (1/15), OXA (3/15), TEM (5/15). Some isolates showed accumulation of

genes in a single isolate. In the analysis of conjugation resistance gene transfer, no isolate showing this characteristic was detected. The presence of carbapenemase-producing bacteria in the analyzed samples of river water was one of the most relevant results for the study from the point of view of public health. It was possible to observe that there is an area in the municipality of Gaia where there is a focal contamination. The results also suggest a mirroring of the intestinal colonization of the population in the river waters. The presence of ESBL, AmpC and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae represents a serious public health problem, as these isolates can render ineffective the action of antibiotics against infections caused by these bacteria. However, this work emphasizes the relevance of the antimicrobial resistance can constitute in terms of threat to public health and alerts that multiresistant bacteria outside their physiological context, indicate contamination, since they, with acquired genetic alterations, can create new risks of infection with the capacity to establish itself as an infectious agent and spread through the environment.

Palavras-chave: *Enterobacteriaceae*; ESBL; Carbapenemases; Microbiological Control of Water; Antibiotic Multiresistance; β -lactams.

Índice

I.	<u>Introdução</u>	17
1.	Água	17
1.1	Águas fluviais e o meio ambiente	17
1.2	Controlo de Qualidade de águas fluviais	18
1.3	Controlo de Qualidade de água e sua legislação	19
1.4	Flora bacteriana da água	20
2.	Microbiota Intestinal & Colonização bacteriana intestinal	21
2.1	Barreira intestinal humana e de mamíferos	21
2.2	Influência da Microbiota Intestinal	22
2.3	Colonização intestinal em termos de bactérias resistentes aos antibióticos	22
3.	<i>Enterobacteriaceae</i> encontradas na água	24
3.1	Principais géneros da família <i>Enterobacteriaceae</i> encontradas no estudo	24
3.1.1	<i>Escherichia coli</i>	25
3.1.2	<i>Klebsiella</i>	27
3.1.3	<i>Enterobacter</i>	28
4.	Resistência aos antimicrobianos	29
4.1	Bactérias e sua resistência aos antibióticos	29
4.2	Antibióticos β -lactâmicos	30
4.2.1	Principais classes de antibióticos β -lactâmicos	33
4.3	β -lactamases	34
4.3.1	β -lactamases de espectro estendido (ESBL)	36
4.3.2	β -lactamases tipo AmpC	37
4.3.3	Carbapenemases	38

4.4	Antibióticos não β -lactâmicos	39
4.5	Disseminação de β -lactamases nas bactérias da família Enterobacteriaceae	40
5.	Marcador epidemiológico e ecológico	41
5.1	Bactérias multirresistentes no meio ambiente x marcador epidemiológico e ecológico	41
II.	<u>Objetivos</u>	43
III.	<u>Metodologia</u>	44
1.	Local das amostras de água	44
2.	Preparação dos meios de cultura	45
3.	Filtração das Amostras e Incubação	46
4.	Preparação dos Isolados das Amostras	47
5.	Antibiograma dos Isolados	49
6.	Classificação dos Isolados e Testes de confirmação	51
7.	Identificação presuntiva de bactérias em meio cromogénico UTI Agar	53
8.	Teste CIM	54
9.	Teste SIM	56
10.	Galeria para indentificação de bactérias (API 20E)	56
11.	Extração do DNA	57
12.	Teste de deteção por PCR	58
12.1	Preparação da solução de <i>primers</i> KPC	58
12.2	Preparação da solução de <i>primers</i> ESBL	58
12.3	Preparação da solução de <i>primers</i> ESBL e Carbapenemases	59
12.4	Transferência para os tubos de análise e controlos	60
12.5	Preparação do gel de agarose	60
12.6	Eletroforese em gel de agarose	60

13. Avaliação de Transferência de gene	61
14. Congelação das amostras	62
IV. <u>Resultado & Discussão</u>	63
1. Amostras e áreas selecionadas para estudo	63
2. Seleção dos isolados	63
3. Perfil de Resistência dos Antibióticos	64
4. Perfil de Multirresistência aos antibióticos	67
5. <i>Enterobacteriaceae</i> produtoras de ESBL	69
5.1 Pesquisa de ESBL por métodos moleculares (PCR)	70
6. <i>Enterobacteriaceae</i> produtoras de AmpC	72
7. Isolados resistentes aos carbapenemos	73
7.1 Pesquisa de carbapenemases por métodos moleculares (PCR)	76
8. Transferência de genes de resistência de <i>Enterobacteriaceae</i> produtoras de ESBL, AmpC e carbapenemases	78
V. <u>Conclusão</u>	79
VI. <u>Perspectivas Futuras</u>	82
VII. <u>Referências Bibliográficas</u>	83

Índice de Figuras

Figura 1. Imagem da cultura bacteriana de <i>E. coli</i> em meio MacConkey Agar	26
Figura 2. Imagem da cultura bacteriana de <i>Klebsiella</i> em meio MacConkey Agar	27
Figura 3. Imagem da cultura bacteriana <i>Enterobacter</i> em meio MacConkey Agar	28
Figura 4. Estrutura química de um antibiótico β -lactâmico (evidenciando o anel β -lactâmico)	31
Figura 5. Estruturas químicas dos antibióticos	32
Figura 6. Mapeamento dos pontos de colheita de água	44
Figura 7. Inoculação da membrana filtrante nas placas contendo meio cultura	47
Figura 8. Crescimento das colônias na membrana filtrante e repicagem de colônias fermentadoras de lactose	48
Figura 9. Seleção aleatória das colônias fermentadoras de lactose na membrana filtrante para posterior repicagem em meio respectivo ao seu crescimento	49
Figura 10. Disposição dos discos nas placas de antibiograma	51
Figura 11. Teste de confirmação para inóculos com suspeita de serem bactérias produtoras de β -lactamase de espectro alargado	52
Figura 12. Teste de confirmação para inóculos com suspeita de serem bactérias produtoras de AmpC	53
Figura 13. Teste de Identificação presuntiva de bactérias em meio cromogénico UTI Agar	54
Figura 14. Procedimento para o teste CIM	55
Figura 15. Figura ilustrativa do teste de mobilidade	56
Figura 16. Resultado inicial e final das reações do teste bioquímico API20E para o isolado 5-CTXB	57
Figura 17. Esquema da eletroforese em gel de agarose	61
Figura 18. Isolados que apresentaram resistência e resistência intermediária aos antibióticos β -lactâmicos das 92 amostras isoladas	65
Figura 19. Isolados que apresentaram resistência e resistência intermediária aos antibióticos não β -lactâmicos das 92 amostras isoladas	66

Figura 20. Perfil de multirresistência aos antibióticos de acordo com suas categorias	67
Figura 21. Perfil de resistência dos isolados de <i>Enterobacteriaceae</i> multirresistente as classes de antibióticos	68
Figura 22. Sinergismo característico de ESBL e teste de confirmação de disco para ESBL	69
Figura 23. Isolados que apresentaram características confirmatórias de produtores de ESBL	70
Figura 24. Testes confirmatórios de presença de produtores de AmpC	72
Figura 25. Isolados que apresentaram características confirmatórias de produtores de AmpC	73
Figura 26. Exemplo de teste de suscetibilidade aos antibióticos de isolado resistente ao meropenemo	74
Figura 27. Exemplo de resultados de <i>Carbapenem Inactivation Method</i> (CIM)	74
Figura 28. Isolados que apresentaram características confirmatórias de produtores de carbapenamases	75
Figura 29. Eletroforese dos isolados que continham o gene da KPC	76

Índice de Tabelas

Tabela 1. Principais classes de antibióticos β -lactâmicos	33
Tabela 2. Principais classes e grupos das β -lactamases	34
Tabela 3. Classificação por grupo funcional e molecular das β -lactamases	35
Tabela 4. Pontos de colheita de Água do Rio Douro	45
Tabela 5. Preparação dos meios de cultura	46
Tabela 6. Número de isolados por amostras	50
Tabela 7. Especificação dos primers utilizados nos ensaios de PCR de acordo com os genes e controlos utilizados estudo	59
Tabela 8. Isolados selecionados nos meios de seleção contendo antibióticos a partir das amostras de água do rio	64
Tabela 9. Detecção dos genes codificadores de ESBL nos isolados selecionados	71
Tabela 10. Detecção dos genes codificadores de ESBL nos isolados selecionados	77

Lista de Abreviaturas e Símbolos

°C	Graus Celsius
%	Porcetagem
µL	Microlitro
AIEC	<i>E. coli</i> aderente-invasiva
AMC	Amoxicilina + ácido clavulânico
APA	Agência Portuguesa do Ambiente
ATCC	<i>American typing culture collection</i>
BL	Antibiótico β-lactâmico
<i>bla</i>	Gene de β-lactamase
CAZ	Ceftazidima
CIM	<i>Carbapenem Inactivation Method</i>
CIP	Ciprofloxacina
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CP-EC	<i>Escherichia coli</i> produtora de carbapenemase
CPE	<i>Enterobacteriaceae</i> produtora de carbapenemase
CTL	Cefotaxima + ácido clavulânico
CTX	Cefotaxima
CX	Cefoxitina
DDST	Double disk synergism test
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EAEC	<i>E. coli</i> enteroagregativa
EHEC	<i>E. coli</i> enterohemorrágica
EIEC	<i>E. coli</i> enteroinvasiva
EMDR	<i>Enterobacteriaceae</i> multirresistente aos antibióticos
EPEC	<i>E. coli</i> enteropatogénica
ESBL	<i>Extended spectrum beta-lactamase</i> - Beta-lactamase de espectro estendido
ETEC	<i>E. coli</i> enterotoxigénica
ExPEC	<i>E. coli</i> extraintestinal
F-NRC	Centro Nacional de Referência Francês
FOC	Cefotaxima + Cloxacilina
g	Gramas
IECs	Células epiteliais intestinais
ITU	Infeções do trato urinário

KESC	<i>Klebsiella, Enterobacter, Serratia e Citrobacter</i>
LEV	Levofloxacin
MDR	<i>Multi-drug resistant</i> - Multirresistência aos antibióticos
MEM	Meropenem
mg	Miligram
mL	Mililitro
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Polimerase chain reaction
SNC	Sistema Nervoso Central
TGI	Trato Gastrointestinal
TSA	Teste de Suscetibilidade Alargado
UFC	Unidades Formadoras de Colónias

I. Introdução

1. Água

1.1 Águas fluviais e o meio ambiente

A água, apesar de estar em fase de escassez em todo planeta, é um dos maiores recursos naturais que existe. É considerada um dos bens mais essenciais para a vida, sendo dever do estado garantir o direito e o acesso a água potável tanto para consumo próprio como para fonte recreativa (1).

Os rios são as principais fontes de recursos hídricos naturais, além de possuírem um caráter histórico regional, têm importância socioeconómica e permite a manutenção hídrica local (2). A gestão adequada dos recursos hídricos deve ser feita de modo a assegurar que as águas provenientes de rios e lagos estejam próprias para banho ou consumo e que mantenham suas características físico-químicas, biológicas e naturais adequadas. Falhas apresentadas tanto no manuseio e controlo microbiológico da água, quanto no uso inadequado e falta de saneamento básico, podem contribuir para o aparecimento de doenças e comorbidades provenientes do contacto e utilização dessas fontes de água (3).

A água não tratada, imprópria para consumo pós tratamento, pode trazer riscos a saúde da população que vive ao redor ou às margens desses rios, se tornando veículo de contaminação por diversos agentes biológicos e químicos. Microrganismos patogénicos ou substâncias químicas presentes no meio ambiente, principalmente em águas fluviais, podem causar doenças como doenças de veiculação hídrica (4). Há diversas fontes de contaminação que são escoados em rios e lagos inadequadamente como ductos clandestinos, aterros sanitários que atingem os lençóis freáticos, agrotóxicos que são levados através das águas pluviais para os rios e indústrias que muitas vezes utilizam os rios para descartar seus resíduos tóxicos (3,4). O descarte de resíduos tanto líquidos quanto sólidos de origem industrial ou urbana afetam significativamente a qualidade da água de rios, impactando diretamente na disponibilidade de recurso natural que o rio oferece e gerando um impacto ambiental drástico (5,6). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) estima-se que 25 milhões de pessoas no mundo são acometidas por doenças transmitidas pela água, causadas principalmente por microrganismos patogénicos de origem entérica, animal ou humana, e transmitidos basicamente pela via fecal-oral (6).

A análise de microrganismos fornece informações sobre a qualidade da água e permite identificar a presença destes nesses ambientes, além de conseguir monitorizar o desenvolvimento e controlar a disseminação bacteriana (7).

Os principais microrganismos que são encontrados em águas residuais são provenientes de origem fecal, e grande parte deles Gram-negativos, que estão intimamente ligados a microbiota intestinal (8). Estes microrganismos estão cada vez mais presentes no meio ambiente, e devido ao número alarmante de infecções causadas e uso incorreto de antibióticos, muitos desenvolveram entre eles resistência a diferentes classes de antibióticos utilizados para o tratamento das infecções, tornando-se assim multirresistentes. Essa resistência pode ser observada principalmente em agentes patogénicos como as *Enterobacteriaceae* (9).

1.2 Controlo de Qualidade de águas fluviais

A água é considerada fonte essencial e possui várias utilidades, desde o uso público, industrial e agrícola à produção de energia elétrica e recreação. A recreação ultimamente tem ganhado bastante espaço quanto a balneabilidade das áreas de banho, visto que tem se alertado aos riscos à saúde humana pela exposição direta a áreas contaminadas com microrganismos patogénicos causadores de doenças de veiculação hídrica (5). Diante desse cenário, fez-se necessário o aprimoramento de tecnologias que facilitem a realização de análises e controlo de águas fluviais de modo a detetar precocemente a presença de microrganismos patogénicos, evitando o aparecimento de surtos e disseminação microbiana (6).

As doenças de veiculação hídrica podem ser evitadas se medidas de saneamento forem realizadas, como colheita e tratamento de resíduos, análise periódica da água, e tratamento de águas de abastecimento. Apesar do uso inadequado de tecnologias utilizadas por indústrias e rede alimentícia contribuírem para o aumento de dejetos provenientes de esgotos sanitários e industriais no meio ambiente, o tratamento adequado de esgoto e águas seria a medida mais relevante e apropriada para minimizar ou até mesmo evitar o risco à saúde pública (10).

A água possui características físico-químicas por isso não se encontra em seu estado puro sempre. O tratamento de água é realizado com base nos índices permitidos de microrganismos contidos nela, e que após análises e procedimentos, ela deve apresentar boa qualidade bacteriológica e química (11). A principal exigência para se obter a qualidade da água, é proteger a população e que a fonte não seja veículo de contaminação e risco a saúde humana (12). Os critérios que são utilizados para assegurar a qualidade tem como objetivo prover a base para o desenvolvimento de

ações implementadas junto à população de modo a garantir a segurança e qualidade do fornecimento de água com redução a concentração mínima de constituintes e microrganismos que sejam nocivos à saúde (12).

1.3 Controlo de Qualidade das águas e sua legislação

Definição de Controlo no âmbito de qualidade: *“Conjunto de ações de avaliação da qualidade da água realizadas com carácter regular pela entidade responsável pela gestão dos recursos hídricos em sistemas naturais ou pela entidade gestora do sistema de abastecimento de água, do sistema de tratamento de águas residuais ou da instalação industrial, com vista à manutenção permanente da sua qualidade em conformidade com a norma ou padrão estabelecido legalmente”* (13).

Um dos principais requisitos para garantir a segurança da utilização das águas balneares é o controlo de qualidade da água. A qualidade das águas balneares representa não somente um fator de saúde pública, mas também um importante indicador de qualidade ambiental. Devido a essas questões, a gestão da qualidade destas águas é uma preocupação para Agência Portuguesa do Ambiente (APA) (13).

A Diretiva 2006/7/CE, de 15 fevereiro de 2006 responsável por regular a gestão das águas balneares foi transferida para Decreto-Lei n.º 135/2009, de 3 de junho, alterado pelo Decreto-Lei n.º 113/2012, de 23 de maio, que estabelece o regime de identificação, monitorização e classificação da qualidade das águas balneares e de prestação de informação ao público sobre as mesmas, tendo como principal objetivo a prevenção da saúde humana, preservação, proteção e melhoria do ambiente (13).

O Decreto-Lei n.º 236/98, de 1 de agosto estabelece normas, critérios e objetivos de qualidade com a finalidade de proteger o meio aquático e melhorar a qualidade das águas em função dos seus principais usos, definindo os requisitos a observar na utilização das águas para os seguintes fins: águas para consumo humano, águas para suporte da vida aquícola, águas balneares e águas de rega; assim como as normas de descarga das águas residuais na água e no solo (14). Atribui competências a diversas entidades relativas e especificamente a cada um daqueles domínios, ao licenciamento, inspeção, fiscalização, vigilância, classificação e inventário das águas (14).

Em Portugal a frequência com que se efectua a colheita de amostras varia de acordo com a categorização da água balnear: costeira, de transição e interior. Também é avaliada a pressão que é exercida sazonalmente (14).

O método de avaliação das amostras é baseado na classificação em que se é analisada amostra por amostra. A avaliação da qualidade da água surgiu com a necessidade do cuidado da saúde da população de modo a prevenir os possíveis riscos

que podem ser causados por poluição e situações atípicas nas águas. O controlo de qualidade da água é composto por um conjunto de análises e avaliações com base em critérios e parâmetros biológicos e físico-químicos que tem por finalidade garantir a sua qualidade, potabilidade, balneabilidade e segurança, tanto para consumo humano quanto para recreação (15).

1.4 Flora bacteriana da água

A biodiversidade presente em rios, lagos e mares é composta por uma variedade de espécies que fazem desses ambientes seu nicho e habitat natural. Nessas águas são encontrados microrganismos da flora microbiana autóctones, que já estão ali pré existentes antes mesmo de qualquer tipo de tratamento àquelas águas. As principais bactérias pertencente a esse grupo são do género das *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Xanthomonas*, *Micrococcus*, *Flavobacterium* e *Bacillus* (16).

As bactéria heterotróficas que se alimentam de nutrientes orgânicos oriundas de outros seres para sobreviverem, estão presentes em diferentes ambientes como água, solo e alimentos, e a contagem delas deve ser feita com a finalidade de avaliar as condições higiénico sanitárias e qualidade da água (17,18)

O controlo da flora bacteriana das águas tem como objetivo detetar e avaliar a presença também de microrganismos indicadores de contaminação fecal como coliformes totais, coliformes fecais e/ou *Escherichia coli*, *Enterococcus* e *Pseudomonas aeruginosa* (16). Além de determinar o grau de potabilidade e balneabilidade em que a água analisada se encontra, pois na maioria das vezes, as bactérias comensais presentes na flora da água não são consideradas patogénicas, sem o controlo periódico destes locais algumas delas podem atuar como microrganismos patogénicos oportunistas (19).

2. Microbiota Intestinal & Colonização bacteriana intestinal

2.1 Barreira Intestinal humana e de mamíferos

A mucosa gastrointestinal é formada por uma superfície revestida por células epiteliais formando uma barreira dinâmica composta por conexões intercelulares que separam o ambiente externo e meio interno, impedindo assim, a passagem de substâncias nocivas, caracterizando-a como essencial para a saúde humana (20,21).

A barreira intestinal é constituída por vários componentes que lhe conferem a característica de multicamada capaz de realizar diversas funções em cada região específica. A degradação de bactérias e antigénios pelo ácido gástrico e suco pancreático por exemplo, ocorre no lúmen intestinal, suscitando a inibição de colonização de agentes patogénicos através das bactérias comensais pela produção de substâncias antimicrobianas (22). O microambiente do epitélio, consiste numa camada de água e uma camada de muco que impede a adesão de bactérias, e contém substâncias antimicrobianas secretadas pelas células de Paneth e IgA pelos enterócitos. Abaixo dessas camadas há células epiteliais que formam ligações homo e heterotípicas de domínios extracelulares de proteínas (22).

As células epiteliais intestinais (IECs) também são responsáveis pela absorção de nutrientes e eletrólitos que provêm do organismo, atuando como uma barreira semipermeável e seletiva às diversas substâncias (21). Além disso, são responsáveis pela manutenção da homeostase do tecido (23).

A barreira intestinal funciona como um sistema que atua coordenadamente intra e extracelularmente, de modo a impedir a passagem de toxinas, ou componentes microbianos que venham afetar a barreira epitelial, preservando concomitantemente o seu desenvolvimento, a atuação do sistema imunológico, o desenvolvimento da microbiota intestinal e o balanceamento da tolerância aos antigénios (21). Qualquer interferência nos mecanismos de defesa da função da barreira podem fomentar a propagação de respostas imunes inadequadas gerando instabilidades ao organismo (21,24,25).

2.2 A influência da Microbiota Intestinal

A microbiota intestinal é composta por uma diversidade de bactérias que influenciam diretamente a saúde do hospedeiro. Estima-se que há presente cerca de 500 a 1000 espécies variáveis de bactérias em todo intestino humano, as quais desenvolvem interações junto ao hospedeiro contribuindo para a maturação do sistema imunológico (26). Esta relação inicia-se desde o nascimento até a formação de múltiplas colônias microbianas que induzem ao recrutamento de inúmeras células, contribuindo junto ao epitélio intestinal a construção de uma barreira capaz de limitar os microrganismos dentro do lúmen intestinal (27).

A microbiota intestinal saudável e ativa é o principal motor para uma regulação imuno fisiológica no intestino. A microbiota saudável, como dito anteriormente, desenvolve uma barreira impedindo a invasão por microrganismos patogênicos, potencializando os mecanismos de defesa do organismo (28,29).

As bactérias simbióticas além de proporcionarem benefícios metabólicos ao organismo, promovem a homeostase, a resposta imunológica e a proteção à colonização por organismos patogênicos (30). Os organismos patogênicos criam diversas estratégias para suscitar sua proliferação dentro da microbiota intestinal, e essas alterações, sejam por fatores externos ou genéticos, podem fomentar a infecção causando o desenvolvimento de doenças inflamatórias (31).

2.3 Colonização instestinal em termos de bactérias resistentes aos antibióticos

É sabido que a microbiota intestinal é composta por diferentes espécies de bactérias as quais pertencem a quatro filos específicos: Bacteroides, Firmicutes, Proteobactéria e Actinobactéria. Fazem parte destes grupos espécies como *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* e várias outras Bacteroides que abrangem *B. fragilis*, *B. ovatus* (26). As demais bactérias intestinais representam menos de 10% da população bacteriana, e estas pertencem ao gênero Proteobacteria, da qual faz parte a *Escherichia coli*, *Actinobacteria*, que inclui a *Bifidobacterium*, *Fusobactéria*, *Verrucomicrobia* e *Cianobactéria*. É importante ressaltar que a microbiota pode variar significativamente de indivíduo para indivíduo, ocasionando mudanças relevantes de acordo com fatores intrínsecos e extrínsecos (32).

As *Enterobacteriaceae* possuem uma grande suscetibilidade aos antibióticos β -lactâmicos e não β -lactâmico. Nos últimos anos as *Enterobacteriaceae* têm sido apontadas como a principal família resistente a essas classes de antibióticos (18). A percentagem de *Klebsiella pneumoniae* resistente a agentes β -lactâmicos tem aumentado gradativamente. A *E. coli* também tem estado constantemente presente nesse cenário de bactérias resistentes. Apesar de ser um agente comensal intestinal, quando adquirido fatores de virulência, alguns clones de *E. coli* acabam por se tornar agentes patogênicos extraintestinais (ExPEC), que são os principais responsáveis por infecções graves e surtos mundialmente (33).

Há diversos fatores que influenciam e impactam no equilíbrio da microbiota intestinal e um dos principais dele é o uso de antibiótico. O desequilíbrio da microbiota pode induzir um ambiente pró-inflamatório acarretando o desenvolvimento de inflamações intestinais crônicas em indivíduos susceptíveis (34). Friswell e colaboradores (2010) revelaram que no processo de inflamação, há um aumento no número de bactérias nocivas nas quais estão presentes as estirpes de *Escherichia coli* e uma diminuição no número e na biodiversidade de Firmicutes e Bacteroides (35). Estas bactérias são encontradas no lúmen intestinal e estabelecem variadas relações com o hospedeiro de modo a atuar na preservação imunitária da barreira, integridade, motilidade intestinal e absorção de nutrientes. Em condições normais, o hospedeiro estabelece uma relação de simbiose com esses microrganismos, mas essa relação pode sofrer alteração caso haja algum desequilíbrio dessas espécies comensais e espécies patogênicas (35). A disbiose é um exemplo desse desequilíbrio, que pode vir a acarretar o crescimento e colonização intestinal por microrganismos patogênicos.

A disseminação de bactérias e genes que codificam características de resistência aos antibióticos e fatores de virulência contribuem para um cenário preocupante, uma vez que influencia diretamente a saúde humana podendo gerar graves danos e consequentemente contaminação ambiental favorecendo a disseminação de bactérias multirresistentes no meio ambiente (36,37).

3. Enterobacteriaceae encontradas na água

3.1 Principais géneros da família *Enterobacteriaceae* encontrados no estudo

As *Enterobacteriaceae* são uma família caracterizada por serem bacilos Gram-negativos e estarem presentes na flora intestinal de humanos e animais, uma vez que as bactérias pertencentes a essa família são as principais colonizadoras do trato gastrointestinal. Em sua maioria são aeróbios e anaeróbios facultativos, podendo ser imóvel ou móvel devido a presença de flagelos peritricos. Possuem também como particularidades serem fermentadores de glucose, produtores de catalase, não produtores da citocromo C oxidase e são capazes de reduzir os nitratos a nitritos (38,39).

Bactérias presentes nessa família, apesar de pertecerem a microbiota intestinal normal de humanos e animais, podem atuar como agentes de infecção e causar danos a saúde do homem tanto em ambientes hospitalares quanto na comunidade (37,40).

Há diversos meios e análises bioquímicas para realizar a identificação e a diferenciação de géneros e espécies pertencentes a essa família, já que as bactérias incluídas nela são de fácil cultivo e não necessitam de muitos suplementos para seu crescimento tanto em meio líquido ou sólido (18,39,41). As bactérias pertencentes a família *Enterobacteriaceae* são consideradas bactérias detetadas mais frequentemente em processos infecciosos (18).

A principal bactéria representante dessa família é *Escherichia coli* por desempenhar papéis importantes para a manutenção do equilíbrio e homeostase intestinal, além de promover e preservar a flora microbiana. Além dela há também a presença de outras bactérias que desenvolvem atuações como agentes infecciosos no organismo humano e animal e têm bastante relevância clínica, como: *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella* spp, *Citrobacter*, *Serratia*, *Shigella*, *Yersinia* e *Enterobacter cloacae* (42).

Quanto a suscetibilidade aos antibióticos, no geral as bactérias pertencentes a família das *Enterobacteriaceae* são suscetíveis a antibióticos β -lactâmicos e não β -lactâmicos. São sensíveis a ampicilina, cefalosporina, tetraciclina, aminoglicosídeos, cloranfenicol, dentre outros, variando conforme a espécie. Devido ao uso indiscriminado desses fármacos, tem se alastrado cada vez mais o desenvolvimento de resistência aos

antimicrobianos por parte dessas bactérias, principalmente para as produtoras de β -lactamases de espectro estendido (ESBL) e carbapenemases (41–43).

3.1.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli é caracterizada por ser uma bactéria Gram-negativa anaeróbia facultativa pertencente a família das *Enterobacteriaceae* e estar presente em todo trato gastrointestinal (TGI) de indivíduos saudáveis, além de ser considerada o principal indicador de contaminação fecal (44).

É também responsável por causar infecções intestinais, no trato geniturinário e septicemia tanto em ambiente hospitalar quanto na comunidade (45).

Existem cinco diferentes patótipos de *E. coli* das quais cada uma delas possui suas características de virulência: enteropatogénica (EPEC), enteroinvasivas (EIEC), enterohemorrágicas (EHEC), enteroagregativa (EAEC) e enterotoxigénicas (ETEC). Todas essas estirpes expressam toxinas capazes de causar efeitos patogénicos nas células hospedeiras (44).

A *E. coli* aderente-invasiva (AIEC) possui propriedades agressivas ao hospedeiro, uma vez que consegue invadir e aderir às células epiteliais intestinais. São patogénicas e colonizam lesões nas porções ileais de pacientes. A adesão bacteriana é o primeiro passo para que seja iniciado o processo de colonização do epitélio intestinal, pois dessa forma há maior resistência das bactérias ao deslocamento mecânico ocasionado pela mobilidade das vilosidades do intestino (46).

E. coli é considerada um organismo patogénico que tanto pode causar doenças diarreicas, como é o caso de algumas estirpes patogénicas intrainestinais, mas também pode causar infecções extraintestinais como as *E. coli* extraintestinais (ExPEC), que são consideradas uma das principais causadoras de infecções no trato urinário (ITU), do sistema nervoso central (SNC) e tecidos moles (9).

A bactéria possui diferentes genes de fatores de virulência que podem ser adquiridos ao longo do tempo presentes em seu cromossoma ou nos elementos genéticos móveis (40,47). Esses genes facilitam a aderência e a infecção da bactéria no organismo do hospedeiro. Os principais fatores de virulência da bactéria são a produção de toxinas, invasinas, seus lipopolissacarídeos, cápsulas, adesinas e outros. Adicionalmente, a presença de fímbrias e de outras estruturas relacionadas desempenham um papel importante na virulência da bactéria. Para além disso, por

apresentar uma estrutura antigénica capsular, flagelar e somática, *E. coli* é facilmente classificada como *E. coli* extraintestinal patogénica (36,45).

Devido ao número alarmante de infecções extraintestinais por *E. coli*, muitas desenvolveram entre elas resistência a diferentes classes de antibióticos utilizados para o tratamento das infecções, e essa resistência pode ser observada principalmente em agentes patogénicos como as *Enterobacteriaceae* produtoras de β -lactamase de espectro alargado (ESBL) e algumas β -lactamases de classe C (AmpC) (44,48).

A β -lactamase mais comum na *E. coli* é a plasmídica, TEM-1, que é caracterizada por condicionar alta resistência às penicilinas hidrolisáveis, como ampicilina e amoxicilina (48). Sua característica em meio MacConkey é bastante específica, apresentando colónias uniformes e secas de coloração rosada como mostra a figura abaixo.

Figura 1: Imagem da cultura bacteriana de *E. coli* em meio MacConkey Agar



3.1.2 *Klebsiella*

Klebsiella pneumoniae é uma das espécies mais reconhecida como agente principal da pneumonia descrita por Carl Friedländer em 1882, sendo também mais frequentemente detetada em quadros de infecção no intestino humano (49). Está entre as estirpes mais patogénicas comuns no mundo e uma das principais responsáveis por causar sepsis neonatal (49).

Além de causar pneumonia lobar e em casos mais graves levar a quadros de necrose nos lobos pulmonares, ocasionalmente pode estar associada a infeções no trato urinário de pacientes, provocando endocardites e outras infeções oportunistas (50).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) a *Klebsiella pneumoniae* tem sido considerada uma estirpe que apresenta grande risco para a saúde pública, uma vez que suas características de multirresistência a antibióticos têm provocado altos índices de persistência em infeções e mortes (49). Sua característica fenotípica é bastante particular, são produtoras de colónias com aspeto mucóide em meio MacConkey, produtoras de urease e são imóveis como apresentado na *figura 2* abaixo. Apresenta resistência aos β -Lactâmicos devido a presença da β -lactamase SHV-1, ressaltando sua resistência a ampicilina e amoxicilina (51,52).

Figura 2: Imagem da cultura bacteriana de *Klebsiella* em meio MacConkey Agar



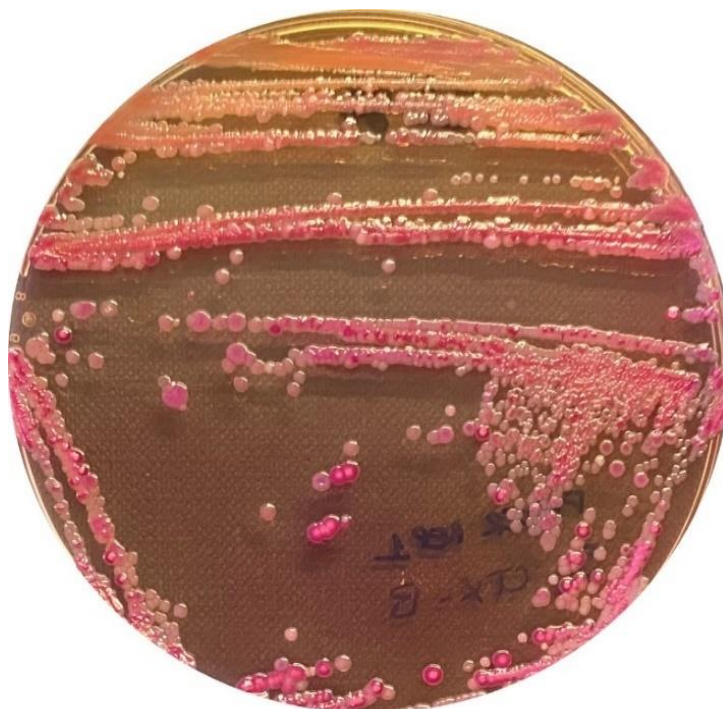
3.1.3 *Enterobacter*

O género *Enterobacter* antes classificado como *Aerobacter* é constituído por várias espécies, sendo a principal delas *Enterobacter cloacae*. O *Enterobacter* não é considerado um agente de infeção primária apesar de estar incluído na lista dos microrganismos patogénicos mais comuns capazes de produzir uma variedade de infeções (53). Esses microrganismos são móveis e capazes de colonizar a mucosa de mamíferos. Estão presentes na flora humana principalmente de pacientes hospitalizados. São capazes de colonizar o trato respiratório, a pele, o trato urinário e também o trato gastrointestinal (54).

Dentre as espécies mais patogénicas, destacam-se *Enterobacter cloacae* e *Enterobacter aerogenes*, pois ambas estão associados a surtos de infeções hospitalares por acesso venoso e outras mais infeções em ambiente hospitalar (55).

Espécies pertencentes a esse grupo são resistentes a diversos antibióticos incluindo cefalosporinas de terceira geração (55). Sua identificação através do seu crescimento em cultura no meio MacConkey não é totalmente perceptível, uma vez que pode ser confundida com outra espécie. São necessários testes bioquímicos complementares que comprovem a identificação de *Enterobacter* (54).

Figura 3: Imagem da cultura bacteriana *Enterobacter* em meio MacConkey Agar



4 Resistência aos Antimicrobianos

4.1 Bactérias e sua resistência aos antibióticos

O frequente uso indiscriminado de antibióticos em ambientes hospitalares e na comunidade tem sido alvo de constantes notificações na comunidade científica, uma vez que bactérias resistentes têm aparecido no meio ambiente principalmente em ambientes aquáticos, que acabam por constituir a principal via de disseminação de resistência bacteriana para a comunidade que vive ao redor (56). As bactérias presentes nesses ambientes podem configurar um reservatório de resistência aos antimicrobianos além de criar um meio de propagação e desenvolvimento de novos genes de resistência (57,58).

Atualmente tem se observado um número crescente de microrganismos resistentes a uma ou mais classes de antibióticos, assim como aqueles que apresentam perfil de resistência como as produtoras de β -lactamase de espectro estendido (ESBL), as β -lactamase produtoras de AmpC e aquelas que apresentam resistência aos carbapenemos. Essas bactérias são encontradas frequentemente em ambientes hospitalares, mas também em níveis crescentes na comunidade e no meio ambiente (59).

Os mecanismos de resistência bacteriana são múltiplos e podem ser transferidos entre populações bacterianas por conjugação. A gradual prevalência de bactérias multirresistentes normalmente é associada a um elemento extra cromossômico ou plasmídeo que pode ser transferido entre bactérias da mesma espécie ou de espécies diferentes (60).

Considerando o progresso da resistência aos antibióticos, cada bactéria de acordo com a sua classificação, apresenta diferentes mecanismos de resistência, tais como: modificação ou destruição enzimática do fármaco; alterações nas moléculas alvo dos antibióticos, produção de outras moléculas alvo que não são inibidas pelo antibiótico enquanto se mantém a produção de moléculas alvo originais (61).

Com a introdução dos antibióticos β -lactâmicos, a resistência a estes se tornou um grande problema clínico para a comunidade científica, já que se configurava a transferência por plasmídeo de genes de resistência que codificam β -lactamases do tipo (TEM) e (SHV). Mais para a frente, com a introdução das cefalosporinas de terceira geração, pode-se perceber a disseminação dos genes codificados de TEM e SHV pela

Escherichia coli, ressaltando a produção de β -lactamases de espectro alargado (ESBL) sendo capaz de hidrolisar penicilinas, cefalosporinas de terceira geração (ceftazidima - cefalosporinas de largo espectro) e monobactâmicos, sendo estas β -lactamases inibidas pelo ácido clavulânico (33).

Em seguida, surgiram as enzimas do tipo CTX-M que possuem atividade hidrolítica alargada para a cefotaxima quando comparada com a ceftazidima. Diversos microrganismos que produzem essas enzimas são caracterizados como sendo os mais prevalentes nos últimos anos em diferentes partes do mundo, concentrando-se principalmente na Europa e na América do Sul. Novas variantes da CTX-M já podem ser observadas com elevada atividade para ambos antibióticos, como, por exemplo a CTX-M-15, CTX-M14, CTX-M-32 que possuem ampla presença em ambiente hospitalar (33,62).

Cada bactéria que traz consigo resistência a antibióticos, tem por si só características intrínsecas que definem sua interação com o hospedeiro. Com esse recorte e tendo em vista a presença de bactérias multirresistentes no meio ambiente e principalmente nas águas de rios, torna-se interessante avaliar a resistência aos antibióticos em bactérias oriundas da água do rio Douro, dado o risco que pode representar para população (57).

4.2 Antibióticos β -lactâmicos

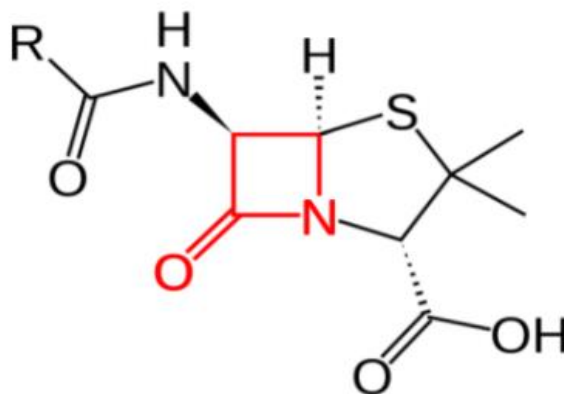
Os antibióticos são considerados compostos naturais, quando produzidos por fungos, bactérias ou sintéticos e são capazes de interferir no crescimento bacteriano ou levar a morte desses microrganismos. São denominados bactericidas quando causam a morte de bactérias, e bacteriostáticos quando conseguem inibir apenas o seu crescimento (63).

O primeiro antibiótico descoberto foi a penicilina em 1928 por Alexander Fleming. Foi o primeiro β -lactâmico desenvolvido e introduzido na terapêutica em humanos em 1940 (64).

Os antibióticos β -lactâmicos são considerados a primeira escolha de tratamento de infecções, sendo a classe de antibióticos mais utilizada em todo mundo devido ao seu amplo espectro de ação e baixa toxicidade para o indivíduo (64,65). São constituídos por um anel β -lactâmico que representa a porção ativa do fármaco, responsável pela ação antibiótica como apresentado na figura abaixo, contendo três átomos de carbono

e um de azoto com radicais (65,66). São subdivididos em quatro grupos: penicilinas, cefalosporinas até a 5ª geração, monobactams e carbapenems (65,67).

Figura 4: Estrutura química de um antibiótico β -lactâmico (evidenciando o anel β -lactâmico)

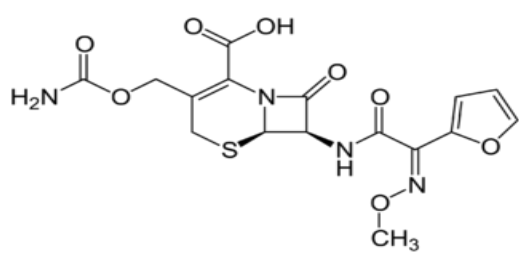


Fonte: (65,66)

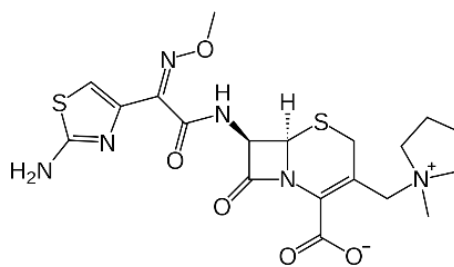
O principal mecanismo de ação dos antibióticos β -lactâmicos consiste em inibir a montagem das cadeias de peptidoglicano que formam a parede celular das bactérias, atuando então na inativação/inibição da síntese da parede celular bacteriana. São antibióticos comumente utilizados para o tratamento de infecções graves e infecções hospitalares (68).

Os antibióticos oximiino- β -lactâmicos compreendem a cefuroxima (cefalosporinas de 2ª geração), 3ª geração (cefotaxima e ceftazidima), 4ª geração (cefepime) e o monobactâmico (aztreonam) caracterizado por apresentar um radical oximiino ligado ao anel β -lactâmico, esse radical confere à molécula a capacidade de resistir aos mecanismos de resistência da bactéria como sejam alguns tipos de β -lactamases. São amplamente utilizados no tratamento de infecções graves em ambiente hospitalar (65,69).

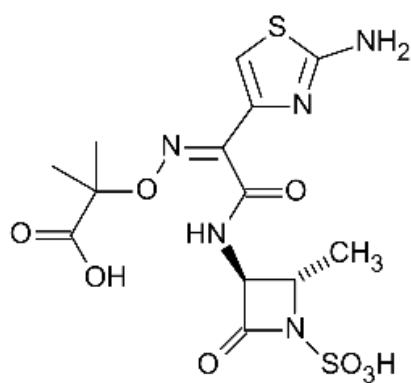
Figura 5: Estruturas químicas dos antibióticos



Cefuroxima



Cefepime

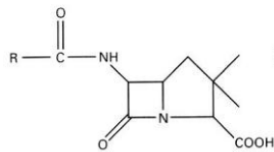


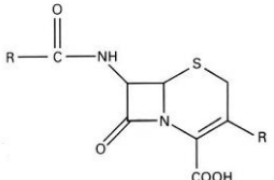
Aztreonam

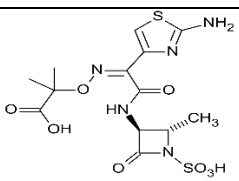
Fonte: (65,69)

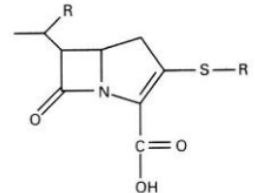
4.2.1 Principais classes de antibióticos β -lactâmicos

Tabela 1: Principais classes de antibióticos β -lactâmicos

Penicilinas				
Esta classe de antibióticos é utilizada no tratamento de pneumonias, sinusites, faringites, infecções cutâneas, meningites bacterianas, infecções do aparelho reprodutor, endocardites e profilaxias (64).				
Aminopenicilinas Ampicilina Amoxicilina	Benzilpenicilinas Penicilina G Penicilina V	Penicilinas resistentes às penicilinas Oxacilina Meticilina	Penicilinas de amplo espectro Ticarclina Piperacilina	

Cefalosporinas				
Subdividida em 5 categorias (70).				
1ª geração Alta atividade contra cocos Gram-positivos. Comumente utilizadas em infecções não complicadas de pele e de tecidos moles, provocadas habitualmente por <i>Staphylococcus</i> e <i>Streptococcus</i> . Cefalotina, Cefazolina, Cefalexina e Cefadroxila	2ª geração São ativas contra cocos Gram-positivos. Alguns bacilos Gram-negativos. cefoxitina, cefuroxima e cefaclor	3ª geração São mais potentes contra bacilos Gram-negativos têm elevada atividade antimicrobiana superior contra <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i> , ceftazidima, a cefotaxima e ceftriaxona	4ª geração Elavada ação a bactérias Gram-negativas, e apresentam atividade contra cocos gram-positivos e são resistentes às β -lactamases. cefepime	

Monobactâmicos	
Caracterizado por apresentar um radical oximino ligado ao anel β -lactâmico. Possui atividade bactericida e atua de forma similar as penicilinas e cefalosporinas, interferindo na síntese da parede bacteriana (70,71).	
Aztreonam Principal ação é a inibição de bactérias Gram-negativas. Utilizado em quadros de bacteremia, osteomielite e infecções da pele. Também utilizado principalmente para o tratamento de infecções do trato urinário, infecções pélvicas e infecções respiratória.	

Carbapenemos	
São antibióticos de última escolha por serem fármacos de amplo espectro e podem ser utilizados no tratamento de infecções causadas por organismos multirresistentes (71).	
Meropenemo, doripenemo, ertapenemo e imipenemo O meropenemo é comumente utilizado contra bactérias Gram-negativas, já o imipenemo apresenta atividade um pouco mais elevada contra Gram-positivos.	

4.3 β -lactamases

As β -lactamases são enzimas com características complexas encontradas no meio extracelular de bactérias Gram-positivas ou no espaço periplasmático de bactérias Gram-negativas. Seus genes podem variar conforme sua ação hidrolítica frente as diferentes classes de antibióticos β -lactâmicos (BL) e também de acordo com sua composição nucleotídica (72,73). Os genes codificadores dessas enzimas são encontrados no cromossoma bacteriano ou em plasmídeos, que muitas vezes permitem que estes sejam transferidos entre espécies. Os plasmídeos replicam-se de forma independente do cromossoma e podem ser transferidos por conjugação, de uma bactéria para outra. Além deste mecanismo de transferência, as bactérias também têm a capacidade de transferir seu material genético através da transdução e transformação (65).

As β -lactamases são classificadas com base molecular (classe A a D) e com base funcional e bioquímica (Grupo I a IV). A classificação com base molecular está voltada para a composição nucleotídica dos genes e seus aminoácidos. Já a classificação funcional está direcionada as características funcionais das enzimas (73,74). A tabela abaixo apresenta as diferentes classificações das β -lactamases de acordo com a sua classe molecular e seus respectivos substratos e sensibilidade aos inibidores das β -lactamases (74).

Tabela 2: Principais classes e grupos das β -lactamases

<u>Classes</u>	<u>Grupos</u>	<u>Função Hidrolítica</u>
A	II	Penicilinas e Cefalosporinas
B	III	Carbapenemos
C	I	Cefalosporinas
D	-	Penicilinas e Cloxacilina
-	IV	Penicilinas de <i>Pseudomonas estirpecia</i>

Fonte: (74)

Tabela 3: Classificação por grupo funcional e molecular das β -lactamases

<u>Classificação por grupo funcional</u>	<u>Classificação molecular</u>	<u>β-lactamases</u>
1	C	<i>Escherichia coli</i> , AmpC, P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1, DHA-1
1e	C	GC1, CMY-37, SRT-1
2a	A	PC1 e outras <i>Staphylococcus</i> penicilinas
2b	A	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	A	ESBLs: TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1, SFO-1
2br	A	IRTs: TEM-30, SHV-10, SHV-49
2ber	A	CMTs: TEM-50, TEM.68, TEM-121
2c	A	PSE-1, CARB-3
2ce	A	RTG-4
2d	D	OXA-1, OXA-10
2de	D	ESBLs: OXA-11, OXA-15, OXA-18
2df	D	OXA-23, OXA-48
2e	A	Estirpe
2f	A	KPC-2, GES-2, SME-1, IMI-1, NMC-A, OXA-40
3a	B1	IMP-1, NDM-1, VIM-1, CcrA, Bc-II, IND-1
	B3	L1, CAU-1, GOB-1, FEZ-1
3b	B3	CphA, Sfh-1

Fonte: (74)

As β -lactamases são enzimas capazes de hidrolisar o anel β -lactâmico de diferentes classes de antibióticos principalmente penicilinas e cefalosporinas. Essas enzimas possuem afinidades hidrolíticas que variam conforme seus genes codificadores, destacando-se entre elas as penicilinases, cefalosporinases (AmpC), ESBL e carbapenemases (71,75). Bactérias produtoras de β -lactamases podem ser encontradas na família das *Enterobacteriaceae*, *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria gonorrhoeae*, e em algumas bactérias anaeróbias (76).

Os principais tipos de β -lactamases são as do tipo CTX-M, TEM, SHV, OXA, KPC, CMY e as Metallo- β -lactamases (NDM, VIM e IMP). Há outros tipos de β -lactamases, mas estas são as mais comumente detetadas e algumas delas mantêm sua capacidade hidrolítica intacta como as CTX-M e as KPC. As outras podem variar essa capacidade como algumas TEM (TEM-1 e TEM-52) que são penicilinas e carbapenemases respectivamente, e outras OXA (73,74).

O principal mecanismo de resistência aos antibióticos β -lactâmicos é a produção de β -lactamases por parte dessas bactérias. As β -lactamases ao hidrolisarem o anel β -lactâmico dos BL acabam por inativá-lo impedindo que estes se liguem às proteínas de ligação à penicilina (PBPs) (74).

4.3.1 β -lactamases de espectro estendido (ESBL)

As *Extend Spectrum β -lactamases* (ESBL) que traduzido para o português, β -lactamases de espectro alargado recebem essa denominação por possuírem a capacidade de hidrolisar o anel β -lactâmico presente nos antibióticos oximiino- β -lactâmicos como as cefalosporinas de terceira, quarta e quinta geração e o aztreonam, inibindo a atuação destes fármacos. Os principais inibidores de β -lactamase são o tazobactam, sulbactam e o mais conhecido e utilizado é o ácido clavulânico. Esses fármacos possuem a estrutura molecular semelhante a penicilina, mas sua cadeia lateral é modificada tornando-se bloqueadores de β -lactamases e com isso promovendo sua inibição (77,78). As ESBL conferem resistência às penicilinas, cefalosporinas e aos monobactams e não atuam sobre os carbapenems e cefamicinas (78,79).

Os principais tipos de ESBL são das famílias CTX-M, TEM e SHV. São os mais presentes no meio ambiente e ambiente hospitalar (77,78). Além do aumento da resistência aos antibióticos, há também o aumento da disseminação de isolados produtores de ESBL principalmente da família CTX-M que contribui para essa resistência. Esses isolados são caracterizados por possuírem grande capacidade de hidrolisar a cefotaxima quando comparado com a ceftazidima e foram encontrados em bactérias como *Klebsiella pneumoniae* e atualmente mais frequentemente em *E. coli*. As ESBLs do tipo CTX-M causam grande preocupação na comunidade científica, uma vez que estão associadas a clones multirresistentes de *Enterobacteriaceae* (80,81). As β -lactamases CTX-M-15 e CTX-M-14 são as mais frequentes e associadas a clones de *E. coli*. Há evidências científicas que comprovam que esse aumento de resistência também se dá devido a propagação de um clone específico da *E. coli*, *E. coli* ST 131

(62,81). Muitos autores esmiúçam as características intrínsecas desse clone, de modo a encontrar fundamentos que ratifiquem o sucesso da atuação dele, tanto para dados epidemiológicos quanto microbiológicos (62,82,83).

As bactérias produtoras de ESBL podem ser detetadas laboratorialmente através da presença do sinergismo característico das ESBL. Caso esse sinergismo não seja visivelmente observado, pode-se realizar o teste utilizando um disco contendo antibióticos oximino- β -lactâmicos principalmente cefotaxima ou ceftazidima acrescido de ácido clavulânico e compará-lo com um disco contendo apenas um antibiótico oximino- β -lactâmico (cefotaxima ou ceftazidima). Se for detetada a presença de um aumento do halo de inibição maior de 5mm, conforme os padrões do EUCAST, o resultado é considerado positivo para produtoras de ESBL (84,85).

4.3.2 β -lactamases tipo AmpC

Quando se trata das β -lactamases do tipo AmpC, essas hidrolisam as penicilinas, e as cefalosporinas até a terceira geração, exceto o cefepime, que é uma cefalosporina de quarta geração que possui mais estabilidade frente as AmpCs e não são inibidas pelos inibidores de β -lactamases. As β -lactamases AmpC são codificadas por genes de origem cromossômica denominados AmpC: *bla*_{CMY}, *bla*_{ACT}, *bla*_{LAT}, *bla*_{MIR}, *bla*_{FOX}, *bla*_{MOX}, *bla*_{DHA}, *bla*_{ACC}, *bla*_{BIL}. O grupo de bactérias que possuem a característica de produtoras de AmpC é conhecido pela mnemônica MYSPACE (*Morganella*, *Yersinia*, *Proteus*, *Providencia*, *Aeromonas*, *Citrobacter* e *Enterobacter*), que quando expostas aos fármacos das classes acima citadas, podem produzir a enzima e evidenciar resistência a esses antibióticos (79).

As β -lactamases do tipo AmpC têm por característica ser cromossômica em algumas espécies de bactérias como em *Enterobacter* spp., *Citrobacter freundii*, *Morganella morganii*, *Providencia stuartii*, *Providencia rettgeri*, *Pseudomonas aeruginosa*. Estas enzimas podem ser produzidas tanto por genes cromossômicos ou plasmídicos. Os genes AmpC plasmídicos provêm dos genes cromossômicos de diferentes espécies da família *Enterobacteriaceae* que foram mobilizados para plasmídeos facilitando a disseminação (86). Estão localizados em integrrões de classe I em plasmídeos os quais determinam a resistência a outros antibióticos como as quinolonas, aminoglicosídeos e cloranfenicol. Estes genes disseminam-se rapidamente através de transmissão horizontal e as estirpes produtoras de AmpC plasmídica são

multirresistentes e encontram-se difundidas tanto em meio hospitalar como também no meio ambiente (74).

4.3.3 Carbapenemases

Enterobacteriaceae produtoras de carbapenemase (CPE) atualmente são encontradas frequentemente em ambientes hospitalares e na comunidade espalhadas por todo mundo (38). *Klebsiella pneumoniae* produtora de KPC foi a primeira a surgir e a se difundir mundialmente, se tornando endêmica em países como Israel, Grécia, Itália e Estados Unidos (43,87). Recentemente, estudos evidenciaram que a *Enterobacteriaceae* produtora de NDM e *Klebsiella pneumoniae* produtora de OXA-48 estão sendo disseminadas no Sul da Ásia e no Norte da África, respectivamente. Os isolados que as produzem geralmente são resistentes a todos os β -lactâmicos, incluindo carbapenemos e outras classes (67,85).

As carbapenemases são enzimas que conferem resistência aos antibióticos carbapenemos e estão presentes em bactérias Gram-negativas. Podem ser subdivididas em carbapenemases de classe A, Metallo- β -lactamases (NDM) e Oxacilinas de classe D (OXA) (38,88,89). As carbapenemases de classe A são enzimas como a KPC, NMC e SME, que são consideradas serino-carbapenemases, que têm por característica hidrolisar diversos antibióticos, incluindo carbapenemos, penicilinas, ceflasporinas e o aztreonam. A KPC é a principal carbapenemase presente nesse grupo, além de possuir uma alta capacidade de disseminação devido aos seus componentes móveis de resistência e localização plasmídica, têm a capacidade de hidrolisar não somente o meropenemo como o imipenemo (59,67,90,91).

A Metallo- β -lactamase (NDM) é conhecida nominalmente como metallo- β -lactamase de Nova Delhi. É uma β -lactamase classe B, capaz de hidrolisar penicilinas, cefalosporinas e carbapenemos mas não hidrolisa monobactâmicos como o aztreonam. Recebe esse nome pois sua primeira aparição foi em bactérias como *K. pneumoniae* e *E. coli* produtoras de NDM em um paciente indiano hospitalizado por infecção de ferida que obteve em Nova Delhi em 2008 (38,92). Atualmente as subclasses de genes mais conhecidas das M β Ls são: IMP, VIM, SPM, e GIM, sendo IMP e VIM as mais frequentemente encontradas globalmente, especialmente em bactérias pertencentes à família das *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonas aeruginosa*. As M β L adquiridas são codificadas por genes localizados em integroes que podem estar no cromossoma, plasmídeos ou transposões (92,93).

As oxacilinases de classe D são um grupo bastante diverso de β -lactamases que conferem resistência às cefalosporinas, monobactams, penicilinas e carbapenemos, sendo que apenas algumas delas possuem a capacidade de hidrolisar carbapenemos. Dentre as *Enterobacteriaceae*, o gene OXA-48 é um dos principais identificado em *Klebsiella pneumoniae* com elevada ação contra os carbapenemos (38). O gene OXA-48 é geralmente codificado num plasmídeo e pode se disseminar para outras espécies de *Enterobacteriaceae*, freqüentemente também produz uma β -lactamase de espectro alargado. Esses isolados são resistentes a todos os β -lactâmicos, incluindo as cefalosporinas (94,95).

4.4 Antibióticos não β -lactâmicos

Os antibióticos não β -lactâmicos apesar de em sua maioria serem utilizados como segunda escolha para tratamento, possuem tanta relevância quanto os β -lactâmicos. No que concerne as *Enterobacteriaceae*, há diversas classes de antibióticos não β -lactâmicos utilizadas na terapêutica contra bactérias pertencentes a essa família, como por exemplo as fluoroquinolonas (ciprofloxacina e levofloxacina), tetracilinas, fenicóis (cloranfenicol), ácidos fosfônicos (fosfomicina), aminoglicosídeos (fosfomicina, netilmicina, gentamicina), sulfonamidas (sulfametoxazol) e nitrofuranos (nitrofurantoína) (96).

As fluoroquinolonas são a principal classe de antibióticos não β -lactâmicos escolhida para tratamento principalmente quando há resistência aos antibióticos β -lactâmicos. Isso se dá devido ao amplo espectro de ação desse grupo e sua baixa toxicidade (97). Em casos em que há presença de bactérias multirresistentes (MDR), ou seja, bactérias resistentes a diversas classes de antibióticos, sejam eles β -lactâmicos ou não β -lactâmicos, isso acaba tornando difícil a escolha de outras vias de tratamento. Os aminoglicosídeos se tornaram então a segunda alternativa para terapêutica em quadro de infecção por bactérias MDR, apesar dessa classe apresentar uma taxa de toxicidade mais elevada (97).

Em paralelo as fluoroquinolonas (levofloxacina e a ciprofloxacina), que são bastante utilizadas no tratamento de infecções do trato urinário, a fosfomicina também aparece como sendo uma alternativa para infecções urinárias recorrentes (98,99). Outras classes como sulfonamidas, fenicóis e as tetracilinas não são tão indicadas para tratamento de infecções por bactérias da família da *Enterobacteriaceae* (98).

4.5 Disseminação das β -lactamases nas bactérias da família *Enterobacteriaceae*

As *Enterobacteriaceae* têm a capacidade de apresentar resistência aos antibióticos, ou até mesmo adquirir essa capacidade ao longo do tempo. Elementos genéticos móveis são arcabouços genéticos da bactéria que transitam entre ambientes genéticos conferindo características adicionais às bactérias que os instalam. Os principais exemplos de elementos genéticos móveis são plasmídeos, transposões e integrões (100,101).

Os plasmídeos são elementos genéticos móveis constituídos por DNA extracromossômico, podendo ser circular ou linear, com capacidade de replicação autônoma e transferência horizontal de genes de resistência aos antimicrobianos entre bactérias seja ela da mesma espécie ou de espécies diferentes (102).

Os transposões são elementos genéticos móveis constituídos por DNA com habilidade de replicação e inserção no genoma. Através da transposição, realiza-se a transferência de segmentos, no cromossoma ou em plasmídeos (103).

Os integrões são elementos genéticos não transmissíveis com capacidade de integrar vários genes de resistência aos antibióticos, podendo estar associados a transposões, ao plasmídeos e ao cromossoma (103).

5 Marcador epidemiológico e ecológico

5.1 Bactérias multirresistentes no meio ambiente: marcador epidemiológico e ecológico

Uma das principais bactérias encontradas no meio ambiente é *E. coli* e é considerada um dos mais importantes indicadores de contaminação fecal. Esse microrganismo é utilizado para avaliar a qualidade de produtos, bem como água e alimentos (104).

Além de estar presente na flora intestinal humana, também é detectada em alimentos e águas, o que a torna indicador de contaminação fecal nesses componentes devido a contacto com fezes. Para ser considerada como indicador de contaminação fecal, a mesma deve atender a alguns desses requisitos como apresentar-se em grande concentração em fezes humanas, ou em outros animais, em efluentes de águas residuais e ser exclusivamente de origem fecal (17,105).

Tendo em vista esse contexto, *E. coli* assim como outras bactérias multirresistentes que são encontradas em águas fluviais, possuem tamanha importância não somente no âmbito da saúde pública mas também no meio ambiente, uma vez que a presença delas podem constituir além de um indicador de contaminação fecal, no caso da *E. coli*, um marcador epidemiológico e ecológico, já que esta pode ser encontrada via águas residuais descartadas na natureza. Uma vez evidenciada em águas de rios e mares, isso justifica uma investigação mais aprofundada da origem da estirpe, o que aponta para um cenário de colonização intestinal da população (17).

Diante dessas circunstâncias, a contaminação de águas e alimentos, afeta inteiramente a saúde humana gerando transtornos e doenças graves (106). Para alguns autores, e principalmente para a Organização Mundial de Saúde (OMS) a recorrência de doenças entéricas é evidenciada pela presença de *E. coli* em produtos de consumo como água e alimentos. Além de ser considerada uma bactéria endêmica, o aumento de surtos diarreicos causados por ela identificados mundialmente, leva a que seja necessário um maior controlo epidemiológico (105).

As estirpes patogénicas de *E. coli* são consideradas um dos principais agentes causadores de doenças entéricas em grandes territórios no mundo, como países na Europa e América do Norte. Algumas características epidemiológicas da infeção por esse microrganismo vêm sendo elucidadas e identificados os principais meios de contaminação e via de infeção humana (17,105).

A análise e caracterização de marcadores epidemiológicos têm se tornado um método bastante útil na tipagem desse microrganismo para estudos epidemiológicos de

surtos. Através de diferentes métodos de tipificação de alta sensibilidade e especificidade, pode-se analisar as diferentes relações de patogenicidade que o microrganismo pode causar ao indivíduo além da vantagem de permitir o rastreamento da estirpe epidêmica (106,107).

O desenvolvimento de bactérias dá-se no organismo de humanos e animais, e muitas vezes é eliminado no meio ambiente através das fezes e efluentes de águas residuais. Esse percurso até sua excreção fisiológica tem causado grandes transtornos para saúde pública, uma vez que a presença de bactérias em águas e alimentos contaminados é considerada como indicador de contaminação, interferindo diretamente na manutenção do ecossistema (45). Diversos estudos relataram que algumas estirpes específicas de *E. coli* podem sobreviver e reproduzir por um longo período em ambientes extraintestinais, o que converge para uma maior relevância na análise dessa bactéria como marcador ecológico (108).

Diversos fatores ambientais como temperatura, disponibilidade de água, pH, radiação solar, a relação da *E. coli* com outras bactérias, e aptidão de se formar biofilme, facilitam a propagação, o crescimento e manutenção da bactéria viva no meio ambiente (45).

Anteriormente acreditava-se que não fosse possível que algumas bactérias sobrevivessem a ambientes extraintestinais, mas diferentes estudos analisaram os casos de surtos entre as estirpes de *E. coli* e comprovaram que as mesmas podem crescer e sobreviver em ambientes naturais e influenciar a qualidade da água e de alimentos, já que podem permanecer nas fezes e nas superfícies de alimentos (109,110).

É importante ressaltar a relação que *E. coli* possui com a resistência aos antibióticos, já que se encontra frequentemente no trato gastrointestinal (TGI), e estes antibióticos já são comumente utilizados para o tratamento das infecções. Diferentes grupos filogenéticos de *E. coli* apresentaram diferentes graus de resistência aos antibióticos e, que em ambientes naturais como solo e água, têm-se revelado como reservatórios da bactéria (111–113).

Diante desse quadro, e diversos estudos apontarem a presença de bactérias multirresistente encontradas no meio ambiente, tornou-se necessário a utilização de ferramentas, como marcadores ecológicos, uma vez que indicam possíveis riscos à saúde pública (112,113).

II. Objetivos

1. Objetivo Geral

- Analisar e caracterizar a presença de *Enterobacteriaceae* produtoras de β -lactamases de espectro alargado (ESBL), produtoras de AmpC e carbapenemases nas águas do Rio Douro.

2. Objetivos Específicos

- Selecionar bactérias fermentadoras de lactose que cresceram a partir das amostras de água em meios seletivos contendo antibióticos;
- Avaliar o perfil de suscetibilidade aos antibióticos β -lactâmicos e não β -lactâmicos dos isolados selecionados nos meios;
- Identificar a presença de ESBL, AmpC e carbapenemases com base em técnicas fenotípicas e análises bioquímicas;
- Caracterizar as β -lactamases através de metodologia molecular (PCR).
- Analisar a capacidade de transferência dos mecanismos de resistência em *Enterobacteriaceae* por ensaio de conjugação.

III. Metodologia

1. Local das Amostras de Água

As amostras de água foram colhidas à margem do Rio Douro em dez pontos específicos com prévio indícios de contaminação pontual. Esses pontos foram identificados no mapa e depois anotados em uma planilha conforme descrito abaixo na *Tabela 4*. As águas foram colhidas em frascos estéreis de 500mL e armazenadas em frigorífico por não mais de 24hrs para posterior filtração.

Figura 6: Mapeamento dos pontos de colheita de água



Fonte: Adaptada de imagem de google earth

Tabela 4: Pontos de colheita de Água do Rio Douro

Localização	Identificação das Amostras	Freguesia	Data
Ribeira do Porto 1	1P	Porto	21/11/2020
Ribeira do Porto 2	2	Porto	09/01/2021
Cais de Gaia 1	1G	Gaia	21/11/2020
Cais de Gaia 2	2G	Gaia	21/11/2020
Cais Cruzeiro de Gaia	1	Gaia	17/01/2021
			03/02/2021
			18/02/2021
			04/03/2021
			19/03/2021
Capela Farol de S. Miguel o Anjo	1A	Porto (FOZ)	09/01/2021
ETAR	1B	Porto (FOZ)	09/01/2021
Ribeira da Granja	3	Porto (FOZ)	09/01/2021
Reserva Natural Estuário do Douro	4	Gaia	17/01/2021
Marina do Douro	5	Gaia	17/01/2021

2. Preparação dos meios de cultura

Os meios de cultura têm um papel fundamental para análise e identificação de microrganismos. Para este trabalho foram utilizados os meios: Agar MacConkey que é caracterizado por ser um meio seletivo e diferencial. Seletivo pois permite o crescimento de alguns microrganismos (bactérias Gram-negativas) e inibição de outros, e diferencial por distinguir o crescimento de bactérias Gram-negativas fermentadoras ou não de lactose.

Agar Mueller Hinton, meio de cultura utilizado para realização de testes de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA); Agar UTI, caracterizado por ser um meio cromogénico utilizado para identificação presuntiva dos principais microrganismos capazes de gerar infeção no trato urinário. Esses meios de cultura foram preparados de acordo com a concentração e pesagem necessária para o crescimento das unidades formadoras de colónia (UFC) conforme apresentado abaixo. Todos os meios foram preparados do mesmo modo: pesou-se a quantidade do pó em gramas dos respectivos meios com auxílio de um matraz de 500mL em uma balança analítica. Após a pesagem

foi adicionado previamente 400mL de água destilada e posterior aquecimento da mistura em microondas. Após aquecidos e com característica límpida, os meios foram autoclavados, deixados em banho até 50°C para o arrefecimento e posteriormente plaqueados e armazenados a temperatura ambiente. Para o Meio de Agar MacConkey foram introduzidos os antibióticos: Ampicilina, Cefotaxima e Meropenemo, após o arrefecimento com o auxílio de uma micropipeta. Esses antibióticos foram inoculados no meio para avaliar o possível crescimento de colônias na presença dos mesmos. Para cada meio preparado foi realizado o controlo de qualidade utilizando a estirpe de *E. coli* da ATCC (25922) (*American Type Culture Collection*).

Tabela 5: Preparação dos meios de cultura

Meio de Cultura	Concentração (g/mL) (μL)
Agar MacConkey	20,6g --- 400mL H ₂ O destilada
Agar Mueller Hinton	15,2g --- 400mL H ₂ O destilada
UTI	12,98g --- 400mL H ₂ O destilada
Agar MacConkey + Ampicilina	100μg/mL (400μL)
Agar MacConkey + Cefotaxima	2μg/mL (80μL)
Agar MacConkey + Meropenemo (inicialmente)	2μg/mL (80μL)
Agar MacConkey + Meropenemo	0,5μg/mL (20μL)

Fonte: Autor

3. Filtração das Amostras e Incubação

As amostras foram filtradas utilizando um sistema de bomba de filtração a vácuo, utilizando um filtro de aço inoxidável e uma membrana filtrante de acetato de celulose com porosidade 0,2μm. O volume total a ser filtrado por cada amostra inicialmente foi de 400mL, sendo 100mL para a placa contendo Agar MacConkey (utilizado como controle de crescimento); 100mL para Agar MacConkey + Ampicilina; 100mL Agar MacConkey + Cefotaxima; 100mL Agar MacConkey + Meropenemo. Ao longo da análise, a placa contendo Agar MacConkey + Ampicilina foi descartada, uma vez que o crescimento nos outros antibióticos se tornou mais relevante para o estudo, reduzindo-se assim o volume de amostra para 300mL. Após a filtração, cada membrana filtrante foi colocada nos respectivos meios de cultura conforme a figura abaixo e incubada em estufa por 24hrs a uma temperatura de 37°C.

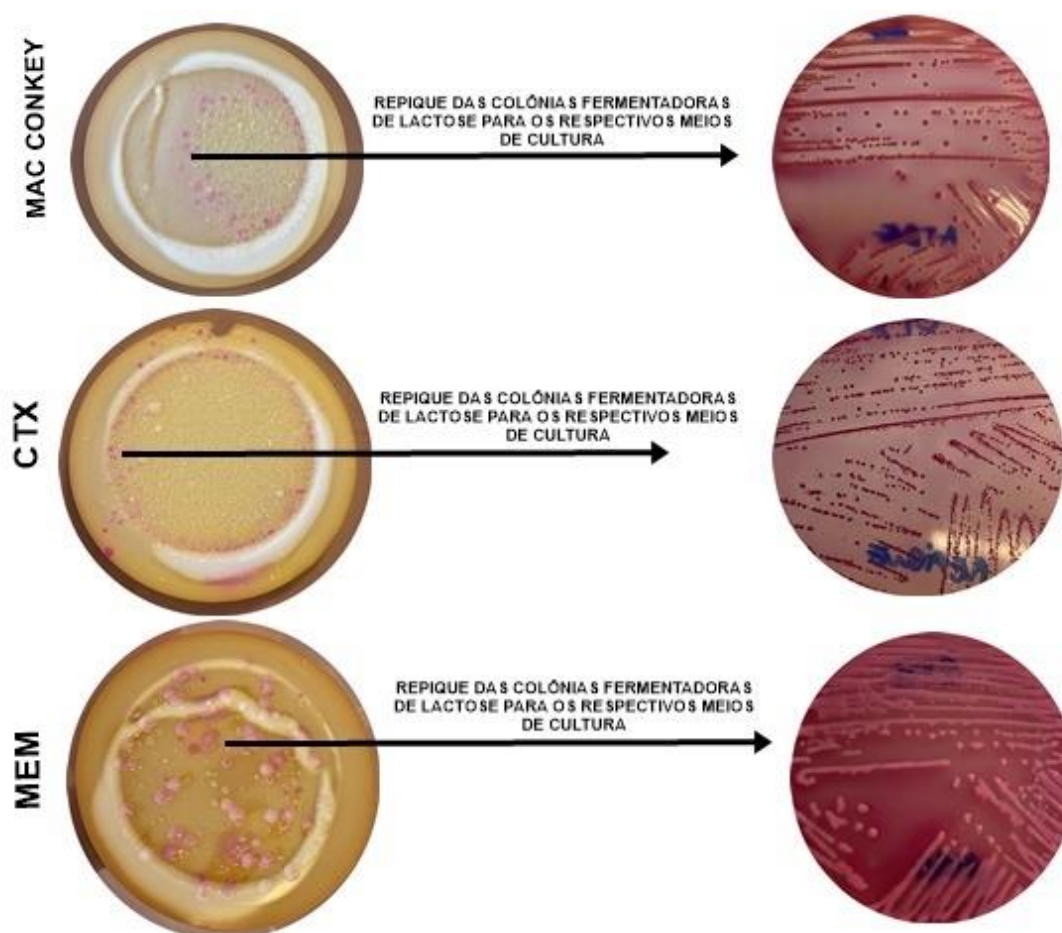
Figura 7: Inoculação da membrana filtrante nas placas contendo meio cultura



4. Obtenção dos Isolados das Amostras

Após 24hrs de incubação, as placas contendo a membrana filtrante foram retiradas da estufa e analisadas quanto ao crescimento de colônias. As unidades formadoras de colônia (UFC) foram separadas e avaliadas consoante suas características morfológicas e semeadas para outras placas com o auxílio de ansas de inoculação de plástico estéreis de calibre de 1 μ l. Foram selecionadas aleatoriamente e repicadas aquelas que possuíam características de uma bactéria fermentadora de lactose independentemente da sua textura seca ou mucóide, mas que apresentassem em sua coloração um tom rosado particular de uma fermentadora conforme apresentado na *figura 8*.

Figura 8: Crescimento das colônias na membrana filtrante e repicagem de colônias fermentadoras de lactose



O número de isolados na repicagem variou conforme a quantidade de colônias apresentadas na membrana filtrante de cada amostra, como mostra a *figura 9* abaixo, e cada um dos isolados foram nomeados em ordem crescente do alfabeto.

Figura 9: Seleção aleatória das colônias fermentadoras de lactose na membrana filtrante para posterior repicagem em meio respectivo ao seu crescimento



Cada uma das novas placas foram incubadas em estufa a 37°C no período de 24hr para a obtenção do crescimento de novas colônias em cultura pura, de modo a facilitar a diferenciação e identificação.

5. Antibiograma dos Isolados

Cada amostra originou um determinado número de colônias isoladas como mostra a *Tabela 6* abaixo. Para cada um desses isolados foi realizado o teste de suscetibilidade aos antimicrobianos de acordo com os padrões EUCAST (114,115).

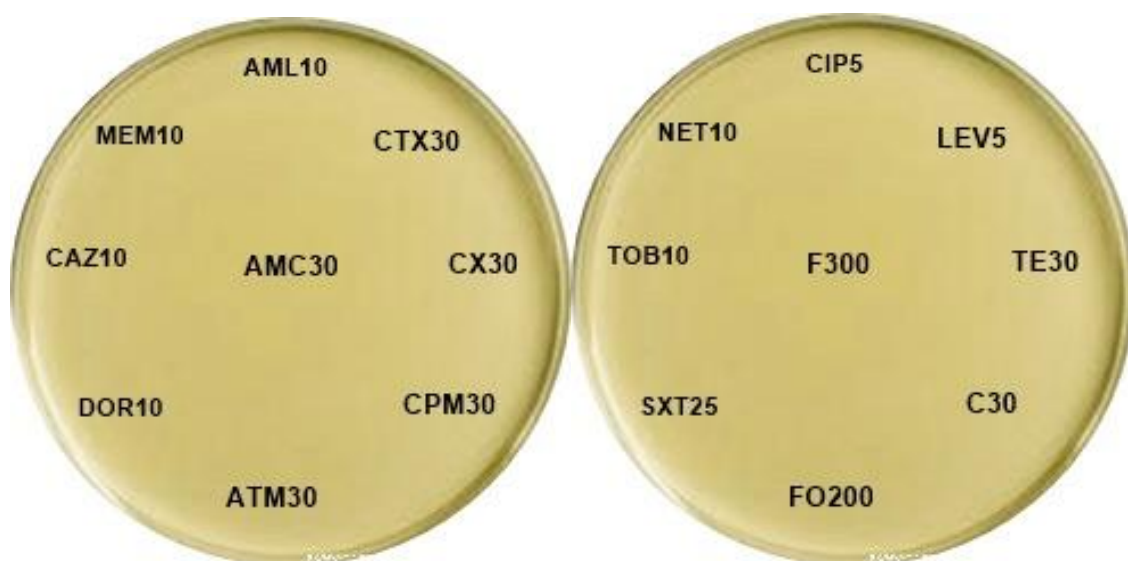
Tabela 6: Número de isolados por amostras

Localização	Identificação das Amostras	Isolados
Ribeira do Porto 1	1P	10
Ribeira do Porto 2	2P	2
Cais de Gaia 1	1G	10
Cais de Gaia 2	2G	7
Cais Cruzeiro de Gaia	1	47
Capela Farol de S. Miguel	1A	3
ETAR	1B	2
Ribeira da Granja	3	2
Reserva Natural Estuário do Douro	4	3
Marina do Douro	5	6
Total		92

Para o teste de suscetibilidade foi necessário realizar para cada um dos isolados uma suspensão bacteriana em um tubo de ensaio contendo aproximadamente 2mL de solução de soro fisiológico e de duas a três colónias distanciadas de cada um dos isolados. A quantidade de soro e de colónias variaram consoante o grau de turbidez especificado na literatura correlacionado com o valor de *McFarland*. Caso o valor fosse baixo adicionou-se um número maior de colónias, caso o valor ultrapasse o permitido adicionou-se maior quantidade de soro.

Após realizada a suspensão de cada isolado e com o auxílio de *swabs*, os mesmos foram mergulhados em cada um dos tubos contendo a suspensão e inoculados em duplicado para placas contendo o meio Agar Mueller Hinton. A disposição dos discos de antimicrobianos foi realizada manualmente e conforme à deteção de sinergismo entre cada um deles como mostra a *figura 10* abaixo.

Figura 10: Disposição dos discos nas placas de antibiograma



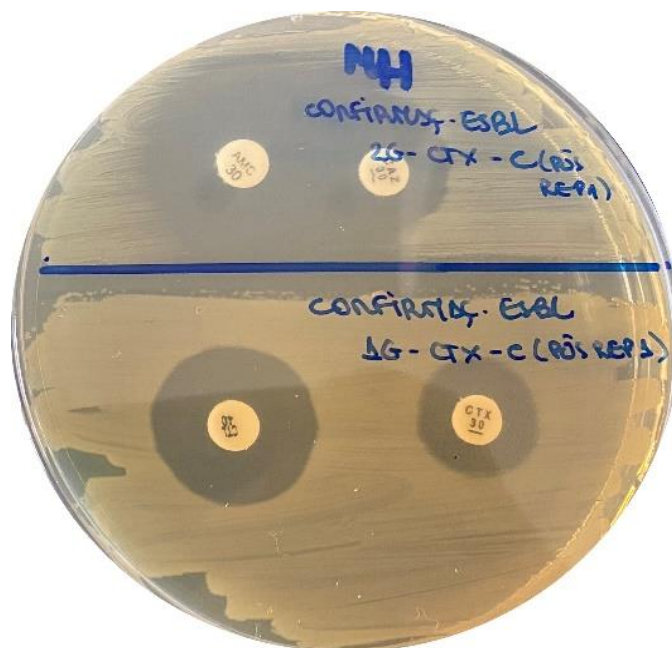
Legenda: AML10: Amoxicilina 10 μ ; MEM10: Meropenemo 10 μ ; CAZ10: Ceftazidima 10 μ ; DOR10: Doripenemo 10 μ ; ATM30: Aztreonam 30 μ ; CPM30: Cefepime 30 μ ; CX30: Cefoxitina 30 μ ; CTX30: Cefotaxima 30 μ ; AMC30: Amoxicilina + clavulanato 30 μ ; CIP5: Ciprofloxacina 5 μ ; NET10: Netilmicina 10 μ ; TOB10: Tobramicina 10 μ ; SXT25: Sulfametoxazol+trimetoprima 25 μ ; FO200: Fosfomicina 200 μ ; C30: Cloranfenicol 30 μ ; TE30: Tetraciclina 30 μ ; LEV5: Levofloxacina 5 μ ; F300: Nanofurantoína 300 μ .

6. Classificação dos Isolados e Testes de Confirmação

Após cada isolado ser semeado nas placas do antibiograma, a análise da suscetibilidade foi realizada visualmente de acordo com o método de difusão avaliando o sinergismo (DDST) entre eles e o crescimento bacteriano ao redor. Cada halo de inibição de crescimento foi medido e classificado conforme os padrões EUCAST (114).

Os inóculos com suspeita de serem bactérias produtoras de β -lactamase de espectro alargado (ESBL) foram confirmados através do método de difusão de disco com inibidor utilizando os discos de cefotaxima (CTX₃₀) e disco cefotaxima + ácido clavulânico (CTL₄₀) ou ceftazidima (CAZ₃₀) e Amoxicilina + ácido clavulânico (AMC₃₀).

Figura 11: Teste de confirmação para inóculos com suspeita de serem bactérias produtoras de β -lactamase de espectro alargado



Legenda: Teste de confirmação através do método de difusão de disco com inibidor utilizando disco ceftazidima (CAZ₃₀) e Amoxicilina + ácido clavulânico (AMC₃₀) e embaixo cefotaxima (CTX₃₀) e disco cefotaxima + ácido clavulânico (CTL₄₀).

Para os inóculos com suspeita de serem produtores de AmpC, também foram confirmados através de DDST utilizando a cefoxitina (CX₃₀) e cefoxitina + cloxacilina (FOC₂₃₀).

Figura 12: Teste de confirmação para inóculos com suspeita de serem bactérias produtoras de AmpC



Legenda: Teste de confirmação através do método de difusão de disco com inibidor utilizando disco cefoxitina (CX₃₀) e cefoxitina + cloxacilina (FOC₂₃₀)

A confirmação foi feita de acordo com a diferença de tamanho entre os halos de inibição ao redor de cada um dos discos. Com base nos guidelines EUCAST se a diferença de tamanho entre os halos de cefoxitina (CX₃₀) e de cefoxitina + cloxacilina (FOC₂₃₀) for menor que 5mm não se considera uma produtora de AmpC, caso a diferença seja maior que 5mm, considera uma produtora de AmpC. O mesmo procedimento foi utilizado para a avaliação dos isolados suspeitos de produtores de ESBLs com os discos de cefotaxima (CTX₃₀) e cefotaxima + ácido clavulânico (CTL₄₀).

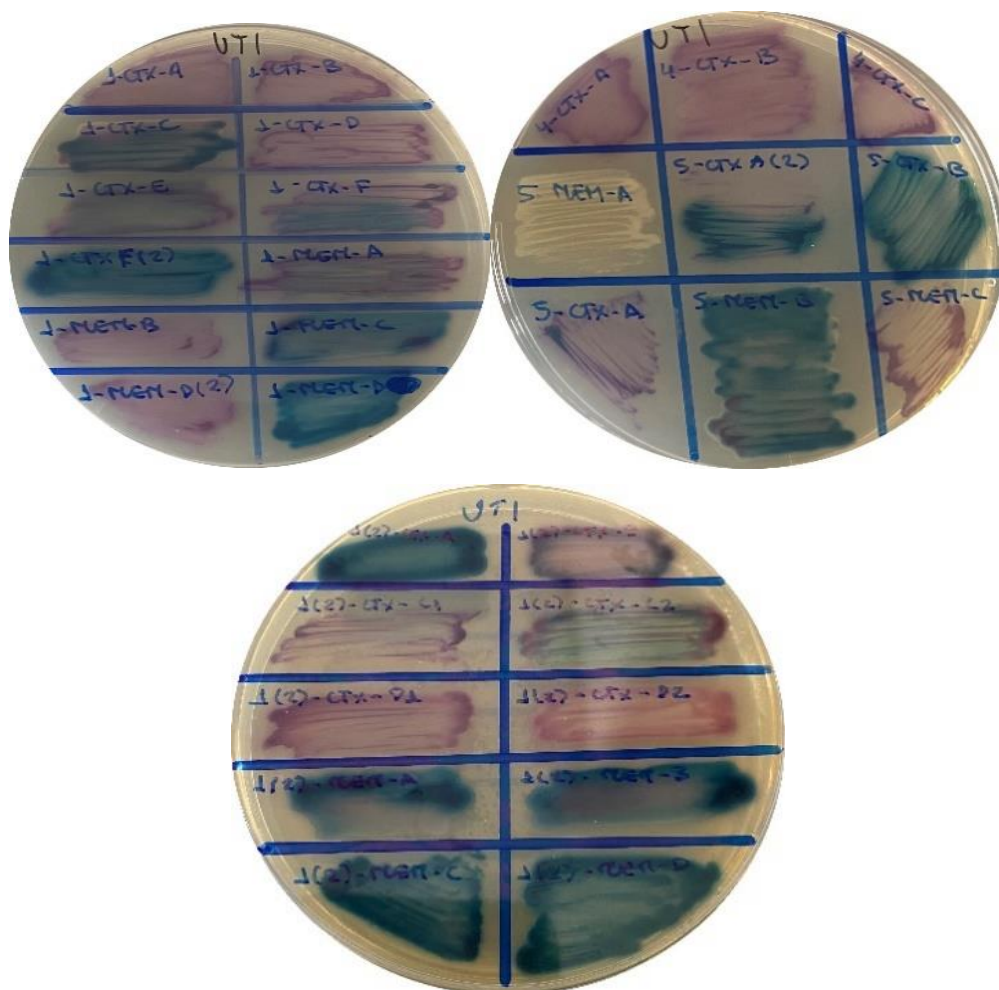
7. Identificação presuntiva de bactérias em meio cromogénico UTI Agar

Com auxílio de uma ansa de plástico, cada colônia presente em cada isolado foi semeada para um placa contendo o meio UTI Agar e mantida durante 24hr em estufa a temperatura de 37°C. Após a incubação foi realizada a identificação presuntiva de cada bactéria conforme sua característica fenotípica.

Aquelas que apresentaram no meio UTI coloração rosa foi caracterizada presuntivamente como *E. coli* complementando posteriormente com o teste de indol. As que apresentaram coloração azul foram classificadas como sendo do grupo KESC (*Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* e *Citrobacter*) inicialmente e depois analisadas com

a galeria de identificação API 20E. Só não foram analisadas para esse estudo, as que apresentaram coloração branca/amarela.

Figura 13: Teste de Identificação presuntiva de bactérias em meio cromogénico UTI Agar



Legenda: cor rosa: resultado presuntivo de *E. coli*; cor azul: classificadas como sendo KESC (*Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* e *Citrobacter*); cor branca/amarela: isolado não utilizado; mistura de cores: repetição do teste para esse isolado

8. Teste CIM

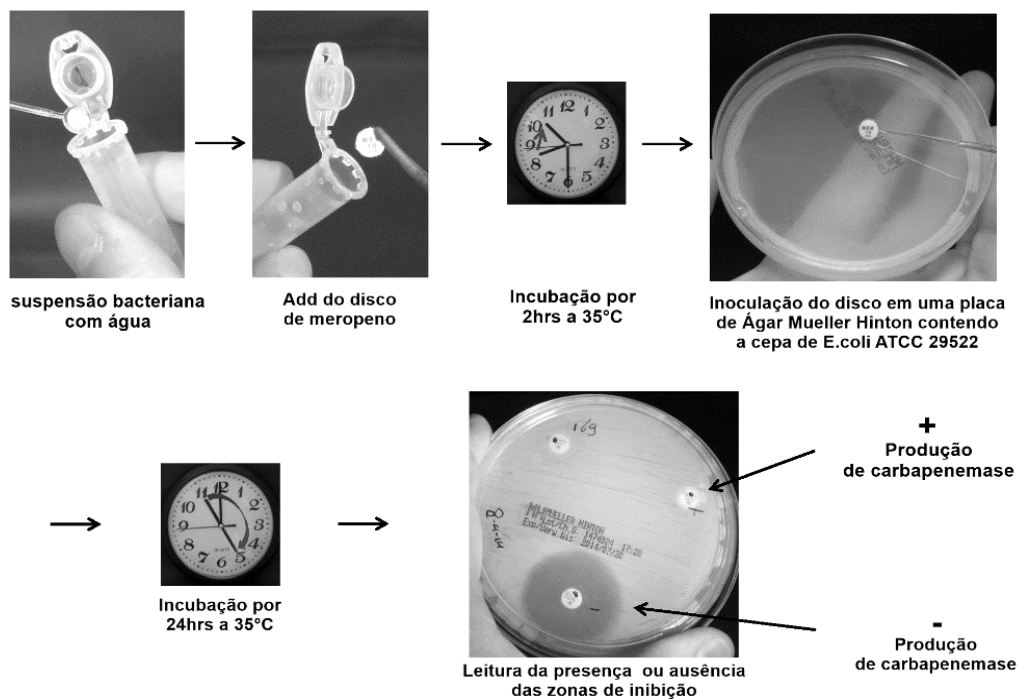
Para a realização do *Carbapenem Inactivation Method* (CIM) foi feita uma suspensão com auxílio de uma ansa de cultura de 10µl de inoculação, retirada de uma placa de Mueller-Hinton e imersa em 400µl de água destilada em um tubo de ensaio. Posteriormente foi inserido dentro dessa suspensão um disco de teste de suscetibilidade contendo 10µg de meropenemo e incubado por um mínimo de duas horas a 35°C.

Após a incubação, o disco foi removido da suspensão usando uma ansa de inoculação e colocado em uma placa de Agar Mueller-Hinton inoculada com uma estirpe

indicadora de *E. coli* suscetível (ATCC 29522) e subsequentemente incubada a 35°C por 24hrs. A inoculação da placa de Agar Mueller-Hinton com a estirpe indicadora ATCC foi feita com uma suspensão num valor de 0,5 na escala de *McFarland* espalhada em três direções usando um *swab* estéril.

Para os isolados bacterianos que produziram carbapenemase foi observado o crescimento da estirpe indicadora suscetível ao redor do disco, uma vez que o disco de meropenemo foi inativado permitindo o crescimento. Já aqueles isolados que não continham carbapenemase, produziram uma zona de inibição clara.

Figura 14: Procedimento para o teste CIM



Fonte: Adaptada a referência (116).

9. Teste SIM

O teste de mobilidade foi realizado para todos os isolados identificados no grupo KESC e que foram analisados previamente com a galeria de identificação API 20E.

Com o auxílio de um fio de inoculação, cada colônia analisada foi tocada e inoculada por picada até uma distância de 1cm do fundo do tubo que continha o meio Agar SIM já pronto.

Todos os inóculos foram incubados em estufa bacteriológica entre 35 °C a 37°C por 24h. Com a picada em linha reta foi possível observar se a bactéria inoculada era imóvel ou não, auxiliando e complementando a identificação da bactéria.

Figura 15: Figura ilustrativa do teste de mobilidade



10. Galeria para identificação de bactérias (API 20E)

Após a identificação presuntiva dos isolados por meio da análise do UTI, aqueles que apresentavam características fenotípicas do grupo KESC foram separados para realização de identificação API20E conforme a instrução de uso da *Biomérieux*.

Inicialmente foi preparado o inóculo com 5mL de soro fisiológico num tubo de ensaio estéril. Com um ansa bacteriológica foi colhida uma única colônia isolada em

meio Agar Mac Conkey preparada recentemente. Após a homogeneização da suspensão previamente preparada, a mesma foi introduzida em cada tubo da galeria, utilizando a mesma pipeta de modo a evitar a formação de bolhas no fundo. Para os testes: CIT (citrato), VP (piruvato sódico) e GEL (gelatina), conforme descrito na instrução, foi enchido todo o tubo e a cúpula com a suspensão. Para os teste de ADH (L-Arginina), LDC (L-Lisina), ODC (L-Ornitina), H₂S (Tiosulfato sódico) e URE (Uréia), encheu-se apenas os tubos e criou-se uma anerobiose enchendo a cúpula com óleo de parafina estéril.

A leitura foi realizada após 24hrs de incubação de cada uma das galerias, e para algumas delas foram necessárias a utilização de reagentes, como por exemplo para o teste de Indol em que se utilizou o reagente de Erlich, que ao configurar uma coloração rosa, indicou uma reação positiva. Para o teste de VP, utilizou-se os reagentes VP1 e VP2 e a coloração rosa após 10 minutos, indicou uma reação positiva. Também foi utilizado para reação de redução dos nitratos em nitritos e em azoto, os reagentes NIT1 e NIT2, na qual uma coloração vermelha, indicou reação positiva.

Figura 16: Resultado inicial e final das reações do teste bioquímico API20E para o isolado 5-CTXB



11. Extração do DNA

Após a identificação de cada isolado foi realizada a extração do DNA daquelas bactérias identificadas como produtoras de carbapenemases, ESBL e AmpC. Para a extração foi utilizada 20µL da solução de lise já preparada com 0,05M de NaOH, 0,25% de SDS e água e colocada em tubo de 0,2mL. Foram colhidas de cada isolado, 2 a 3 colônias de bactérias e inseridas no tubo que continha a solução de lise. Após o preparo dessa suspensão, cada uma foi colocada no termociclador a 99°C durante 15 minutos. Ao final do processo no termociclador, foram adicionados em cada tubo contendo as suspensões 180µL de solução de TE 1x, homogeneizados e posteriormente centrifugados a 12000rpm por 15 minutos. Os tubos foram recolhidos da centrífuga e

retirado o sobrenadante colocando-o em novos tubos e armazenados a temperatura de -20°C.

12. Teste de detecção por PCR

12.1 KPC

Inicialmente foi preparada a solução contendo o *primer* KPC (*Klebsiella pneumoniae carbapenemase*) e *Master Mix Taq polimerase* que já possui todos os substratos para o ensaio de PCR. As soluções foram preparadas mediante a quantidade de amostras analisadas para 23mL de solução. Inicialmente foi realizada a pesquisa da presença dos cinco genes mais prevalentes de carbapenemases: *bla_{NDM}*, *bla_{VIM}*, *bla_{IMP}*, *bla_{KPC}*. Como foi apenas observado a presença do gene *bla_{KPC}*, as análises seguintes dos outros isolados foram feitas apenas utilizando o *primer* KPC. Foram utilizados 12,5µL de *Master Mix Taq Polimerase*, 1,5µL do *primer* de KPC *Forward* e 1,5µL do *primer* de KPC *Reverse* como pode ser observado na *tabela 7* ao final deste tópico. Foi adicionada a solução uma quantidade de água para 23mL (7,5µL de água). A quantidade dessa solução foi então multiplicada pela quantidade de amostras utilizadas, acrescentando mais duas como margem de erro, mais o controle positivo e o controle negativo.

12.2 ESBL

Inicialmente foi preparada a solução contendo os *primers* para as ESBLs e *Master Mix Taq polimerase*. As soluções foram preparadas mediante a quantidade de amostras analisadas para 23mL de solução. Para a pesquisa da presença do gene *bla_{CTX-M}*, foi realizado um PCR multiplex para os 5 diferentes grupos de β-lactamases do tipo CTX-M. Foram utilizados 12,5µL de *Master Mix Taq Polimerase*, 1,0µL de cada um dos 5 *primers* (G1, G2, G9, G8, G25) *Forward* e 1,0µL de cada um dos 5 *primers* (G1, G2, G9, G8, G25) *Reverse*. Foram adicionada a solução uma quantidade de água para 23mL (0,5µL de água). A quantidade dessa solução foi então multiplicada pela quantidade de amostras utilizadas, acrescentando mais duas como margem de erro, mais o controle positivo e o controle negativo.

12.3 ESBL e carbapenemase

Inicialmente foi preparada a solução contendo o *primer* para as ESBLs e carbapenemases e *Master Mix Taq polimerase*. Para a pesquisa da presença dos genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} e *bla*_{OXA} as soluções foram preparadas mediante a quantidade de amostras analisadas para 23mL de solução. Foram utilizados 12,5µL de *Master Mix Taq Polimerase*, 1,5µL de cada um dos 3 primers (OXA, TEM e SHV) *Forward* e 1,5µL de cada um dos 3 primers (OXA, TEM e SHV) *Reverse*. Foi adicionada a solução uma quantidade de água para 23mL (1,5µL de água). A quantidade dessa solução foi então multiplicada pela quantidade de amostras utilizadas para as ESBLs e carbapenemases, acrescentando mais duas como margem de erro, mais o controle positivo e o controle negativo.

Tabela 7: Especificação dos primers utilizados nos ensaios de PCR de acordo com os genes e controles utilizados estudo

Gene β-lactamase	Primer	Controles
<i>bla</i>KPC	KPC F	+9
	KPC R	
<i>bla</i>TEM	TEM F	+1; +7
	TEM R	
<i>bla</i>NDM	NDM F	+4
	NDM R	
<i>bla</i>VIM	VIM F	+2
	VIM R	
<i>bla</i>IMP	IMP F	+5
	IMP R	
<i>bla</i>SHV	SHV R	+7; +8
	SHV R	
<i>bla</i>OXA	OXA F	+1
	OXA R	
<i>bla</i>_{CTX-M} grupo 1	CTX-M G1 F	+1
	CTX-M G1 R	
<i>bla</i>_{CTX-M} grupo 2	CTX-M G2 F	-
	CTX-M G2 R	
<i>bla</i>_{CTX-M} grupo 8	CTX-M G8 F	-
	CTX-M G8 R	
<i>bla</i>_{CTX-M} grupo 9	CTX-M G9 F	+O14
	CTX-M G9 R	
<i>bla</i>_{CTX-M} grupo 25	CTX-M G25 F	-
	CTX-M G25 R	

12.4 Transferência para os tubos de análise e controles

Após a preparação da solução dos *primers* e *Master Mix*, foram colocados 23µL dessa solução em tubos de ensaio para PCR e acrescentou-se 2,0µL de extração de DNA de cada amostra analisada e dos controles. Os tubos de ensaio foram colocados em termociclador nas condições correspondendo ao controle utilizado para:

- KPC: Desnaturação Inicial (94°C 10min), Desnaturação (94°C 30seg), Anelamento (52°C 40seg), Extensão (72°C 50seg), Número de ciclos (36x), Extensão Final (72°C 5min).
- G25, G1, G2, G9, G8: Desnaturação Inicial (94°C 5min), Desnaturação (94°C 25seg), Anelamento (52°C 40seg), Extensão (72°C 50seg), Número de ciclos (30x), Extensão Final (72°C 6min).
- OXA, TEM SHV: Desnaturação Inicial (94°C 7min), Desnaturação (94°C 40seg), Anelamento (57°C 40seg), Extensão (72°C 1min), Número de ciclos (30x), Extensão Final (72°C 7min).

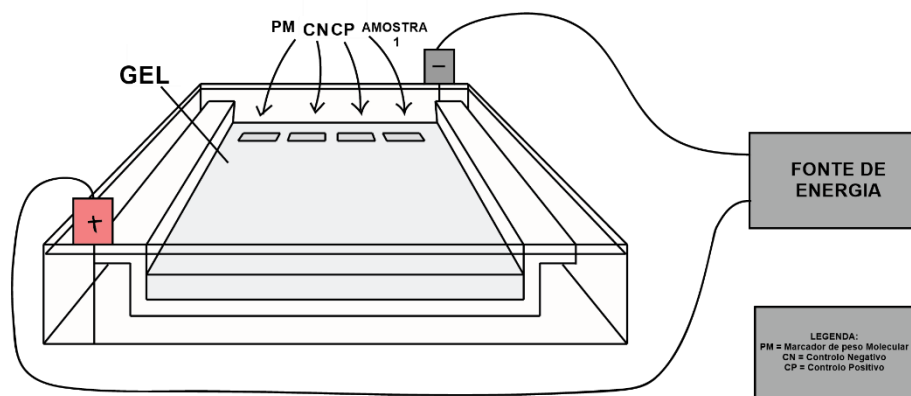
12.5 Preparação do gel de agarose

Para a preparação do gel de agarose *simplex* para eletroforese foram pesados 0,5g de agarose e colocados em 33mL de TAE 1x, para a preparação *multiplex* foram pesados 2,0g para 100mL de TAE 1x. A solução foi colocada em microondas até tornar-se límpida. Colocou-se em banho a temperatura de 50°C para o arrefecimento lento. Foram colocados 1,15µL (*simplex*) e 3,5 µL (*multiplex*) de Midori, corante não carcinogénico utilizado para corar os ácidos nucleicos, homogeneizado e despejado em placa para eletroforese.

12.6 Eletroforese em gel de agarose

Já com o gel de agarose pronto e com o fim do processo no termociclador, foi adicionado ao primeiro poço da eletroforese um 5µL do marcador de peso molecular. Para os poços seguintes, foram adicionados 8µL de cada controle e amostras, separando como mostra a figura abaixo.

Figura 17: Esquema da eletroforese em gel de agarose



Após a colocação de cada amostra em seus respectivos poços, o processo de eletroforese foi iniciado nas condições de 120W durante 30 minutos (*simplex*), 90W durante 83min (*multiplex*). Com a finalização da corrida, foi efectuada a leitura com UV para verificar se alguma das amostras de extração de DNA continham os genes pesquisados.

13. Avaliação de Transferência de gene

Inicialmente para a avaliação de transferência de gene, foram colocados 5mL de TSB em tubos de ensaio para cada amostra identificada e confirmada como produtoras de carbapenemase, ESBL e AmpC (dadoras) confirmadas. Nestes tubos foram adicionadas uma UFC da dadora e incubado a 37°C por 24 horas. O mesmo procedimento foi realizado com a amostra recetora (*E. coli* K802N).

O encontro da dadora com a recetora ocorreu em dois meios: líquido e sólido. Para o meio líquido, foi realizado em um tubo de ensaio contendo 10mL de TSB e foram adicionados 800µL da suspensão bacteriana em TSB da recetora e 200µL da suspensão bacteriana da dadora. O tudo de TSB foi incubado a 37°C por 24 horas. Para o meio sólido foi utilizado uma placa de Agar Mueller Hinton, onde foram adicionados 200µL de cada suspensão bacteriana (dadora e recetora), seguido de suave homogeneização por movimentos circulares suaves. A placa foi incubada a 37°C por 24 horas.

A seleção de possíveis transconjugantes foi realizada em meio MacConkey Agar adicionado de Meropenemo (0,5µg/mL) e do antibiótico ao qual a recetora apresentou resistência e que a dadora era sensível (Streptomicona a 100µg/mL). Na placa contendo o meio foram inoculados 200µL do encontro em TSB e espalhado utilizando uma pipeta

Pasteur de vidro em forma (L). Para o encontro em Mueller Hinton, utilizou-se uma zaragatoa estéril com uma quantidade de massa de crescimento suficiente que foi semeada a superfície do agar de seleção. As placas foram incubadas a 37°C por 48 horas.

Após a incubação, as UFC não fermentadoras da lactose foram repicadas, para meio idêntico ao que foram selecionadas, com objetivo de confirmar a capacidade de crescimento na presença dos dois antibióticos, obtendo-se assim uma cultura pura. As placas foram incubadas por 24 horas e 37°C.

Os potenciais transconjugantes com crescimento na repicagem foram submetidos a um TSA. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas.

Os transconjugantes selecionados, que apresentaram perfil de ESBL, AmpC , carbapenemase e resistência da recetora, foram submetidos a ensaio de PCR para a confirmação da presença dos mesmos genes de resistência presentes na dadora que justificariam a resistência apresentada no transconjugante. Esta última etapa é imprescindível para confirmar a capacidade de transferências dos genes de resistência dos isolados testados.

14. Congelação das amostras

A cada final das etapas escritas acima, os isolados foram congelados e armazenados em tubos de ensaio em meio de TSB com glicerol.

IV. Resultado & Discussão

1. Amostragens e áreas selecionadas para estudo

Foram colhidas dez amostras referentes aos pontos citados individualmente. Os locais escolhidos ao longo do curso do rio foram baseados em critérios aleatórios mas com viés crítico no que tange respeito a qualidade local da água em determinados pontos.

Em cada ponto de colheita, realizadas em dias diferentes, foram encontrados diferentes tipos de bactérias, predominando a presença de contaminação por bactérias pertencentes a família das *Enterobacteriaceae* em pequeno volume de água analisado, demonstrando um indicativo de contaminação fecal nas águas do Rio Douro.

As bactérias pertencentes a esse grupo (coliformes fecais) estão presentes no TGI de humanos e animais, das quais muitas vezes são eliminadas pelas fezes e tem como principal característica serem idicadoras de contaminação fecal (117).

E. coli é uma das principais bactérias responsáveis por essa caracterização já que sua presença em águas residuais indica contaminação de origem animal ou humana, podendo agir como agente patogénicospara o ser humano (7,11).

2. Seleção dos Isolados

Foram selecionados aleatoriamente 92 isolados das dez amostras colhidas. Esses isolados foram selecionados a partir do crescimento na membrana filtrante com base nos critérios fenotípicos de bactérias fermentadoras de lactose e crescimento nos meios com antibióticos utilizados na seleção. Destes 92 isolados, um total de 79 foram caracterizados como *Enterobacteriaceae*, 53 apresentaram-se como *E. coli*, não distante do que já se esperava, uma vez que esta bactéria é a pricipal representante das *Enterobacteriaceae*, e 26 isolados foram classificados como pertencentes ao grupo KESC, sendo posteriormente identificados como: *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter* ou *Serratia* através da interpretação do CHROMagar orientation® e confirmação com as galerias do API20E Biomérieux®.

Aqueles isolados que não apresentaram os critérios de análise para esse estudo, ou seja, não demonstraram características fenotípicas de *Enterobacteriaceae*, ou apresentaram cor diferente no teste de interpretação CHROMagar orientation®, não

foram submetidos aos testes complementares seguintes por se encontrarem fora do objetivo do estudo.

Tabela 8: Isolados selecionados nos meios de seleção contendo antibióticos a partir das amostras de água do rio

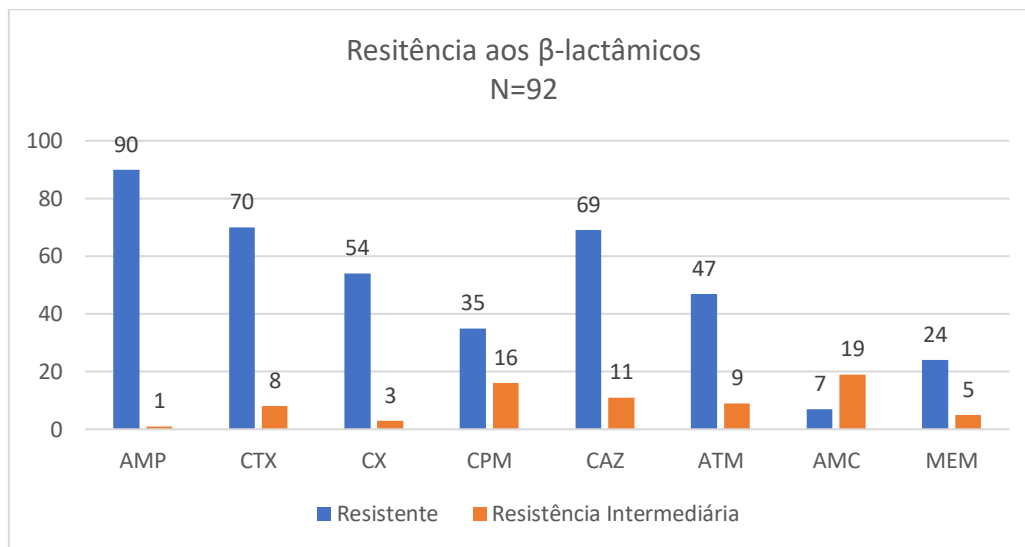
Número de Isolados	Grupo/Espécie
53	<i>E. coli</i>
26	KESC
1	<i>Pseudomonas</i> spp.

3. Resistência aos Antibióticos

Dos dez locais de amostras coletadas, foram analisados 92 isolados aleatoriamente que apresentaram características fenotípicas de fermentadores de lactose e apresentara resistência a diferentes classes de antibióticos, mostrando uma maior predominância aos antibióticos β -lactâmicos.

Quanto aos principais β -lactâmicos, setenta isolados mostraram resistência a Cefotaxima, cinquenta e quatro a Cefoxitina, trinta e cinco ao Cefepime e sessenta e nove a Ceftazidima. Para os carbapenemos foi observado que vinte quatro mostraram resistência ao meropeno, sendo quinze desses com fenótipo correspondente a produtores de carbapenemases. Alguns estudos demonstram que a prevalência de estirpes resistentes aos carbapenemos encontrados no meio ambiente ainda é considerado um assunto negligenciado mas que ainda assim novos casos têm ocorrido consecutivamente e descrito em algumas estirpes encontradas nomeio ambiente (90). Os altos valores de resistência aos β -lactâmicos foram possivelmente condicionados pela utilização destes antibióticos (CTX e MEM) nos meios de seleção. A presença desse elevado número de isolados resistentes aos antibióticos β -lactâmicos nas águas do rio pode sugerir que a colonização da população esteja sendo espelhada pelas águas do rio. A figura abaixo apresenta a resistência dos isolados de *Enterobacteriaceae* frente aos β -lactâmicos.

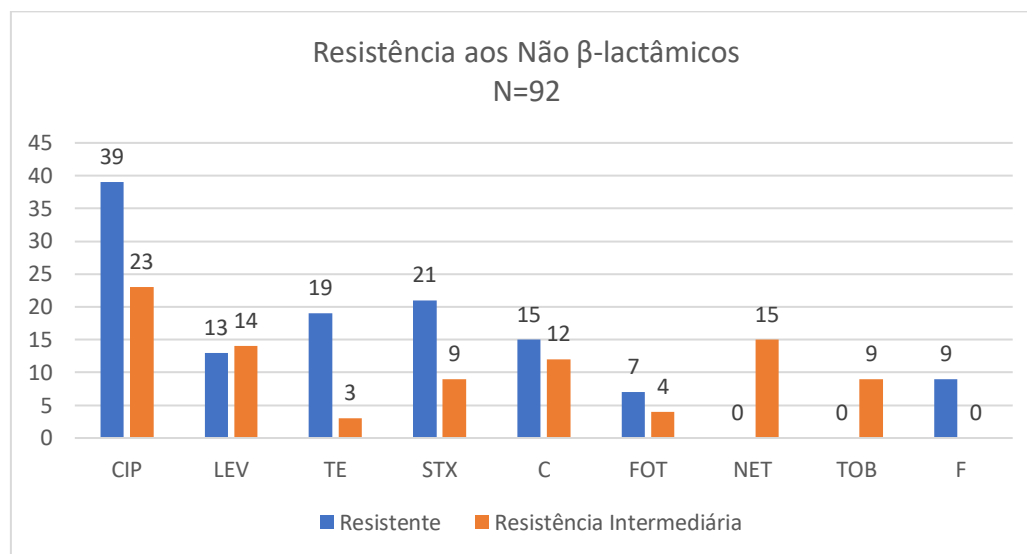
Figura 18: Isolados que apresentaram resistência e resistência intermediária aos antibióticos β -lactâmicos das 92 amostras isoladas



Legenda: AMP – Ampicilina, CTX – Cefotaxima, CX – Ceftazidima, CPM – Cefepime, CAZ – Ceftazidima, ATM – Aztreonam, AMC – Amoxicilina + Ácido Clavulânico, MEM – Meropenem

Ao analisarmos a resistência aos não β -lactâmicos, nos deparamos com trinta e nove isolados que mostraram resistência à ciprofloxacina, treze à levofloxacina, dezanove a tetraciclina, vinte e um ao sulfametoxazol + trimetoprim e quinze ao cloranfenicol. De facto os isolados apresentaram resistência aos β -lactâmicos, mas ainda assim foi possível observar um número considerável de isolados resistentes aos não β -lactâmicos o que configura um perfil de multiresistência dos mesmos.

Figura 19: Isolados que apresentaram resistência e resistência intermediária aos antibióticos não β -lactâmicos das 92 amostras isoladas



Legenda: CIP – Ciprofloxacino, LEV – Levofloxacino, TE – Tetraciclina, STX – Sulfametoxazol+trimetoprima, C – Cloranfenicol, FOT– Fosfomicina, NET – Netilmicina, TOB– Tobramicina, F- Nanofurantoína

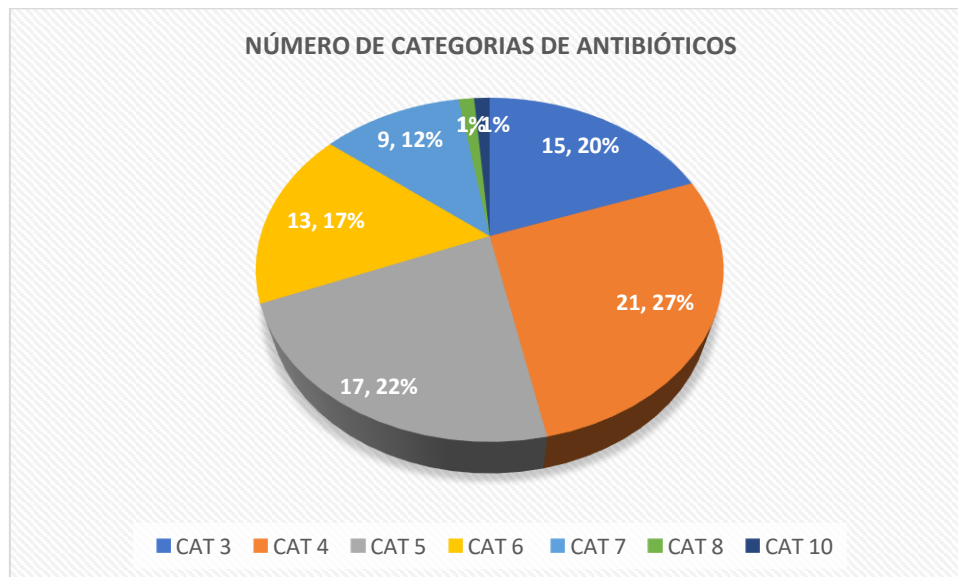
Uma classe de antibióticos não β -lactâmicos que deve ressaltar-se no estudo por sua larga utilização terapêutica são as fluoroquinolonas, que apesar de terem sido usadas no estudo com teor comparativo, apresentaram elevado número de isolados resistentes a essa classe. Também foi observado que treze isolados apresentaram resistência tanto à ciprofloxacina (CIP) quanto à levofloxacina (LEV). A resistência a esses principais antibióticos da classe das fluoroquinolonas torna a análise preocupante já que os isolados também apresentaram alto nível de resistência aos β -lactâmicos, tornando difícil a opção terapêutica para o tratamento, uma vez que as fluoroquinolonas, por terem um largo espectro de ação, são utilizadas como segunda opção medicamentosa. O grupo das sulfonamidas como o sulfametoxazol associado a trimetoprim também chamou atenção por sua alta prevalência de resistência (21/92) o que nos leva a pensar que águas residuais que são libetadas no rio, podem conter altas concentrações de antibióticos que por sua vez não são completamente metabolizados após o consumo (118). O rio, que por sua vez é propenso a se tornar reservatório de microrganismos resistentes a antibióticos, favorecem a transferência vertical e horizontal de genes, o que pode explicar a disseminação de de bactérias resistentes a esses tipos de antibióticos (119).

4. Perfil de Multiresistência aos antibióticos

O alto índice de multiresistência a agentes antimicrobianos apresentado por bactérias, tornou-se uma preocupante ameaça à saúde pública, uma vez que se torna escasso antimicrobianos eficazes e alternativos disponíveis para infecções causadas por essas bactérias (41). O grande número de isolados de *Enterobacteriaceae* resistentes aos β -lactâmicos e não β -lactâmicos trouxe à tona a este trabalho, a presença de isolados de *Enterobacteriaceae* multirresistentes aos antibióticos (EMDR).

Dos 92 isolados de *Enterobacteriaceae*, 77 apresentaram características de EMDR. O perfil de multirresistência apresentado nesses 77 isolados foi apresentado com base na variação de resistência entre 3 e 10 categorias de antibióticos.

Figura 20: Perfil de multirresistência aos antibióticos de acordo com suas categorias



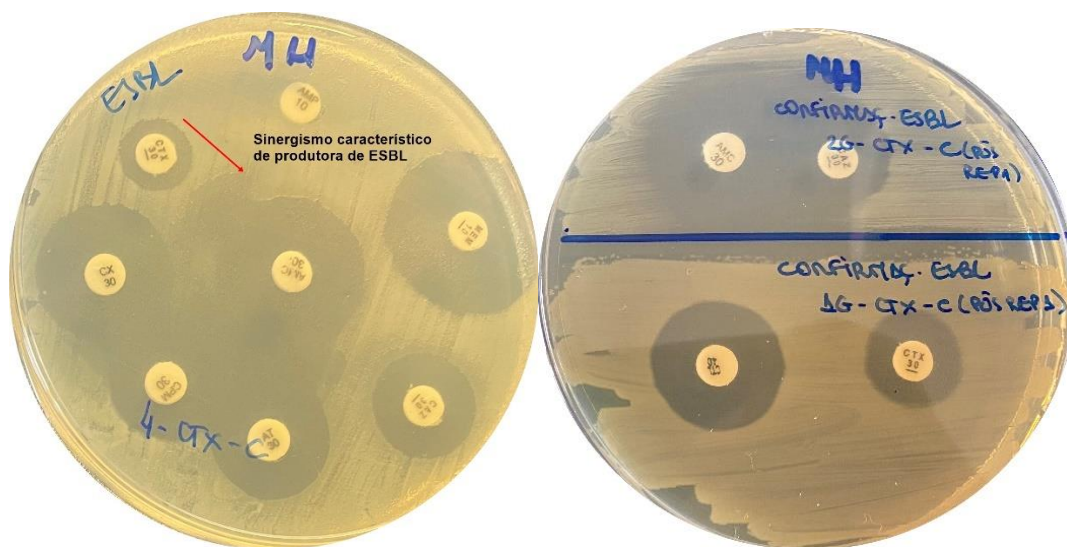
As tabelas abaixo mostram o perfil de suscetibilidade aos antibióticos dos isolados de *Enterobacteriaceae* que apresentaram resistência às diferentes classes. As classificações foram feitas conforme os valores apresentados nos testes de difusão em Agar. Os isolados que demonstraram resistência a algum antibiótico foram codificados com a cor vermelha, os que apresentaram resistência intermédia, cor amarela e aqueles suscetíveis aos antibióticos, cor verde.

Amostras			Perfil de Suscetibilidade																			ID	
Amostras	Freguesia	Coordenadas GPS	Data	AMP 10 µg	CTX 30 µg	FOX 30 µg	FEP 30 µg	ATM 30 µg	DOR 10 µg	GAZ 30 µg	NBP 10 µg	AMS 30 µg	CP 5 µg	LEV 5 µg	TE 30 µg	SXT 25 µg	C 30 µg	FOT 200 µg	NET 10 µg	F 100 µg	TOS 10 µg	MICROORG.	
1P-AMP-A	PORTO	RIBEIRA DO PORTO	27/11/2020	4	28	23	26	30	14	20	23	NA	30	27	21	21	19	27	27	14	21	19	E coli
1P-AMP-B	PORTO	RIBEIRA DO PORTO	27/11/2020	6	26	21	26	40	23	17	28	28	26	28	22	22	24	28	24	22	16	E coli	
1P-AMP-D	PORTO	RIBEIRA DO PORTO	27/11/2020	6	26	18	22	26	30	18	29	20	8	8	6	6	41	15	21	22	16	E coli	
1P-CTX-D	PORTO	RIBEIRA DO PORTO	27/11/2020	6	16	6	30	NA	NA	16	27	NA	25	24	26	19	26	27	19	25	16	E coli	
1P-CTX-D	PORTO	RIBEIRA DO PORTO	27/11/2020	8	22	28	24	25	29	6	28	NA	21	24	16	NA	18	23	13	29	13	E coli	
1G-AMP-A	GAIA	CAIS DE GAIA	27/11/2020	6	30	20	29	28	NA	NA	30	NA	25	23	23	NA	21	41	16	27	18	E coli	
1G-AMP-C	GAIA	CAIS DE GAIA	27/11/2020	6	28	24	25	26	NA	19	30	NA	25	23	17	24	20	26	13	24	15	E coli	
1G-AMP-D	GAIA	CAIS DE GAIA	27/11/2020	6	28	24	30	NA	NA	19	26	23	26	28	25	24	26	19	26	19	25	E coli	
1G-AMP-E	GAIA	CAIS DE GAIA	27/11/2020	6	27	21	29	27	31	23	26	17	27	25	10	28	8	NA	16	25	17	E coli	
1G-AMP-F	GAIA	CAIS DE GAIA	27/11/2020	8	24	18	24	11	28	20	21	22	24	22	18	22	21	28	13	17	16	E coli	
1G-CTX-A	GAIA	CAIS DE GAIA	27/11/2020	7	18	14	25	30	NA	NA	NA	NA	22	23	18	23	19	30	18	28	17	E coli	
1G-CTX-B	GAIA	CAIS DE GAIA	27/11/2020	10	16	24	NA	NA	NA	NA	NA	NA	23	21	25	16	SBP	NA	28	27	18	E coli	
2G-AMP-A	GAIA	CAIS DE GAIA	27/11/2020	6	26	18	25	23	29	19	28	21	23	19	17	27	SBP	19	NA	13	20	14	E coli
2G-AMP-B	GAIA	CAIS DE GAIA	27/11/2020	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	31	NA	NA	NA	NA	NA	NA	16	31	19	E coli	
2G-CTX-A	GAIA	CAIS DE GAIA	27/11/2020	6	6	20	14	11	30	22	31	22	9	8	6	25	21	17	22	17	E coli		
2G-CTX-B	GAIA	CAIS DE GAIA	27/11/2020	11	20	24	23	21	31	15	18	12	19	22	18	8	19	36	13	24	16	E coli	
2G-CTX-C	GAIA	CAIS DE GAIA	27/11/2020	11	21	30	25	22	29	16	32	NA	22	25	19	8	23	32	14	27	15	E coli	
2G-CTX-D	GAIA	CAIS DE GAIA	27/11/2020	6	10	6	26	14	32	6	30	21	27	24	22	31	SRP	SBP	15	25	16	MISTURADO	
1P-AMP-C	PORTO	RIBEIRA DO PORTO	27/11/2020	6	27	22	26	30	29	19	29	21	26	26	6	31	25	30	16	20	17	E coli	
1P-AMP-D	PORTO	RIBEIRA DO PORTO	27/11/2020	6	31	23	33	27	NA	22	32	NA	12	12	6	30	42	17	28	19	E coli		
1P-CTX-A	PORTO	RIBEIRA DO PORTO	27/11/2020	6	16	6	27	NA	NA	11	37	29	NA	NA	NA	NA	NA	NA	27	18	19	E coli	
1P-CTX-C	PORTO	RIBEIRA DO PORTO	27/11/2020	6	14	21	18	20	39	16	33	NA	20	24	22	19	29	NA	16	27	18		

5. Enterobacteriaceae produtoras de ESBL

A detecção dos isolados produtores de ESBL foi realizada através do teste fenotípico de confirmação (DDST), utilizando disco cefotaxima com cefotaxima + ácido clavulânico (CTL₄₀) e ceftazidima com ácido clavulânico (AMC). Em alguns isolados pode ser observado a presença visível do sinergismo com ácido clavulânico como apresentado na figura abaixo.

Figura 22: Sinergismo característico de ESBL e teste de confirmação de disco para ESBL



Dos 92 isolados analisados, 12 apresentaram características de produtores de ESBL, sendo 3 pertencentes ao grupo KESC, 2 *Klebsiella pneumoniae* e 7 *E. coli*.

Figura 23: Isolados que apresentaram características confirmatórias de produtores de ESBL

Amostras				Perfil de Suscetibilidade																			ID
Amostras	Freguesia	Coordenadas GPS	Data	AMP 10 µg	CTX 30 µg	FOX 30 µg	FEP 30 µg	ATM 30 µg	DOR 10 µg	CAZ 30 µg	MRP 10 µg	AMC 30 µg	CIP 5 µg	LEV 5 µg	TE 30 µg	SXT 25 µg	C 30 µg	FOT 200 µg	NET 10 µg	F 100 µg	TOB 10 µg	MICROORG.	
1G-CTX-A	GAIA	CAIS DE GAIA	27/11/2020	7	18	24	25	30	NA	NA	NA	NA	22	23	24	13	19	30	18	28	17	KESC	
1G-CTX-C (pós rep 1)	GAIA	CAIS DE GAIA	27/11/2020	8	18	25	31	NA	-	23	40	NA	23	25	28	13	23	33	17	NA	19	KESC	
1-CTX-A	GAIA	CAIS CRUZEIRO DE GAIA	17/01/2021	6	8	19	14	15	-	9	25	23	23	20	7	7	8	37	14	23	14	E. coli	
1-CTX-B	GAIA	CAIS CRUZEIRO DE GAIA	17/01/2021	8	10	21	20	14	-	16	27	28	17	11	21	23	6	15	14	21	14	E. coli	
1-CTX-D	GAIA	CAIS CRUZEIRO DE GAIA	17/01/2021	8	7	25	14	14	-	7	25	20	25	21	8	21	21	NA	16	21	16	E. coli	
4-CTX-C	GAIA	ESTUÁRIO DO DOURO	17/01/2021	6	8	20	13	16	-	16	24	21	31	34	8	26	19	NA	16	22	14	E. coli	
1(2)-CTX-A	GAIA	CAIS CRUZEIRO DE GAIA	03/02/2021	6	7	20	13	16	-	11	24	23	22	24	22	6	6	24	15	16	17	KESC	
1(2)-CTX-D1	GAIA	CAIS CRUZEIRO DE GAIA	03/02/2021	6	11	23	16	17	-	11	31	23	25	21	19	29	22	23	16	24	15	E. coli	
1(3)-CTX-A	GAIA	CAIS CRUZEIRO DE GAIA	10/02/2021	6	12	22	18	20	-	14	28	25	25	22	6	6	27	33	16	25	18	E. coli	
1(4)-MEM-B	GAIA	CAIS CRUZEIRO DE GAIA	04/03/2021	6	17	17	17	16	-	12	27	18	22	23	21	6	21	29	18	28	19	Klebsiella pneumoniae	
1(5)-CTX-A	GAIA	CAIS CRUZEIRO DE GAIA	19/03/2021	6	11	20	16	19	-	9	30	25	24	22	6	6	22	23	21	22	24	Klebsiella pneumoniae	
1(5)-CTX-B	GAIA	CAIS CRUZEIRO DE GAIA	19/03/2021	6	12	22	16	21	-	16	33	25	11	10	6	6	8	37	23	22	24	E. coli	

Legenda: grau de resistência: **Alta**, **Intermediária**, **Baixa**, **não realizado**

A presença maioritária de *E. coli* produtora de ESBL entre os isolados selecionados, só ratifica a disseminação dessa bactéria evidenciada por diversos estudos. Cada vez mais se torna evidente a presença de *E. coli* produtoras de ESBL no meio ambiente. A literatura relata que *Klebsiella* spp. e *Escherichia coli* são os principais reservatórios dos genes que codificam ESBL dentro do ambiente hospitalar e no meio ambiente, justificando a presença das mesmas neste trabalho (120). Os 12 isolados que apresentaram característica de produtores de ESBL demonstraram resistência a cefotaxima e dez apresentaram também resistência a ceftazidima.

As *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBL mostraram resistência aos não β -lactâmicos dos quais 6/12 tetraciclina, 6/12 sulfametoxazol+trimetopim e 4/12 cloranfenicol. Dentre os 12 isolados produtores de ESBL dez foram classificados como MDR, conforme a classificação de Magiorako 2012, o que torna preocupante a presença dessas estirpes de *Enterobacteriaceae* nas águas do rio que pode sugerir uma contaminação focal, provavelmente accidental e que esteja sendo espelhada pelas águas (41).

5.1 Pesquisa de ESBL por métodos moleculares (PCR)

Após a análise dos resultados obtidos pelo teste fenotípico de detecção de β -lactamases de espectro alargado, procedeu-se à análise dos genes codificadores através de métodos moleculares dos isolados considerados positivos.

A análise através dos métodos moleculares, permite identificar e concluir qual o tipo de β -lactamase presente no isolado com base no tamanho das bandas.

A caracterização foi realizada com base nos principais genes codificadores de β -lactamases pertencentes às famílias: *bla*_{OXA}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M} grupo 1,2,8,9 e 25. Foram analisados os 12 isolados que apresentaram características de ESBL confirmada nos testes fenotípicos.

Para os genes *bla*_{OXA}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, foi utilizado o controlo +1, no qual abrange os genes *bla*_{TEM} e *bla*_{SHV}, e para o gene *bla*_{CTX-M} grupo 1,2,8,9 e 25, foi utilizado o controlo +1 referente ao CTX-M grupo 1 e +O14 que corresponde ao CTX-M grupo 9. Para aqueles isolados que apresentaram na eletroforese bandas diferentes dos controlos utilizados, a análise foi realizada com base nos valores de tamanho de bandas referentes aos outros genes por comparação (121,122) .

Dos 12 isolados analisados, o gene *bla*_{CTX-M} grupo 1 foi detectado em sete isolados, o gene *bla*_{CTX-M} grupo 2 em apenas um isolado, e o gene *bla*_{CTX-M}-9 em dois isolados. Quanto aos genes codificadores de ESBL do tipo TEM não foi detetado em

nenhum dos isolados. Já a β -lactamase do tipo SHV foi predominante, estando presente em seis dos isolados (6/12) e a tipo OXA em apenas três dos isolados (3/12).

Quanto à presença de mais de um tipo de gene num mesmo isolado, cinco possuíram genes do tipo *bla*_{CTX-M} grupo 1 e *bla*_{SHV}, apenas um *bla*_{CTX-M} grupo 9 e *bla*_{SHV} e um *bla*_{CTX-M} grupo 2 e *bla*_{OXA}.

Com base nos resultados obtidos é importante salientar a importância de mais análises e estudos que ratifiquem a caracterização molecular, de modo a elucidar os mecanismos de resistência dessas bactérias nas águas do rio.

Tabela 9: Detecção dos genes codificadores de ESBL nos isolados selecionados

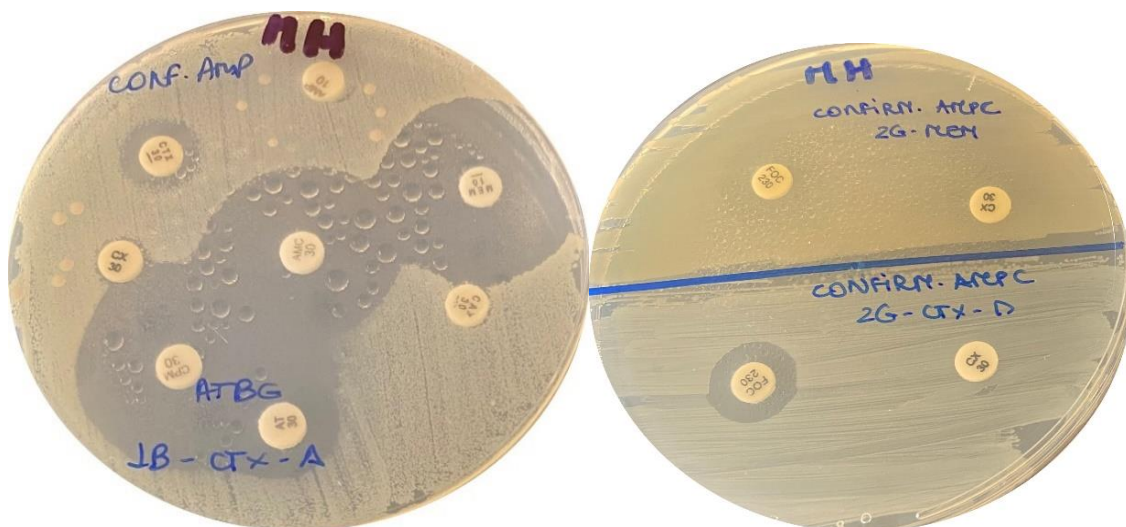
Isolados analisados	CTX-M Grupo 1 (415bp)	CTX-M Grupo 2 (552bp)	CTX-M grupo 9 (215bp)	TEM (800bp)	SHV (713bp)	OXA (564bp)
1(2)-CTX-A	x				x	
1(2)-CTX-D1	x					
1G-CTX-A						x
1-CTX-A	x				x	
1G-CTX-C						x
1-CTX-D	x				x	
1-CTX-B			x			
1(3)-CTX-A			x		x	
4-CTX-C	x				x	
1(4)-MEM-B		x				x
1(5)-CTX-A	x				x	
1(5)-CTX-B	x					

6. *Enterobacteriaceae* produtoras de AmpC

Para as *Enterobacteriaceae* produtoras de β -lactamases do tipo AmpC, a detecção foi feita através da análise do teste de discos de antimicrobianos com inibidores enzimáticos como a cloxacilina (FOC₂₃₀) juntamente com a cefoxitina.

Os isolados que apresentaram características típicas de produtores de AmpC como resistência às cefalosporinas de até a terceira geração e estabilidade ao cefepime (cefalosporina de quarta geração) foram selecionadas para posterior teste de confirmação de *Enterobacteriaceae* produtora de AmpC. A figura abaixo representa alguns isolados que demonstraram essa característica no TSA.

Figura 24: Testes confirmatórios de presença de produtores de AmpC



Dos oito isolados classificados como produtores de AmpC, todos apresentaram resistência a Ampicilina, Cefotaxima, Cefoxitina e Ceftazidima como se pode observar no quadro abaixo. Apenas um demonstrou resistência ao cefepime porém a confirmação com cloxacilina ratificou a presença de uma produtora de AmpC. Quanto aos não β -lactâmicos, não foi observado um número relevante de resistência a essa classe de antibióticos, já que apenas 5 isolados demonstraram resistência a uma dessas classes (ciprofloxacina, levofloxacina, tetraciclina e cloranfenicol).

De acordo com a classificação de multirresistência, todas as *Enterobacteriaceae* produtoras de AmpC foram classificadas como MDR uma vez que os oito isolados apresentaram resistência a três ou mais classes de antibióticos.

Figura 25: Isolados que apresentaram características confirmatórias de produtores de AmpC

Amostras				Perfil de Suscetibilidade																			ID
Amostras	Freguesia	Coordenadas GPS	Data	AMP 10 µg	CTX 30 µg	FOX 30 µg	FEP 30 µg	ATM 30 µg	DOR 10 µg	CAZ 30 µg	MRP 10 µg	AMC 30 µg	CIP 5 µg	LEV 5 µg	TE 30 µg	SXT 25 µg	C 30 µg	FOT 200 µg	NET 10 µg	F 100 µg	TOB 10 µg	MICROORG.	
1P-CTX-A (pós rep1)	PORTO	RIBEIRA DO PORTO	27/11/2020	6	16	6	27	NA	NA	11	37	29	NA	NA	NA	NA	NA	20	29	21		E. coli	
1-CTX-F(2)	GAIA	CAIS CRUZEIRO DE GAIA	17/01/2021	6	12	9	13	7	-	6	20	14	21	19	20	24	23	20	15	17	17	Klebsiella pneumoniae	
1B-CTX-A	PORTO	ETAR	09/01/2021	6	11	7	25	14	-	6	30	26	26	24	6	25	22	31	18	26	17	Pseudomonas spp.	
1B-CTX-B	PORTO	ETAR	09/01/2021	6	20	6	29	25	-	11	27	16	21	19	24	31	21	NA	16	26	18	E. coli	
4-CTX-B	GAIA	ESTUÁRIO DO DOURO	17/01/2021	6	12	6	23	14	-	6	24	18	22	23	24	NA	8	28	20	30	19	E. coli	
5-CTX-B	GAIA	MARINA DO DOURO	17/01/2021	6	6	6	23	10	-	7	27	17	28	21	20	30	20	28	16	19	17	Enterobacter cloacae	
1(2)-CTX-C1	GAIA	CAIS CRUZEIRO DE GAIA	03/02/2021	6	9	6	25	19	-	6	36	31	20	21	7	26	17	17	17	27	16	E. coli	
1(4)-CTX-B	GAIA	CAIS CRUZEIRO DE GAIA	04/03/2021	6	11	6	22	10	-	6	31	21	7	6	20	17	18	24	16	24	16	E. coli	

Legenda: grau de resistência: Alta, Intermediária, baixa, não realizado

7. Isolados resistentes aos carbapenemos

Dos 79 isolados (*E. coli* e KESC) 15 apresentaram genes codificadores de carbapenemases. A elevada quantidade de isolados resistentes ao meropenemo (MEM) e que apresentaram genes que codificam carbapenemases é um dado bastante relevante do estudo, uma vez que foi encontrado em 100mL de amostra analisada. Apesar de alguns autores já relatarem a frequente aparição de bactérias resistentes a carbapenemos no meio ambiente, principalmente *Enterobacteriaceae*, ainda é pouco estudada a propagação, disseminação e potencial transmissão de genes de bactérias resistentes a antibióticos através do meio ambiente, principalmente genes codificadores de carbapenemase (87,123).

Os isolados que apresentaram resistência ao meropeno no TSA foram confirmados através dos testes fenotípicos para a detecção da presença de carbapenemases como o *Carbapenem Inactivation Method* (CIM) como mostra a *figura 26 e 27* abaixo:

Figura 26: Exemplo de teste de suscetibilidade aos antibióticos de isolado resistente ao meropenemo

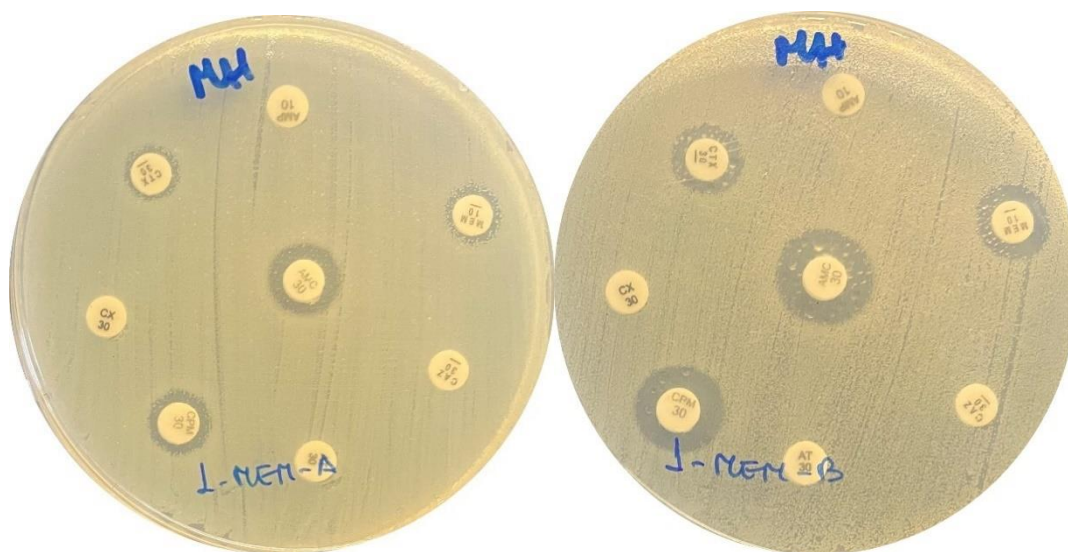
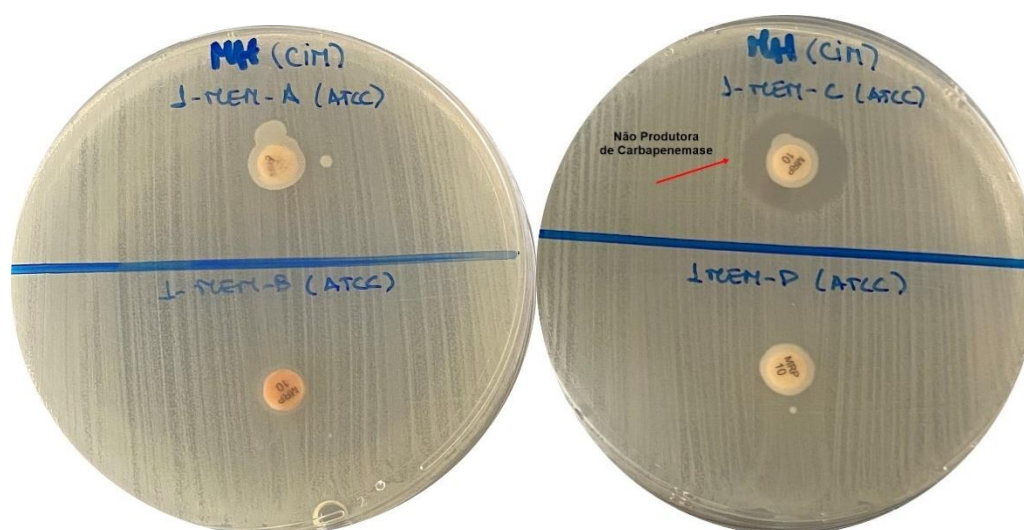


Figura 27: Exemplo de resultados de Carbapenem Inactivation Method (CIM)



Dos 15 isolados produtores de carbapenemases, seis foram identificados como *E. coli*, oito *Klebsiella pneumoniae* e um *Klebsiella oxytoca*. As identificações foram confirmadas através de API 20E Biomérieux conforme as reações apresentadas por cada isolado. Era expectável a presença de *Klebsiella pneumoniae* nos isolados produtores de carbapenemases, visto que é a mais frequentemente detetada e possui rápida e ampla disseminação (124). *E. coli* também é bastante citada por autores que

confirmam a sua presença como produtoras de carbapenemases. Gauthier e colaboradores relataram que com a disseminação de estirpes de *Enterobacteriaceae* produtoras de carbapenemase (CPE) globalmente, as enzimas hidrolisantes de carbapenemos estão cada vez mais presentes em isolados de *Escherichia coli* (89). Num estudo de pesquisa epidemiológica, os autores constataram um elevado número de isolados de *E. coli* produtores de carbapenemase (CP-Ec) recebidos no Centro Nacional de Referência Francês (F-NRC) em 2012 e 2013. Dos 140 isolados de *E. coli* produtores de carbapenemase, 74% produziram uma carbapenemase semelhante a OXA-48 e 21% produziram uma carbapenemase NDM (89).

Seis desses isolados apresentaram uma resistência intermediária ao meropenemo no TSA, o que poderia ter sugerido um resultado falso negativo quanto a sua classificação como produtora de carbapenemases. Para esses isolados, mesmo apresentando uma resistência intermediária, os testes de inibição e pesquisa por métodos moleculares foram realizados e acabaram por confirmar a presença de produtores de carbapenemases.

Dos 15 isolados resistentes aos carbapenemos, todos foram classificados como MDR apresentando resistência a três ou mais classes de antibióticos além da resistência ao meropenemo, o que evidencia uma alarmante resistência destas estirpes de *Enterobacteriaceae*. Esses isolados com esse grau de resistência a diferentes classes de antibióticos preocupam devido a importância terapêutica infecciosa dele, já que são algumas das principais escolhas terapêuticas nos hospitais e na comunidade (118,119).

Figura 28: Isolados que apresentaram características confirmatórias de produtores de carbapenemases

Amostras				Perfil de Suscetibilidade																			ID
Amostras	Freguesia	Coordenadas GPS	Data	AMP 10 µg	CTX 30 µg	FOX 30 µg	FEP 30 µg	ATM 30 µg	DOR 10 µg	CAZ 30 µg	MRP 10 µg	AMC 30 µg	CIP 5 µg	LEV 5 µg	TE 30 µg	SKT 25 µg	C 30 µg	FOT 200 µg	NET 10 µg	F 100 µg	TOB 10 µg	MICROORG.	
1-MEM-A	GAIA	CAIS CRUZEIRO DE GAIA	17/01/2021	6	7	6	9	6	-	6	9	11	20	23	18	6	17	23	16	18	15	E coli	
1-MEM-B	GAIA	CAIS CRUZEIRO DE GAIA	17/01/2021	6	9	6	11	6	-	6	10	13	18	17	23	27	18	13	20	27	14	E coli	
1-MEM-D	GAIA	CAIS CRUZEIRO DE GAIA	17/01/2021	6	9	7	10	6	-	6	9	12	17	19	19	22	19	25	15	16	15	Klebsiella pneumoniae	
1-MEM-D(2)	GAIA	CAIS CRUZEIRO DE GAIA	17/01/2021	6	9	6	11	6	-	6	9	15	17	16	23	30	17	12	NA	NA	15	E coli	
1(2)-MEM-A	GAIA	CAIS CRUZEIRO DE GAIA	03/02/2021	6	14	11	14	8	-	6	19	14	18	22	17	6	21	26	15	20	17	Klebsiella pneumoniae	
1(2)-MEM-C	GAIA	CAIS CRUZEIRO DE GAIA	03/02/2021	6	14	9	16	6	-	6	18	12	29	27	22	13	17	19	16	NA	19	Klebsiella pneumoniae	
1(3)-MEM-B	GAIA	CAIS CRUZEIRO DE GAIA	18/02/2021	6	19	13	18	14	-	6	19	21	26	21	24	11	21	20	24	8	38	E coli	
1(3)-MEM-D	GAIA	CAIS CRUZEIRO DE GAIA	18/02/2021	6	24	19	22	16	-	6	20	19	22	21	19	NA	24	NA	NA	NA	NA	Klebsiella pneumoniae	
1(4)-MEM-A	GAIA	CAIS CRUZEIRO DE GAIA	04/03/2021	6	15	14	15	10	-	6	19	18	18	17	20	29	25	6	24	24	25	Klebsiella pneumoniae	
1(5)-MEM-A	GAIA	CAIS CRUZEIRO DE GAIA	19/03/2021	6	6	6	10	13	-	6	16	21	6	6	6	6	12	24	18	9	15	Klebsiella pneumoniae	
1(5)-MEM-B	GAIA	CAIS CRUZEIRO DE GAIA	19/03/2021	6	12	12	9	6	-	6	13	16	16	18	15	23	22	19	13	20	14	Klebsiella pneumoniae	
1(5)-MEM-C	GAIA	CAIS CRUZEIRO DE GAIA	19/03/2021	6	20	6	21	26	-	6	20	17	15	13	16	22	8	25	17	14	16	Klebsiella pneumoniae	
1(5)-MEM-D	GAIA	CAIS CRUZEIRO DE GAIA	19/03/2021	6	13	6	13	9	-	6	17	14	23	24	18	6	21	16	21	22	19	Klebsiella pneumoniae	
1(5)-MEM-E	GAIA	CAIS CRUZEIRO DE GAIA	19/03/2021	6	11	6	7	6	-	6	13	15	20	17	19	22	21	25	21	24	17	E coli	
1(5)-MEM-F	GAIA	CAIS CRUZEIRO DE GAIA	19/03/2021	6	14	6	13	9	-	20	16	14	24	24	21	6	21	7	20	27	21	E coli	

Legenda: grau de resistência: Alta, Intermediária, baixa, não realizado

Os isolados produtores de carbapenemases foram encontrados todos no mesmo ponto de colheita no Conselho de Gaia. Daí a importância do estudo, em centralizar o foco da pesquisa neste ponto e analisar quais foram as possíveis causas de maior predominância de bactérias produtoras de carbapenemases em apenas um local específico, sugerindo-nos uma contaminação pontual, focal ou acidental.

7.1 Pesquisa de carbapenemases por métodos moleculares (PCR)

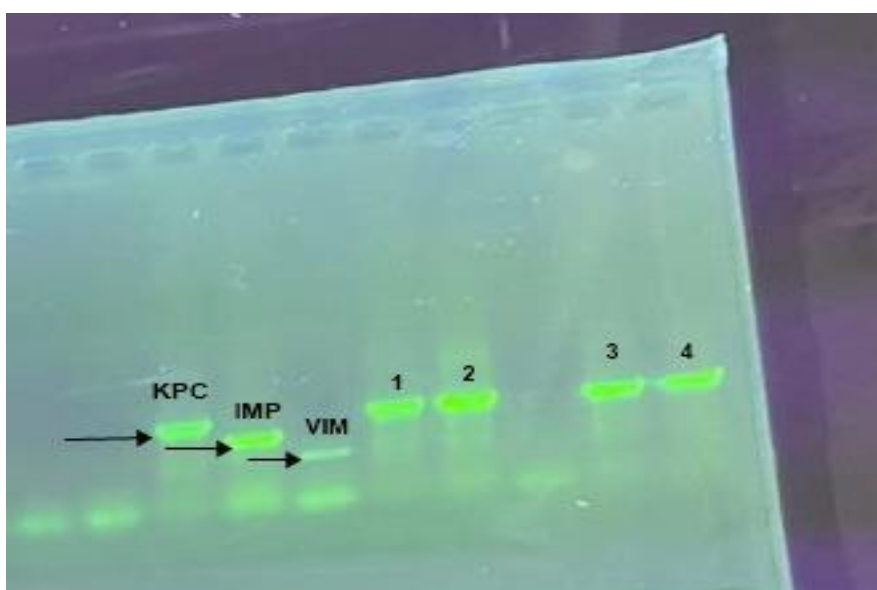
Para os isolados que confirmaram a presença de carbapenemases, foi realizada PCR para pesquisa de genes de carbapenemases mais prevalentes: *bla_{NDM}*, *bla_{VIM}*, *bla_{IMP}*, *bla_{KPC}* e que são mais frequentemente detetados em *Enterobacteriaceae* (123).

As carbapenemases são enzimas capazes de hidrolisar os carbapenemos, assim como outros β -lactâmicos, como cefalosporinas e penicilinas (123).

Para a análise dos isolados, foram detetadas através do PCR a carbapenemase do tipo KPC em todos os 15 isolados, bastante expectável já que foi comprovada a presença de carbapenemase conforme os resultados dos testes fenotípicos realizados através do método CIM.

A KPC tem sido relatada em estirpes de *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia coli*, *Serratia* e também em *Pseudomonas*. As estirpes podem apresentar diferentes características frente aos carbapenemos e possuem uma ampla disseminação mundial (125).

Figura 29: Eletroforese dos isolados que continham o gene da KPC



Além das análises do gene da KPC, também se realizou a caracterização com base nos principais genes codificadores pertencentes às famílias das ESBL: *bla*_{OXA}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M} grupo 1,2,8,9 e 25 para os isolados que apresentaram o gene da KPC.

As bactérias produtoras de carbapenemases podem apresentar outros genes que são adquiridos. Como essas bactérias possuem um fenótipo no qual se sobressai o gene da KPC, não é tão perceptível observar outros genes adquirido somente pelo fenótipo. Daí a necessidade de utilizar métodos moleculares complementares para confirmar a presença desses outros genes expressos pelas bactérias.

Foram analisados os 15 isolados que apresentaram características de produtores de KPC confirmadas nos testes fenotípicos. Para os genes *bla*_{OXA}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, foi utilizado o controlo +1 no qual abrange os genes *bla*_{OXA} e *bla*_{TEM} e para o gene *bla*_{CTX-M} grupo 1,2,8,9 e 25, foi utilizado o controlo +1 referente ao CTX-M grupo 1 e +O14 que corresponde ao CTX-M grupo 9. Para aqueles isolados que apresentaram na eletroforese bandas diferentes dos controlos utilizados, a análise foi realizada com base nos valores de tamanho de bandas referentes aos outros genes por comparação conforme feito para as ESBL (121,122).

Tabela 10: Detecção dos genes codificadores de ESBL nos isolados seleccionados

Isolados analisados	CTX-M Grupo 1 (415bp)	CTX-M Grupo 2 (552bp)	CTX-M Grupo 8 (666bp)	CTX-M grupo 9 (215bp)	TEM (800bp)	SHV (713bp)	OXA (564bp)
1-MEM-A		x					
1-MEM-B		x					
1-MEM-D	x						
1-MEM-D2		x					
1(2)-MEM-A					x		x
1(2)-MEM-C			x				
1(3)-MEM-B		x					
1(3)-MEM-D		x			x		x
1(4)-MEM-A					x		
1(5)-MEM-A	x				x		x
1(5)-MEM-B							x
1(5)-MEM-C					x		
1(5)-MEM-D		x			x		
1(5)-MEM-E		x					
1(5)-MEM-F	x						

Dos 15 isolados analisados, a β -lactamase do tipo TEM foi detectada em seis isolados, o gene *bla*_{CTX-M} grupo 2 em sete isolados e a β -lactamase do tipo OXA em quatro isolados. Quanto aos genes codificadores do tipo *bla*_{CTX-M} grupo 9 não foi detectado em nenhum dos isolados.

Quanto à presença de mais de um tipo de gene num mesmo isolado, cinco possuíram genes do tipo TEM e OXA e um isolado apresentou o acúmulo de três genes (*bla*_{CTX-M} grupo 1, TEM e OXA).

Todos os isolados produtores de carbapenemases foram encontrados no mesmo ponto de colheita, em datas diferentes, no Conselho de Gaia em datas diferentes, o que sugere uma contaminação pontual no local. As análises realizadas e principalmente os resultados desta PCR, podem ser efetivamente validados uma vez que os controles utilizados foram adequadamente apresentados e fidedignos.

8. Transferência de genes de resistência de *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBL, AmpC e carbapenemases

As *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBL, AmpC e carbapenemase foram submetidas ao ensaio de conjugação em meio líquido e sólido, para analisar a capacidade de transferência do material genético responsável pelo fenótipo de resistência. Foi observado que nenhum dos isolados analisados apresentou a capacidade de transferir o gene responsável pelo fenótipo de ESBL, AmpC ou carbapenemase. Esses resultados preliminares podem vir a ter alterações ao longo do tempo, já que esses genes podem sofrer combinações e serem transferidos para outros tipos de bactérias, inclusive bactérias autóctones.

Essa transferência de gene ocorre quando dois ou mais tipos de plasmídeos R que estão presentes numa bactéria passa para outra através da recombinação genética. Esse mecanismo faz com que apareçam plasmídeos R portadores de diferentes genes de resistência a diversos antibióticos (126).

V. Conclusão

A análise dos resultados obtidos no presente estudo permite concluir que:

- Dos 92 isolados, 77 isolados apresentaram a característica de *Enterobacteriaceae* de multirresistência, contribuindo para um cenário complicado no que tange as opções terapêuticas para tratamento de infecções.
 - Um total de 12 isolados foram caracterizados como *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBL (13,04%) em amostras de água de 100mL.
 - Os 92 isolados demonstraram um perfil de resistência a cefotaxima, ceftazidima, ciprofloxacina e ao sulfametoxazol+trimetropim.
 - Grande parte das *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBL apresentou um perfil de resistência elevado a cefotaxima, cefepime e ceftazidima. Perfil característico dos isolados produtores de cefotaximases.
 - Dos 12 isolados *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBL, três pertenceram ao grupo KESC, 2 *Klebsiella pneumoniae* e 7 *E. coli*. As ESBL mais encontradas foram do tipo CTX-M e SHV sendo:
 - (7/12) CTX-M grupo 1
 - (1/12) CTX-M grupo 2
 - (2/12) CTX-M grupo 9
 - (6/12) SHV
 - (3/12) OXA
- Quanto à presença de mais de um tipo de gene em um mesmo isolado, cinco possuíam genes do tipo *bla*_{CTX-M} grupo 1 e SHV e apenas um *bla*_{CTX-M} grupo 9 e SHV.
- Um total de 8 isolados foram caracterizados como *Enterobacteriaceae* produtora de AmpC (8,7%). Dos oito isolados classificados como produtores de AmpC, todos apresentaram resistência a Ampicilina, Cefotaxima, Cefoxitina e Ceftazidima.
 - Quanto aos não β -lactâmicos, não foi observado um número relevante de resistência a essa classe de antibióticos.
 - Todas as *Enterobacteriaceae* produtoras de AmpC foram classificadas como MDR uma vez que os oito isolados apresentaram resistência a três ou mais classes de antibióticos.

- Quinze isolados apresentaram genes codificadores de carbapenemases.

- Dos 15 isolados produtores de carbapenemases, seis foram identificados como *E. coli*, oito *Klebsiella pneumoniae* e um *Klebsiella oxytoca*.

- Todos os 15 isolados produtores de carbapenemases foram classificados como MDR apresentando resistência a três ou mais classes de antibióticos além da resistência ao meropenemo.

- Foram detetadas através do PCR a carbapenemase do tipo KPC e genes *bla*_{OXA}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M} grupo 1,2,3,8,9 e 25, sendo

- (15/15) KPC

- (3/15) CTX-M grupo 1

- (7/15) CTXM grupo 2

- (1/15) CTXM grupo 8

- (6/15) TEM

- (4/15) OXA

Quanto a presença de mais de um tipo de gene em um mesmo isolado, três possuíam genes do tipo TEM e OXA e dois isolados apresentaram o acúmulo de três genes (*bla*_{CTX-M} grupo 1, TEM e OXA) e (*bla*_{CTX-M} grupo 2, TEM e OXA).

O controlo de qualidade de água tem por finalidade analisar amostras de acordo métodos e especificações padronizadas e registadas junto ao órgão regulador. Visa também mensurar a qualidade dos ambientes aquáticos, de modo a certificar que os mesmos estão de acordo com as especificações seguindo os padrões e normas (12,127,128).

O controlo de qualidade microbiológica da água é imprescindível para auxiliar na melhoria e manutenção da qualidade, seja para segurança da saúde da população, seja por questões ecológicas/ambientais (129).

A qualidade microbiológica das águas está condicionada à quantidade e ao tipo de microrganismo presente e sua multiplicação, daí o estabelecimento de normas e diretrizes que permitam avaliar a quantidade e o tipo de microrganismos permitidos de modo a não causar danos à saúde do indivíduo (129,130).

Cada fase do processo de avaliação da qualidade tem como objetivo atender as necessidades explícitas e implícitas do consumidor/usuário e assegurar a saúde do mesmo, evitando que ele adquira qualquer enfermidade (130).

Diante desse recorte, este estudo vem enfatizar, principalmente, a relevância dos isolados produtores de carbapenemasases encontrados em uma área pontual de análise. A presença destas bactérias resistentes aos carbapenemos não só constitui uma desvantagem ambiental mas também um alerta para a detecção de um foco de contaminação inesperado.

A resistência microbiana aos antibióticos é um assunto que está constantemente sendo notificado por ser um grave problema de saúde pública. A presença de bactérias multirresistentes em ambientes naturais, realça a importância de estudos que venham confirmar e caracterizar os mecanismos causais envolvidos na resistência microbiana. E este estudo demonstrou que a metodologia utilizada nos permite realizar essas detecções e trabalhar futuramente em cima de estratégias que possam mitigar a disseminação desses microrganismos, evitando assim contaminações recorrentes.

Contudo, é necessário o enquadramento teórico e aprofundado da atuação dessas bactérias multirresistentes, não somente na saúde humana mas também no impacto que elas podem causar ao meio ambiente, tornando-se importante a utilização de ferramentas, como marcadores ecológicos e epidemiológicos, que possam rastrear e controlar a proliferação de bactérias no meio ambiente.

A presença de bactérias produtoras de carbapenemasases nas amostras analisadas da água do rio foi um dos resultados mais relevantes para o estudo no ponto de vista de saúde pública.

Os resultados também sugerem um espelhamento da colonização da população com as águas do rio, o que converge diretamente para os resultados encontrados. Aliado a isso, a influência de fatores genéticos e ecológicos das bactérias presentes nas águas fomentando a resistência dessas estirpes e transferência horizontal de marcadores de resistência entre elas, corrobora a importância da utilização de ferramentas como marcadores epidemiológicos e ecológicos no controle da disseminação da resistência aos antibióticos.

A presença de *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBL, AmpC e carbapenemase configura um sério problema de saúde pública, pois esses isolados são capazes de tornar ineficaz a atuação de antibióticos contra infecções decorrentes dessas bactérias.

Contudo, este trabalho vem ressaltar a relevância do impacto que a resistência antimicrobiana pode constituir em termos de ameaça para a saúde pública e também alertar que bactérias multirresistentes fora do seu contexto fisiológico, indicam contaminação nociva, uma vez que as mesmas, com alterações genéticas adquiridas, podem criar novos mecanismos de infecção, com capacidade de se instalar como agente infeccioso e disseminar-se através do meio ambiente.

VI. **Perspectivas Futuras**

De modo a dar continuidade e amplitude aos resultados encontrados, avalia-se a necessidade de estudos futuros para confirmar e caracterizar os mecanismos causais envolvidos na contaminação da água no local onde foram encontradas bactérias produtoras de carbapenemase, dando ênfase a investigação de uma possível relação à prestação de cuidados de saúde. Para além disso, novas amostras poderiam ser coletadas e analisadas para a confirmação da persistência dessas bactérias multirresistentes no local. Adicional aos resultados já encontrados, realizar a técnica de *Pulse Field Gel Electrophoresis* aos isolados previamente detetados, trazendo robustez aos resultados, precisão e uma análise mais específica ao estudo, e com base nisso, desenvolver tratamentos e estratégias que possam mitigar essa contaminação.

VII. Referências bibliográficas

1. Alves ICC, El-Robrini M, de Lourdes Souza Santos M, de Moura Monteiro S, Barbosa LPF, Guimarães JTF. Surface water's quality and trophic status assessment in the Arari River (Marajo Island, Northern Brazil) | Qualidade das águas superficiais e avaliação do estado trófico do rio arari (ilha de marajó, Norte do Brasil). *Acta Amaz.* 2012;42(1):115–24.
2. Batista BG. Avaliação Microbiológica Da Água Do Arroio Pessegueirinho De Santa Rosa, Noroeste Do Estado Do Rio Grande Do Sul. *Rev Monogr Ambient.* 2012;9(9):2031–7.
3. Cid Rigobelo E, Hermínio Mingatto F, Susumu Takahashi L, De Ávila FA. Padrão Físico-Químico E Microbiológico Da Água De Propriedades Rurais Da Região De Dracena. *Rev Acadêmica Ciência Anim.* 2017;7(2):219.
4. Pratte-santos R, Terra VR. Perspectivas da avaliação da qualidade da água em rios por intermédio de parâmetros físicos , químicos e biológicos . Quality evaluation perspectives of water on rivers through physical , chemical and biological parameters. *Quality.* 2008;6:63–5.
5. Lima C, Medeiros G. DIAGNOSIS OF THE WATER QUALITY OF JAGUARI-MIRIM RIVER, AT COUNTY OF SÃO JOÃO DA BOA VISTA, STATE OF SÃO PAULO, BRAZIL. *Eng Ambient Pesqui e Tecnol.* 2008 Aug 1;5.
6. Flynn M, Louro M, Silva L, Rossi M. Indicadores de qualidade da água e biodiversidade do Rio Jaguari-Mirim no trecho entre as pequenas centrais hidrelétricas de São José e São Joaquim, São João da Boa Vista, São Paulo. *Rev Intertox Toxicol Risco Ambient e Soc.* 2015 May 31;4.
7. Cabral JPS. Water Microbiology. Bacterial Pathogens and Water. Vol. 7, *International Journal of Environmental Research and Public Health* . 2010.
8. Abo-Amer A, Soltan E-S, Abu-Gharbia M. Molecular approach and bacterial quality of drinking water of urban and rural communities in Egypt. *Acta Microbiol Immunol Hung* [Internet]. 2008;55(3):311–26. Available from: <https://akjournals.com/view/journals/030/55/3/article-p311.xml>
9. Croxen MA, Finlay BB. Molecular mechanisms of Escherichia coli pathogenicity. *Nat Rev Microbiol.* 2010;8(1):26–38.
10. Meride Y, Ayenew B. Drinking water quality assessment and its effects on residents health in Wondo genet campus, Ethiopia. *Environ Syst Res* [Internet]. 2016;5(1):1. Available from: <https://doi.org/10.1186/s40068-016-0053-6>
11. Lucas PJ, Cabral C, Colford JM. Dissemination of drinking water contamination data to consumers: A systematic review of impact on consumer behaviors. *PLoS One.* 2011;6(6).
12. d'Aguila PS, Roque OC da C, Miranda CAS, Ferreira AP. Avaliação da qualidade de água para abastecimento público do Município de Nova Iguaçu. *Cad Saude Publica.* 2000;16(3):791–8.
13. Diário da República. Decreto-Lei n.º 135/2009, de 3 de junho. Port Ministério do Ambient do Ordenam do Territ e do Desenvolv Reg. 2007;
14. Diário da República. Decreto-Lei n.º 236/98 de 1 de agosto. Port Ministério do Ambient do Ordenam do Territ e do Desenvolv Reg. 2007;

15. Kolawole OM, Ajayi KT, Olayemi AB, Okoh AI. Assessment of water quality in Asa River (Nigeria) and its indigenous *Clarias gariepinus* fish. *Int J Environ Res Public Health*. 2011 Nov;8(11):4332–52.
16. Bartram J. Heterotrophic Plate Counts and Drinking-water Safety: The Significance of HPCs for Water Quality and Human Health. *Water Intell Online*. 2013;12.
17. Bain R, Cronk R, Hossain R, Bonjour S, Onda K, Wright J, et al. Global assessment of exposure to faecal contamination through drinking water based on a systematic review. *Trop Med Int Health*. 2014/05/08. 2014 Aug;19(8):917–27.
18. Paterson DL. Resistance in gram-negative bacteria: enterobacteriaceae. *Am J Med*. 2006 Jun;119(6 Suppl 1):S20-8; discussion S62-70.
19. Shivaji T, Sousa Pinto C, San-Bento A, Oliveira Serra LA, Valente J, Machado J, et al. A large community outbreak of Legionnaires disease in Vila Franca de Xira, Portugal, October to November 2014. *Euro Surveill Bull Eur sur les Mal Transm = Eur Commun Dis Bull*. 2014 Dec;19(50):20991.
20. Adak A, Khan MR. An insight into gut microbiota and its functionalities. *Cell Mol Life Sci*. 2019 Feb;76(3):473–93.
21. Salvo Romero E, Alonso Cotoner C, Pardo Camacho C, Casado Bedmar M, Vicario M. The intestinal barrier function and its involvement in digestive disease. *Rev Esp enfermedades Dig organo Of la Soc Esp Patol Dig*. 2015 Nov;107(11):686–96.
22. Camilleri M, Madsen K, Spiller R, Greenwood-Van Meerveld B, Verne GN. Intestinal barrier function in health and gastrointestinal disease. *Neurogastroenterol Motil Off J Eur Gastrointest Motil Soc*. 2012 Jun;24(6):503–12.
23. Peterson LW, Artis D. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nat Rev Immunol*. 2014 Mar;14(3):141–53.
24. Dominguez-Bello MG, Blaser MJ, Ley RE, Knight R. Development of the human gastrointestinal microbiota and insights from high-throughput sequencing. *Gastroenterology*. 2011 May;140(6):1713–9.
25. Wang B, Wu G, Zhou Z, Dai Z, Sun Y, Ji Y, et al. Glutamine and intestinal barrier function. *Amino Acids*. 2015 Oct;47(10):2143–54.
26. D'Amelio P, Sassi F. Gut Microbiota, Immune System, and Bone. *Calcif Tissue Int*. 2018 Apr;102(4):415–25.
27. Gaboriau-Routhiau V, Cerf-Bensussan N. [Gut microbiota and development of the immune system]. *Med Sci (Paris)*. 2016 Nov;32(11):961–7.
28. Tiffany CR, Bäumler AJ. Dysbiosis: from fiction to function. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2019 Nov;317(5):G602–8.
29. Kalinkovich A, Livshits G. A cross talk between dysbiosis and gut-associated immune system governs the development of inflammatory arthropathies. *Semin Arthritis Rheum*. 2019 Dec;49(3):474–84.
30. Gao J, Xu K, Liu H, Liu G, Bai M, Peng C, et al. Impact of the Gut Microbiota on Intestinal Immunity Mediated by Tryptophan Metabolism. *Front Cell Infect Microbiol*. 2018;8:13.

31. Pickard JM, Zeng MY, Caruso R, Núñez G. Gut microbiota: Role in pathogen colonization, immune responses, and inflammatory disease. *Immunol Rev.* 2017 Sep;279(1):70–89.
32. Neuman MG, Nanau RM. Inflammatory bowel disease: role of diet, microbiota, life style. *Transl Res.* 2012 Jul;160(1):29–44.
33. Narciso A, Lito L, Cristino JM, Duarte A. *Escherichia coli* Uropatogénica: Resistência aos Antibióticos Versus Factores de Virulência. *Acta Urológica.* 2010;27(2):11–20.
34. Bien J, Palagani V, Bozko P. The intestinal microbiota dysbiosis and *Clostridium difficile* infection: is there a relationship with inflammatory bowel disease? *Therap Adv Gastroenterol.* 2013 Jan;6(1):53–68.
35. Friswell M, Campbell B, Rhodes J. The role of bacteria in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Gut Liver.* 2010 Sep;4(3):295–306.
36. Mainil J. *Escherichia coli* virulence factors. *Vet Immunol Immunopathol.* 2013;152(1–2):2–12.
37. Pathak SP, Gopal K. Prevalence of bacterial contamination with antibiotic resistant and enterotoxigenic fecal coliforms in treated drinking water. *J Toxicol Environ Heal Part A.* 2008;71(7):427–33.
38. Doi Y, Paterson DL. Carbapenemase-producing enterobacteriaceae. In: *Seminars in respiratory and critical care medicine.* Thieme Medical Publishers; 2015. p. 74–84.
39. Ferreira WFC, Sousa Jcf, Lima N. *Microbiologia.* 2010. Lisboa: Lidel. 2010;
40. Vila J, Sáez-López E, Johnson JR, Römling U, Dobrindt U, Cantón R, et al. *Escherichia coli*: an old friend with new tidings. *FEMS Microbiol Rev.* 2016;40(4):437–63.
41. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, 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 [Internet].* 2012;18(3):268–81. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>
42. Seiffert SN, Hilty M, Perreten V, Endimiani A. Extended-spectrum cephalosporin-resistant Gram-negative organisms in livestock: an emerging problem for human health? *Drug Resist Updat.* 2013;16(1–2):22–45.
43. Gupta N, Limbago BM, Patel JB, Kallen AJ. Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae: Epidemiology and Prevention. *Clin Infect Dis [Internet].* 2011 Jul 1;53(1):60–7. Available from: <https://doi.org/10.1093/cid/cir202>
44. Lapaquette P, Glasser A-L, Huett A, Xavier RJ, Darfeuille-Michaud A. Crohn's disease-associated adherent-invasive *E. coli* are selectively favoured by impaired autophagy to replicate intracellularly. *Cell Microbiol.* 2010 Jan;12(1):99–113.
45. Jang J, Hur H-G, Sadowsky MJ, Byappanahalli MN, Yan T, Ishii S. Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications-a review. *J Appl Microbiol.* 2017 Sep;123(3):570–81.
46. Barnich N, Darfeuille-Michaud A. Abnormal CEACAM6 expression in Crohn disease patients favors gut colonization and inflammation by adherent-invasive

- E. coli. Virulence. 2010;1(4):281–2.
47. Bien J, Sokolova O, Bozko P. Role of uropathogenic *Escherichia coli* virulence factors in development of urinary tract infection and kidney damage. *Int J Nephrol*. 2012;2012.
 48. Moremi N, Manda E V, Falgenhauer L, Ghosh H, Imirzalioglu C, Matee M, et al. Predominance of CTX-M-15 among ESBL producers from environment and fish gut from the shores of Lake Victoria in Mwanza, Tanzania. *Front Microbiol*. 2016;7:1862.
 49. Wyres KL, Lam MMC, Holt KE. Population genomics of *Klebsiella pneumoniae*. *Nat Rev Microbiol*. 2020;18(6):344–59.
 50. Choby JE, Howard-Anderson J, Weiss DS. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*—clinical and molecular perspectives. *J Intern Med*. 2020;287(3):283–300.
 51. Mohamed ER, Aly SA, Halby HM, Ahmed SH, Zakaria AM, El-Asheer OM. Epidemiological typing of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*, which causes paediatric ventilator-associated pneumonia in Egypt. *J Med Microbiol*. 2017;66(5):628–34.
 52. Okamoto K, Lin MY, Haverkate M, Lolans K, Moore NM, Weiner S, et al. Modifiable risk factors for the spread of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing Enterobacteriaceae among long-term acute-care hospital patients. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2017;38(6):670–7.
 53. Annavajhala MK, Gomez-Simmonds A, Uhlemann A-C. Multidrug-resistant *Enterobacter cloacae* complex emerging as a global, diversifying threat. *Front Microbiol*. 2019;10:44.
 54. Cao P, Li C, Tan K, Liu C, Xu X, Zhang S, et al. Characterization, phylogenetic analyses, and pathogenicity of *Enterobacter cloacae* on rice seedlings in Heilongjiang Province, China. *Plant Dis*. 2020;104(6):1601–9.
 55. Ibrahim TA, Ugbokodo-Emanuel OM, Orungbgemi OO. Antibiotic-Resistant Profile and Plasmid Analysis of Selected Multiple Antibiotic-Resistant Bacteria Isolated from Selected Surface Water in Some Communities of Ondo North Senatorial District. *Int J Genet Eng Recomb*. 2018;4(1):8–14.
 56. Fuentefria DB, Ferreira AE, Gräf T, Corção G. *Pseudomonas aeruginosa*: disseminação de resistência antimicrobiana em efluente hospitalar e água superficial. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2008;41:470–3.
 57. Messi P, Guerrieri E, Bondi M. Antibiotic resistance and antibacterial activity in heterotrophic bacteria of mineral water origin. *Sci Total Environ*. 2005;346(1–3):213–9.
 58. Abraham S, Jordan D, Wong HS, Johnson JR, Toleman MA, Wakeham DL, et al. First detection of extended-spectrum cephalosporin-and fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* in Australian food-producing animals. *J Glob Antimicrob Resist*. 2015;3(4):273–7.
 59. Meletis G. Carbapenem resistance: overview of the problem and future perspectives. *Ther Adv Infect Dis*. 2016;3(1):15–21.
 60. Chen Y-H, Ko W-C, Hsueh P-R. Emerging resistance problems and future perspectives in pharmacotherapy for complicated urinary tract infections. *Expert Opin Pharmacother*. 2013;14(5):587–96.

61. Loureiro RJ, Roque F, Teixeira Rodrigues A, Herdeiro MT, Ramalheira E. O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. *Rev Port Saúde Pública*. 2016;34(1):77–84.
62. Louka C, Ravensbergen SJ, Ott A, Zhou X, García-Cobos S, Friedrich AW, et al. Predominance of CTX-M-15-producing ST131 strains among ESBL-producing *Escherichia coli* isolated from asylum seekers in the Netherlands. *J Antimicrob Chemother*. 2021 Jan;76(1):70–6.
63. Leekha S, Terrell CL, Edson RS. General principles of antimicrobial therapy. In: *Mayo Clinic Proceedings*. Elsevier; 2011. p. 156–67.
64. Tan SY, Tatsumura Y. Alexander Fleming (1881–1955): discoverer of penicillin. *Singapore Med J*. 2015;56(7):366.
65. KONG K, Schneper L, Mathee K. Beta-lactam antibiotics: from antibiosis to resistance and bacteriology. *Apmis*. 2010;118(1):1–36.
66. Halawani EM. -lactam antibiotic resistance in *Escherichia coli* commensal faecal flora of healthy population in Taif, Saudi Arabia. *African J Microbiol Res*. 2011;5(1):73–8.
67. Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg Infect Dis*. 2011;17(10):1791.
68. Landers TF, Cohen B, Wittum TE, Larson EL. A review of antibiotic use in food animals: perspective, policy, and potential. *Public Health Rep*. 2012;127(1):4–22.
69. Abou-Shaaban M, Ali AA, Rao PGM, Majid A. Drug utilization review of cephalosporins in a secondary care hospital in United Arab Emirates. *Int J Clin Pharm*. 2016;38(6):1367–71.
70. Cué Brugueras M, Morejón García M. Antibacterianos de acción sistémica: Parte I. Antibióticos betalactámicos. *Rev Cuba Med Gen Integr*. 1998;14(4):347–61.
71. Singh GS. β -Lactams in the new millennium. Part-I: monobactams and carbapenems. *Mini Rev Med Chem*. 2004;4(1):69–92.
72. Thirapanmethree K. Extended spectrum β -lactamases: critical tools of bacterial resistance. *Mahidol Univ J Pharm Sci*. 2012;39(1):1–8.
73. Clinic L. β -lactamase classification and amino acid sequences for TEM, SHV and OXA extended-spectrum and inhibitor resistant enzymes. Lahey Clinic Foundation Burlington, MA; 2013.
74. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(3):969–76.
75. Chaturvedi P, Singh A, Chowdhary P, Pandey A, Gupta P. Occurrence of emerging sulfonamide resistance (sul1 and sul2) associated with mobile integrons-integrase (intl1 and intl2) in riverine systems. *Sci Total Environ* [Internet]. 2021;751:142217. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969720357466>
76. Bertoncheli C de M, Hörner R. Uma revisão sobre metalo- β -lactamases. *Rev Bras Ciências Farm*. 2008;44:577–99.
77. Cantón R, Novais A, Valverde A, Machado E, Peixe L, Baquero F, et al. Prevalence and spread of extended-spectrum β -lactamase-producing

- Enterobacteriaceae in Europe. *Clin Microbiol Infect*. 2008;14:144–53.
78. Coque TM, Baquero F, Canton R. Increasing prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Euro Surveill Bull Eur sur les Mal Transm = Eur Commun Dis Bull*. 2008 Nov;13(47).
 79. Pitanga TN, Andrade LS de A, Bastos RP dos S, Carreiro LP. Resistência de enterobactérias a beta-lactâmicos mediada por beta-lactamases de espectro estendido e carbapenemases. *SEMOC-Semana Mobilização Científica-Alteridade, Direitos Fundam e Educ*. 2018;
 80. Olesen B, Hansen DS, Nilsson F, Frimodt-Møller J, Leihof RF, Struve C, et al. Prevalence and characteristics of the epidemic multiresistant *Escherichia coli* ST131 clonal group among extended-spectrum beta-lactamase-producing *E. coli* isolates in Copenhagen, Denmark. *J Clin Microbiol*. 2013 Jun;51(6):1779–85.
 81. Johnson JR, Johnston B, Clabots C, Kuskowski MA, Castanheira M. *Escherichia coli* sequence type ST131 as the major cause of serious multidrug-resistant *E. coli* infections in the United States. *Clin Infect Dis an Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2010 Aug;51(3):286–94.
 82. Dahbi G, Mora A, López C, Alonso MP, Mamani R, Marzoa J, et al. Emergence of new variants of ST131 clonal group among extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* producing extended-spectrum β -lactamases. *Int J Antimicrob Agents*. 2013 Oct;42(4):347–51.
 83. Nicolas-Chanoine M-H, Bertrand X, Madec J-Y. *Escherichia coli* ST131, an intriguing clonal group. *Clin Microbiol Rev*. 2014 Jul;27(3):543–74.
 84. Lagacé-Wiens P, Walkty A, Karlowsky JA. Ceftazidime–avibactam: an evidence-based review of its pharmacology and potential use in the treatment of Gram-negative bacterial infections. *Core Evid*. 2014;9:13.
 85. Khurana S, Taneja N, Sharma M. Extended spectrum (beta)-lactamase mediated resistance in urinary tract isolates of family Enterobacteriaceae. *Indian J Med Res*. 2002;116:145.
 86. Hansotia JB, Agarwal V, Pathak AA, Saoji AM. Extended spectrum beta-lactamase mediated resistance to third generation cephalosporins in *Klebsiella pneumoniae* in Nagpur, central India. *Indian J Med Res*. 1997;105:158–61.
 87. Mills MC, Lee J. The threat of carbapenem-resistant bacteria in the environment: Evidence of widespread contamination of reservoirs at a global scale. *Environ Pollut*. 2019 Dec;255(Pt 1):113143.
 88. El-Shaer S, Abdel-Rhman SH, Barwa R, Hassan R. Genetic characterization of extended-spectrum β -Lactamase-and carbapenemase-producing *Escherichia coli* isolated from Egyptian hospitals and environments. *PLoS One*. 2021;16(7):e0255219.
 89. Gauthier L, Dortet L, Cotillon G, Creton E, Cuzon G, Ponties V, et al. Diversity of carbapenemase-producing *Escherichia coli* isolates in France in 2012-2013. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018;62(8):e00266-18.
 90. Tação M, Correia A, Henriques IS. Low prevalence of carbapenem-resistant bacteria in river water: Resistance is mostly related to intrinsic mechanisms. *Microb Drug Resist*. 2015;21(5):497–506.
 91. Senhorinha L, Andrade DA. Resistência de enterobactérias a beta-lactâmicos

- mediada por beta-lactamases de espectro estendido e carbapenemases.
92. Yong D, Toleman A M, Giske G C. Characterization of a new metallo- β -lactamase gene, blaNDM-1, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(12):5046–54.
 93. Mishra SK, Acharya J, Kattel HP, Koirala J, Rijal BP. Metallo-beta-lactamase producing gram-negative bacterial isolates. *J Nepal Health Res Counc*. 2012;
 94. Nordmann P, Dortet L, Poirel L. Rapid detection of extended-spectrum- β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol*. 2012;50(9):3016–22.
 95. Zhang Y-Z, Li Y-Y. Inflammatory bowel disease: pathogenesis. *World J Gastroenterol*. 2014 Jan;20(1):91–9.
 96. Welby PL, Keller DS, Cromien JL, Tebas P, Storch GA. Resistance to penicillin and non-beta-lactam antibiotics of *Streptococcus pneumoniae* at a children's hospital. *Pediatr Infect Dis J*. 1994;13(4):281–7.
 97. Shahcheraghi F, Nasiri S, Noveiri H. The survey of genes encoding beta-lactamases, in *Escherichia coli* resistant to beta-lactam and non-beta-lactam antibiotics. *Iran J Basic Med Sci*. 2010;13(1):230–7.
 98. Kantele A, Mero S, Kirveskari J, Lääveri T. Fluoroquinolone antibiotic users select fluoroquinolone-resistant ESBL-producing *Enterobacteriaceae* (ESBL-PE)—Data of a prospective traveller study. *Travel Med Infect Dis*. 2017;16:23–30.
 99. You X, Wu D, Wei H, Xie B, Lu J. Fluoroquinolones and β -lactam antibiotics and antibiotic resistance genes in autumn leachates of seven major municipal solid waste landfills in China. *Environ Int*. 2018;113:162–9.
 100. Bottery MJ, Wood AJ, Brockhurst MA. Temporal dynamics of bacteria-plasmid coevolution under antibiotic selection. *ISME J*. 2019;13(2):559–62.
 101. Lermينياux NA, Cameron ADS. Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in clinical environments. *Can J Microbiol*. 2019;65(1):34–44.
 102. Ali ZM. Horizontal gene conjugative transmission acquisition and transfer of antibiotic-resistance genes in bacteria. 2018;
 103. Dziri O, Alonso CA, Dziri R, Gharsa H, Maraoub A, Torres C, et al. Metallo- β -lactamases and class D carbapenemases in south-east Tunisia: implication of mobile genetic elements in their dissemination. *Int J Antimicrob Agents*. 2018;52(6):871–7.
 104. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION – APHA. Standard methods for the examination of water and wastewater. *Microbiol Exam APHA; AWWA; WEF*. 2012;22 ed.
 105. WHO. Guidelines for Drinking-Water Quality. 2011;
 106. Drumond SN, Santiago A da F, Moreira M, Lanna MC da S, Roeser HMP. Molecular identification of diarrheagenic *Escherichia coli* in the watershed of Xopotó river, in Alto do Rio Doce, Brazil. *Eng Sanit e Ambient*. 2018;23(3):579–90.
 107. Fagerström A, Mölling P, Khan FA, Sundqvist M, Jass J, Söderquist B. Comparative distribution of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* from urine infections and environmental waters. *PLoS One*. 2019 Nov;14(11):e0224861.

108. Tymensen LD, Pyrdok F, Coles D, Koning W, McAllister TA, Jokinen CC, et al. Comparative accessory gene fingerprinting of surface water *Escherichia coli* reveals genetically diverse naturalized population. *J Appl Microbiol*. 2015 Jul;119(1):263–77.
109. Frank C, Werber D, Cramer JP, Askar M, Faber M, an der Heiden M, et al. Epidemic profile of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 outbreak in Germany. *N Engl J Med*. 2011 Nov;365(19):1771–80.
110. Frank DN, Robertson CE, Hamm CM, Kpadeh Z, Zhang T, Chen H, et al. Disease phenotype and genotype are associated with shifts in intestinal-associated microbiota in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis*. 2011 Jan;17(1):179–84.
111. Dhanji H, Murphy NM, Doumith M, Durmus S, Lee SS, Hope R, et al. Cephalosporin resistance mechanisms in *Escherichia coli* isolated from raw chicken imported into the UK. *J Antimicrob Chemother*. 2010 Dec;65(12):2534–7.
112. Pitout JDD. Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*: A Combination of Virulence with Antibiotic Resistance. *Front Microbiol*. 2012 Jan;3:9.
113. Peirano G, Lynch T, Matsumara Y, Nobrega D, Finn TJ, DeVinney R, et al. Trends in population dynamics of *Escherichia coli* sequence type 131, Calgary, Alberta, Canada, 2006–2016. *Emerg Infect Dis*. 2020;26(12):2907–15.
114. Skov R, Skov G. EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and / or epidemiological importance. 2012;(December):1–47.
115. Disk E, Method D, Testing AS. Antimicrobial susceptibility testing EUCAST disk diffusion method. 2021;0(January).
116. Van Der Zwaluw K, De Haan A, Pluister GN, Bootsma HJ, De Neeling AJ, Schouls LM. The Carbapenem Inactivation Method (CIM), a simple and low-cost alternative for the carba NP test to assess phenotypic carbapenemase activity in Gram-negative rods. *PLoS One*. 2015;10(3):1–13.
117. Holcomb DA, Stewart JR. Microbial Indicators of Fecal Pollution: Recent Progress and Challenges in Assessing Water Quality. *Curr Environ Heal Reports* [Internet]. 2020;7(3):311–24. Available from: <https://doi.org/10.1007/s40572-020-00278-1>
118. Heuer H, Schmitt H, Smalla K. Antibiotic resistance gene spread due to manure application on agricultural fields. *Curr Opin Microbiol* [Internet]. 2011;14(3):236–43. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369527411000579>
119. Homlok R, Kiskó G, Kovács A, Tóth T, Takács E, Mohácsi-Farkas C, et al. Antibiotics in a wastewater matrix at environmentally relevant concentrations affect coexisting resistant/sensitive bacterial cultures with profound impact on advanced oxidation treatment. *Sci Total Environ* [Internet]. 2021;754:142181. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969720357107>
120. Al-Otaibi FE, Bukhari EE. Clinical and laboratory profiles of urinary tract infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in a tertiary care center in central Saudi Arabia. *Saudi Med J*. 2013;34(2):171–6.

121. Woodford N, Fagan EJ, Ellington MJ. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding CTX-M extended-spectrum β -lactamases [4]. *J Antimicrob Chemother.* 2006;57(1):154–5.
122. Dallenne C, Da Costa A, Decré D, Favier C, Arlet G. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important beta-lactamases in Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother.* 2010 Mar;65(3):490–5.
123. Lerner A, Adler A, Abu-Hanna J, Meitus I, Navon-Venezia S, Carmeli Y. Environmental contamination by carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol.* 2013;51(1):177–81.
124. Schwaber MJ, Carmeli Y. Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae: A Potential Threat. *JAMA [Internet].* 2008 Dec 24;300(24):2911–3. Available from: <https://doi.org/10.1001/jama.2008.896>
125. Robledo IE, Aquino EE, Vázquez GJ. Detection of the KPC gene in *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter baumannii* during a PCR-based nosocomial surveillance study in Puerto Rico. *Antimicrob Agents Chemother [Internet].* 2011/03/28. 2011 Jun;55(6):2968–70. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21444702>
126. Sasirekha B, Shivakumar S. Occurrence of Plasmid-Mediated AmpC β -Lactamases Among *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates in a Tertiary Care Hospital in Bangalore. *Indian J Microbiol.* 2012 Jun;52(2):174–9.
127. Silva B, Silva C, Melo F De, Nascimento F. ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DA ÁGUA DE BEBEDOUROS NAS ESCOLAS PÚBLICAS DA CIDADE DE ESPERANÇA / PB MICROBIOLOGICAL ANALYSIS OF DRINKING WATER IN PUBLIC SCHOOLS IN THE CITY OF ESPERANÇA / PB A água é necessidade primordial para a vida , recurso natural indispen. 2019;
128. Silva R de CA da, Araújo TM de. Qualidade da água do manancial subterrâneo em áreas urbanas de Feira de Santana (BA). *Cien Saude Colet.* 2003;8:1019–28.
129. Simas L, Gonçalves P, Lopes JL, Alexandre C. Controlo da Qualidade da Água para Consumo Humano em Sistemas Públicos de Abastecimento. Lisboa IRAR. 2005;
130. Merten GH, Minella JP. Qualidade da água em bacias hidrográficas rurais: um desafio atual para a sobrevivência futura. *Agroecol e Desenvol Rural sustentável.* 2002;3(4):33–8.