



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS
Mestrado em Análises Clínicas Profissional

OCORRÊNCIA DE *Escherichia coli* COM PERFIL DE RESISTÊNCIA AOS
ANTIBIÓTICOS B-LACTÂMICOS EM AMBIENTE HÍDRICO URBANO DO
MUNICÍPIO DE BELÉM, PARÁ.

ROSEANE DE NAZARÉ MOURA VIEIRA

Belém- Pará
2019

ROSEANE DE NAZARÉ MOURA VIEIRA

OCORRÊNCIA DE *Escherichia coli* COM PERFIL DE RESISTÊNCIA AOS
ANTIBIÓTICOS B-LACTÂMICOS EM AMBIENTE HÍDRICO URBANO DO
MUNICÍPIO DE BELÉM, PARÁ.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Análises Clínicas, do Instituto de Ciências
Biológicas da Universidade Federal do Pará, como parte
dos requisitos necessários para a obtenção do grau de
Mestre em Análises Clínicas.

Orientador: Prof^a Dr^a Karla Tereza Silva Ribeiro

Belém- Pará
2019

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

V657o Vieira, Roseane de Nazaré Moura
Ocorrência de *Escherichia coli* com perfil de resistência aos
antibióticos B-lactâmicos em ambiente hídrico urbano do
município de Belém, Pará / Roseane de Nazaré Moura Vieira. —
2019.
59 f. : il. color.

Orientador(a): Prof^a. Dra. Karla Tereza Silva Ribeiro
Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em
Análises Clínicas, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade
Federal do Pará, Belém, 2019.

1. *Escherichia coli*. 2. Resistência. 3. Antibióticos. 4. Água.
I. Título.

CDD 576.15

ROSEANE DE NAZARÉ MOURA VIEIRA

OCORRÊNCIA DE *Escherichia coli* COM PERFIL DE RESISTÊNCIA AOS
ANTIBIÓTICOS B-LACTÂMICOS EM AMBIENTE HÍDRICO URBANO DO
MUNICÍPIO DE BELÉM, PARÁ.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Análises Clínicas, do Instituto de Ciências
Biológicas da Universidade Federal do Pará, como parte
dos requisitos necessários para a obtenção do grau de
Mestre em Análises Clínicas.

Data de Aprovação: 14/03/2019.

Banca Examinadora

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Karla Tereza Silva Ribeiro – ICB – UFPA

Avaliador 1: Prof. Dr. Luiz Fernando Almeida Machado - ICB – UFPA

Avaliador 2: Prof^ª Dr^ª Sheyla Mara de Almeida Ribeiro - ICB – UFPA

Avaliador 3: Prof^ª Dr^ª Janaína Vasconcelos Massafra - ICB- UFPA

Avaliador 4: Prof^ª Dr^ª Jacqueline Cortinhas Monteiro (Suplente)

Belém- Pará
2019

DEDICATÓRIA

*Este trabalho é dedicado à minha família e aos
meus poucos, mas valorosos amigos!*

AGRADECIMENTOS

Agradeço;

A Deus acima de cima de tudo

À minha mãe, pai, marido, filhos, irmãos e sobrinhos.

À minha orientadora Professora Dra. Karla Ribeiro

Aos meus amigos que estão diariamente comigo, Gleices, Cláudia, Flávio, Nati e Mari.

A todos os colegas do Laboratório de Microbiologia Ambiental do ICB-UFPA

Aos servidores do ICB em especial à Maria Joaquina Mendonça.

Muito Obrigada.

SUMÁRIO

	LISTA DE TABELAS E QUADRO	
	LISTA DE FIGURAS	
	RESUMO	
	ABSTRACT	
1	INTRODUÇÃO	8
2	REFERENCIAL TEÓRICO	10
2.1	FAMÍLIA ENTEROBACTERIACEAE	10
2.2	<i>Escherichia coli</i>	11
2.2.1	Aspectos Gerais	11
2.2.2	Classes Diarreio gênicas	12
2.3	ANTIBIÓTICOS B-LACTÂMICOS: VISÃO GERAL	17
2.4	RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS: VISÃO GERAL	18
2.4.1	Beta-lactamases	21
2.4.1.1	Beta-lactamases de Espectro Estendido (ESBL)	23
2.5	IMPACTO DECORRENTE DA DISSEMINAÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA NO AMBIENTE AQUÁTICO SOBRE A SAÚDE HUMANA	23
3	OBJETIVOS	27
3.1	GERAL	27
3.2	ESPECÍFICOS	27
4	MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1	TIPO DE ESTUDO E AMOSTRAGEM	28
4.2	PROCEDÊNCIA DAS AMOSTRAS AMBIENTAIS	28
4.2.1	Parque Ambiental (Estadual) do Utinga	28
4.2.2	Amostras de água do rio Guamá	29
4.2.3	Amostras de água de Praias	29
4.3	PROCEDIMENTO DE COLETA E PRESERVAÇÃO DAS AMOSTRAS DE ÁGUA	30
4.4	ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE <i>Escherichia coli</i>	30
4.5	PERFIL DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS	30
4.5.1	Repique dos isolados de <i>Escherichia coli</i>	30
4.5.2	Teste Fenotípico - Antibiograma	30
4.5.3	Pesquisa de β-lactamases de espectro ampliado (ESBL)	32
4.6	ORDENAÇÃO DE DADOS	32
5	RESULTADOS	33
5.1	ISOLADOS DE <i>Escherichia coli</i> E PERFIL DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS	33
5.2	DETECÇÃO DE ESBL	36
6	DISCUSSÃO	37
7	CONCLUSÃO	42
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

LISTA DE TABELA E QUADRO

Tabela 1	B-lactâmicos e as subclasses testadas no antibiograma e os intervalos para interpretação dos halos.	31
Tabela 2	Perfil geral do antibiograma demonstrando a suscetibilidade dos isolados de <i>Escherichia coli</i> frente aos antibióticos da classe β -lactâmicos.	33
Quadro 1	Perfil de resistência de <i>Escherichia coli</i> oriundas de águas superficiais (lago, praia e rio).	34
Tabela 3	Frequência de isolados de <i>Escherichia coli</i> com perfil de resistência procedentes do ambiente hídrico urbano, município de Belém – PA.	35

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Subclasse dos antibióticos β -lactâmicos, penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos.	17
Figura 2	Mecanismo pelo qual os β -lactâmicos inibem as ligações de peptídicas	18
Figura 3	Desenho esquemático dos principais mecanismos de resistência aos β -lactâmicos.	19
Figura 4	Local de ação das enzimas β -lactamases em bactérias Gram-negativas.	22
Figura 5	Local de ação das enzimas β -lactamases em bactérias Gram-positivas.	22
Figura 6	Imagem do Parque Ambiental do Utinga, Belém-PA.	28
Figura 7	Imagem do rio Guamá, município de Belém-PA.	29
Figura 8	Imagem da Ilha de Mosqueiro, Belém-PA.	29
Figura 9	Frequência dos isolados de <i>E. coli</i> com perfil de resistência e local de origem.	35
Figura 10	Frequência dos isolados de <i>E. coli</i> com perfil intermediário e local de origem.	36

RESUMO

A água é um recurso natural indispensável para a manutenção da vida do homem e dos seres vivos em geral. No entanto, sua qualidade está sendo cada vez mais comprometida, principalmente pelo processo de urbanização e diferentes atividades antrópicas. A pressão seletiva exercida pelo uso do antibiótico vem ocasionando a seleção de bactérias resistentes, sendo o ambiente aquático considerado um favorecedor da disseminação de genes de resistência aos antibióticos, constituindo-se em problema atual de saúde pública e ambiental. Desse modo, o objetivo do estudo foi verificar a ocorrência do perfil de resistência de *Escherichia coli* frente aos antibióticos β -lactâmicos, além de identificar fenotipicamente os isolados produtores de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL). Foram analisadas amostras de águas superficiais oriundas de diferentes recursos hídricos (rio, lago e praia), coletadas no período de abril/2017 a outubro/2018. Foi realizada a análise microbiológica das amostras de água através da técnica do Substrato Cromogênico Definido ONPG-MUG. Após a obtenção dos isolados de *E. coli*, foram realizados os testes fenotípicos de identificação bioquímica e perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos β -lactâmicos em todos os ambientes aquáticos estudados (lago, praia, rio). Foi também realizada a pesquisa de cepas de *E. coli* ambientais produção de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL), através do método de aproximação de disco. O antibiótico em que os isolados demonstraram maior resistência foi a Ampicilina 15 (21%). Destaca-se que do total de cepas com perfil de resistência, 32% eram procedentes do lago Água Preta (Utinga), 28% da praia do Farol, 28% da praia do Murubira e 12% do rio Guamá. Dos 70 isolados de *E. coli* examinados, 25 (36%) demonstraram resistência a pelo menos um dos β -lactâmicos testado. Destaca-se que o maior percentual de isolados resistentes, foi detectado no lago Água Preta, importante lago que faz parte do complexo de abastecimento da cidade de Belém-PA. Não foi verificada a produção de ESBL nos isolados. Os dados obtidos demonstram a necessidade de se ampliar o monitoramento da ocorrência de isolados de *E. coli* resistentes a antimicrobianos no ambiente hídrico urbano. Visando garantir a qualidade microbiológica da água a ser distribuída para o consumo da população, assim como no uso recreacional.

Palavras-chave: Água. *Escherichia coli*. Resistência. Antimicrobianos.

ABSTRACT

Water is an vital natural resource for guaranteeing the life of mankind and living beings in general. However, its quality is increasingly in harm, especially due to the urbanization process and to different anthropic activities. The selective pressure exerted by the use of antibiotics has led to the selection of resistant bacteria, and water environment is considered to favor the spread of antibiotic resistance genes, representing a current public and environmental health problem. Thus, the present study is aimed to verify the occurrence of the resistance profile of *Escherichia coli* against β -lactam antibiotics, and to phenotypically identify the isolated producers of extended-spectrum β -lactamase (ESBL). Surface water samples from different water resources (river, lake, and beach), collected from April, 2017 to October, 2018, were analyzed. In addition, microbiological analysis of water samples was performed using the ONPG-MUG Defined Chromogenic Substrate technique. After obtaining *E. coli* isolates, phenotypic tests of biochemical identification and susceptibility profile to β -lactam antimicrobials were performed in every aquatic environment (lake, beach, river). It was also carried out the research of environmental strains of *E. coli* production of extended spectrum β -lactamase (ESBL), by means of the disk approximation method. The antibiotic in which the isolates showed higher resistance was Ampicillin 15 (21%). It is highlighted that out of the strains with resistance profile, 32% came from Água Preta lake (Utinga), 28% from Farol beach, 28% from Murubira beach, and 12% from Guamá river. Of the 70 *E. coli* isolates examined, 25 (36%) demonstrated resistance to at least one of the β -lactames tested. It is noteworthy that the highest percentage of resistant isolates was detected in Água Preta lake, an important lake that is part of the supply complex of the city of Belém, PA. ESBL production was not verified in the isolates. These data demonstrate the need to increase the monitoring of the occurrence of antimicrobial resistant *E. coli* isolates in urban water environments in order to ensure the microbiological quality of water to be distributed for the population's consumption, as well as for recreational use.

Keywords: Water. *Escherichia coli*. Resistance. Antimicrobials.

1. INTRODUÇÃO

A água é um recurso natural indispensável para a manutenção da vida e por muito tempo foi considerada como uma fonte inesgotável. Mesmo tendo sua importância reconhecida, frequentemente sofre contaminação pela ação do homem, gerando vários poluentes que podem provocar problemas ambientais relevantes (OLIVEIRA, 2012). Além do potencial comprometimento na saúde da população, devido à presença e disseminação de enteropatógenos veiculados pela água contaminada por esgotos sanitários (AMARAL et al., 2003).

Destaca-se que além da contaminação por microrganismos, os recursos hídricos são também contaminados por medicamentos, e esse problema preocupa os órgãos de saúde pública, levando-se em consideração que o Brasil é um dos maiores consumidores deste insumo de saúde. Estes contaminantes são oriundos do descarte de sobras de medicamentos de forma irracional, efluentes de esgotos hospitalares e residenciais, do próprio uso após a metabolização e excreção na forma inalterada ou metabólitos ativos, entre outros (REGITANO; LEAL et al., 2010; SOUZA; FALQUETO, 2015).

Entre os medicamentos contaminantes de recursos hídricos, os antimicrobianos são um dos mais citados. Estes fármacos são amplamente utilizados para a prevenção e tratamento de infecções humanas e animais domésticos, estando presente também na pecuária (em fazendas); na criação de animais de cativeiro como na aquicultura e como aditivos alimentares com o intuito de promover o crescimento animal. A consequência desses diversos usos é a ampla liberação de antibióticos para os ecossistemas naturais impactando e mudando o metabolismo das populações microbianas ambientais (SCHNEIDER et al., 2009; CDDEP, 2015).

A disseminação de bactérias patogênicas no ambiente aquático, principalmente aquelas que carregam genes de resistência a antibióticos, é uma preocupação constante já que estes ambientes são propícios para a troca de material genético entre diferentes espécies de microrganismos (SILVA; LINCOPAN, 2012).

A classe dos antibióticos β -lactâmicos é uma das mais utilizadas para combater infecções de origem bacteriana. Para assegurar sua sobrevivência as bactérias utilizam vários mecanismos de resistência para inibir a ação desse fármaco e um dos mecanismos mais utilizados é a inibição enzimática mediada por β -lactamases que após mutações deram origem as Betalactamases de Espectro Ampliado (ESBL), que atuam inibindo os β -lactâmicos de amplo espectro dificultando a terapia com medicamentos desta classe (STEFANIAK et al., 2005; SAHA; JHORA, 2018).

A resistência bacteriana aos antimicrobianos é tão preocupante e urgente, que órgãos como Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) atualizam e elaboram Resoluções da Diretoria Colegiada (RDC's) para o controle do uso de antimicrobianos, sendo que uma das principais é a RDC N° 20 de 2011 que estabeleceu critérios para prescrição, dispensação e controle de embalagens e rotulagem destes fármacos. A última estratégia lançada pela agência foi em 2017, denominado Plano de Ação da Vigilância Sanitária em resistência aos antimicrobianos que foi planejado a partir de recomendações da Organização Mundial de Saúde (OMS) e que devem contribuir para a prevenção e o controle da resistência aos antimicrobianos no âmbito da Vigilância Sanitária (BRASIL, 2017).

No entanto, apesar dos esforços, o Brasil ainda é escasso na parte de infraestrutura, campanhas de conscientização para a população, saneamento básico adequado, entre outros agravantes que impeçam que os contaminantes/poluição cheguem ao ambiente aquático, inclusive que os medicamentos recebam o destino final correto para que não comprometam a saúde humana e o ambiente (UEDA et al., 2009).

Na avaliação de contaminação de recursos hídricos por despejo de esgotos domiciliares e industriais são utilizados como parâmetro de qualidade microbiológica da água, a presença e quantificação de bactérias, em particular, do grupo coliformes, que pertencem à família Enterobacteriaceae, que incluem espécies patogênicas e outras habitantes da microbiota do trato intestinal do homem e dos animais de sangue quente (OLIVEIRA et al., 2012). Diante do cenário da disseminação da resistência bacteriana no ambiente, é relevante verificar o comportamento da *Escherichia coli* quanto à resistência aos antibióticos β -lactâmicos por se tratar de uma classe de medicamentos amplamente utilizados tanto na clínica humana quanto animal.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 - FAMÍLIA ENTEROBACTERIACEAE

As bactérias pertencentes à família Enterobacteriaceae de maneira geral são morfologicamente classificadas como bacilos Gram-negativos que podem ser imóveis ou móveis quando apresentando flagelos peritríquios, não formam esporos, são anaeróbios facultativos e que apresentam como características bioquímicas principais catalase positiva, oxidase-negativa (exceto para o gênero *Plesiomonas* sp). São fermentadores de glicose quase sempre formando gás e convertem nitrato a nitrito. A temperatura ótima para sua manutenção é de 37°C, e são destruídas à temperatura de 60°C (CROXEN et al., 2013).

As enterobactérias são ubíquas, podendo ser encontradas na água, solo, vegetação, e colonizando de forma comensal a microbiota intestinal de humanos e animais de sangue quente, contribuindo para que algumas funções fisiológicas importantes sejam realizadas (OLIVEIRA, 2015). No entanto, algumas bactérias pertencentes a esta família estão envolvidas em processos infecciosos, inclusive os agentes que fazem parte da microbiota normal do trato intestinal, que podem ser encontrados na comunidade e no ambiente hospitalar, podendo causar infecções também em outros sítios como trato urinário, respiratório, na corrente sanguínea e sistema nervoso central, entre outros (LAVAGNOLI et al., 2017).

O fato é que estes agentes podem ser isolados a partir de qualquer amostra clínica. As principais espécies envolvidas nesses processos infecciosos são a *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp, *Enterobacter* sp, *Serratia marcescens*, *Proteus* sp, *Shigella* sp e *Salmonella* sp (OLIVEIRA, 2012).

A contaminação ambiental por esses agentes é de grande preocupação em relação à saúde pública. A presença de *E. coli* em águas de consumo, superficial e recreacional é indicativo de contaminação fecal, por estar em grande quantidade no trato gastrointestinal do homem e animais homeotérmicos, e ainda por este ser seu habitat primário (PEIL et al., 2015).

Destaca-se que a alta concentração destes microrganismos no ambiente aquático, implicará na baixa qualidade da água, que será considerada imprópria para uso no abastecimento público em particular, uma vez que pode ser um indicativo importante da presença de outros agentes entéricos causadores de enfermidades hídricas. A ocorrência destes agentes nesses ambientes pode ser originária de lançamento de esgotos domésticos e efluentes industriais nos corpos hídricos, urbanização desenfreada, poluentes presentes na atmosfera e que são arrastados pela chuva, mudanças climáticas, entre outros fatores (TARDOCCHI et al.,

2014; CHANDRAN; MAZUNDER, 2015).

O lançamento de dejetos humanos nos ecossistemas aquáticos contribui para a propagação de microrganismos patogênicos e resistentes aos antimicrobianos, que podem afetar a saúde da população. Vários estudos demonstraram evidências da ocorrência de isolados de membros da família Enterobacteriaceae com perfil de resistência aos antimicrobianos no ambiente aquático (VASCONCELOS et al., 2010; CAMPOS et al., 2015).

Este fato é de interesse para a saúde pública, levando em consideração que o ambiente aquático está contribuindo para a transferência dos genes de resistência, e conseqüentemente aumento de multirresistência nesta família, ocasionando falência terapêutica no tratamento de algumas enfermidades provocadas por essas bactérias (VASCONCELOS et al., 2010; SILVA e LINCOPAN, 2012).

2.2 - *Escherichia coli*

2.2.1 - Aspectos Gerais

Entre as bactérias pertencentes à família Enterobacteriaceae a *Escherichia coli* é a mais pesquisada por ser um comensal habitante do trato intestinal humano e de animais de sangue quente, sendo considerada importante indicadora de contaminação fecal do ambiente aquático e de alimentos (RASHEED et al., 2014).

É uma enterobactéria que foi considerada no início inofensiva, entretanto, em condições onde o hospedeiro é suscetível, o comensalismo existente pode ser quebrado, fazendo com que a partir deste acontecimento, a bactéria torne-se capaz de causar infecções intestinais e extra intestinais (NATARO; KAPER, 1998; RASHEED et al., 2014).

Destaca-se que as variedades de importância clínica estão frequentemente associadas com a diarreia infantil, septicemia, meningite neonatal, infecção urinária, entre outras enfermidades (HAMELIN et al., 2007; CHO et al., 2018).

Quanto ao perfil sorológico, as *E. coli* abrangem um número extenso de grupos e sorotipos, e a classificação é baseada na identificação de antígenos O (somático), H (flagelar) e K (capsular) (KAPER, 1998; NATARO). Deste modo, são descritas seis categorias de *E. coli* patogênicas que podem causar infecção intestinal no homem e que são denominadas como *E. coli* diarreiogênicas, sendo que a classificação destes patótipos depende de algumas particularidades, principalmente seus fatores de virulência que envolvem a presença de adesinas fimbriais e não fimbriais, toxinas, invasinas, entre outros (SOUZA et al., 2016). Elas são classificadas em: *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* produtora da toxina *Shiga* (STEC) (enterohemorrágica/EHEC), *E. coli* enteroinvasiva

(EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* com aderência difusa (DAEC) (CAMPOS et al., 2004; ROCHA et al., 2017). As *E. coli* que estão envolvidas em processo infeccioso extra intestinal são denominadas como EXPEC (*Extraintestinal Pathogenic E. coli*) (KAPER et al., 2004).

2.2.2 - Classes Diarreiológicas

a) *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC).

Das variantes de *E. coli* diarreiológicas, a EPEC foi a primeira identificada em 1945 pelo pesquisador John Brey. Seu estudo teve início a partir de um surto de gastroenterite infantil ocorrido no Reino Unido que estaria sendo causada por uma cepa patogênica de *E. coli*. Os achados de seu estudo reforçaram o reconhecimento da capacidade patogênica da *E. coli* denominada enteropatogênica, esta categoria foi associada a importantes casos de diarreias em crianças menores de cinco anos de idade, sendo mais frequente em crianças menores de dois anos, pertencentes às classes econômicas menos favorecidas de países em desenvolvimento (OLIVEIRA, 2012; BETTELHEIM, 2014).

As EPEC podem ser veiculadas pela água e alimentos contaminados. A colonização da bactéria ocorre no intestino delgado, a partir da sua aderência às células epiteliais onde causa lesões denominadas “*attaching and effacing*” (A/E), neste tipo de lesão ocorre a destruição das microvilosidades do intestino e rearranjo do citoesqueleto celular, o desfecho dessas ações é a formação de uma estrutura comparada a um pedestal ao qual a bactéria permanece aderida ao epitélio (KAPER et al., 2004; ROCHA et al., 2017). A consequência da lesão A/E, é a deficiência na absorção de nutrientes pelo intestino, promovendo desequilíbrio eletroquímico e conseqüentemente a diarreia (SHAW et al., 2005; CLARK, 2016). Geralmente, o quadro de diarreia provocada pela EPEC é agudo, podendo ainda ser leve ou grave, acompanhada de vômito e febre baixa (RODRIGUEZ-ANGELEZ, 2002).

As EPEC foram classificadas em EPEC típica (EPEC-t) e atípica (EPEC-a), elas apresentam algumas similaridades, como a não produção da toxina *Shiga* (*stx*) e a capacidade de causar a lesão A/E. O fator que as diferencia geneticamente é a presença do plasmídeo EAF (*EPEC adherence factor*) na EPEC típica, esse plasmídeo é responsável por transportar o gene *bfpA* que por sua vez é responsável por sintetizar a fimbria BFP (*bundle forming pilus*). As fimbrias dão início a adesão da EPEC no epitélio intestinal, além de manter as bactérias ligadas entre si (GOMES et al., 2016; ROCHA, 2017).

O padrão de aderência entre as duas espécies de EPEC também apresentam diferença

já que na EPEC-t apresenta unicamente o padrão de adesão localizado (AL) enquanto que a EPEC-a apresenta o padrão “Localizada Like” (LAL) mas, também pode apresentar a adesão difusa (AD) e adesão agregativa (AA) (TRABULSI; ALTERHUM, 2015).

As EPEC-t ocorrem somente em humanos enquanto que as EPEC-a são isoladas de humanos e de vários animais como bovinos, suínos, bubalinos equinos, aves e animais domésticos (ISHII et al., 2007; WATSON, 2017).

b) *Escherichia coli* enteroinvasora (EIEC).

A EIEC é reconhecida como um patógeno causador de diarreia. No homem após invasão do cólon, promove intensa reação inflamatória, resultando em lesões semelhantes às que são características da shigelose ou disenteria bacilar, como: diarreia aquosa, muco sanguinolento, dores abdominais, febre e mal-estar generalizado (UD-DIN; WAHID, 2014; NAVE et al., 2016). O mecanismo de patogenicidade da EIEC se dá após a invasão do epitélio intestinal e em seguida ocorrem etapas como penetração nos enterócitos, lise do endossomo, multiplicação intracelular, movimentação intracitoplasmática direcionada e migração basolateral o que culmina com a destruição do epitélio do cólon (RODRIGUEZ-ANGELES, 2002; PARSOT, 2005).

Existe similaridade entre a EIEC e a *Shigella* sp quanto a patogenicidade, genética e características bioquímicas, inclusive existem dificuldades em diferenciar suas estirpes pela sorotipagem já que os antígenos são quase idênticos (UD-DIN, 2014). Ainda em relação a esta semelhança elas apresentam as mesmas invasinas de origem plasmidial (Ipa, Ics, IpgC) e também uma enterotoxina termolábil de origem cromossomal (ShET2), no entanto, a EIEC não produz a toxina *Shiga*. A EIEC é caracterizada bioquimicamente por apresentar lisina, lactose e motilidade negativas, e essas características a diferenciam das outras *E. coli* diarreio gênicas (CROXEN, 2013; LEÃO, 2013; GOMES et al., 2016).

Embora a EIEC seja reconhecida como um agente etiológico de diarreia, poucos estudos foram realizados para estimar a frequência de doenças relacionadas a este patógeno, assim como verificar os fatores de risco individuais e potenciais reservatórios. É um agente etiológico considerado raro quando comparado com outros enteropatógenos causadores de diarreia (UD-DIN, 2014).

c) *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC).

As ETEC estão associadas a uma das causas mais frequentes de diarreias em crianças de países em desenvolvimento, é também a causa mais comum da chamada “diarreia do viajante”, acometendo indivíduos que se deslocam de países desenvolvidos para países em desenvolvimento, que não dispõem de água de boa qualidade e as condições de saneamento básico são precárias (CABRAL, 2010; GOMES et al., 2016).

Desde que foi reconhecida como um patógeno de importância clínica, os dados estatísticos anuais relativos à ETEC demonstraram que aproximadamente 325.000 crianças menores de cinco anos morrem por infecção causada por este patógeno. Estes dados são de estudos realizados em países em desenvolvimento (CROXEN, 2013). Dados epidemiológicos demonstram que no Brasil, entre os anos de 1987 e 2007, houve um percentual que variou entre 3,5 a 20,45% de doença diarreica aguda provocada por ETEC (GOMES et al., 2016).

Esta categoria de *E. coli*, produz as enterotoxinas plasmidiais termolábil (LT) e a termoestável (ST). Nas infecções causadas por este patógeno, essas toxinas podem ser encontradas isoladamente ou em conjunto (RODRIGUEZ-ANGELES, 2002).

Após a colonização e a liberação das toxinas, ocorrem eventos intracelulares que culminam no desequilíbrio iônico com a estimulação da secreção de cloreto e a inibição da captação de NaCl, o que provoca a diarreia aquosa profusa, podendo vir acompanhada de câimbras, dores abdominais, vômito e febre. O quadro diarreico geralmente é leve, mas há casos em que pode ser grave (QADRI et al., 2005; GOMES, 2014; SOSPEDRA et al., 2017).

As toxinas ST também são subdivididas em STa, que está envolvida com doenças em humanos estimulando a secreção de íon cloreto, e STb que geralmente é encontrada em suínos. É responsável por causar dano no epitélio intestinal levando a perda das vilosidades, e ainda estimula a secreção de bicarbonato pelas células do epitélio intestinal (QADRI et al., 2005; GOMES et al., 2016).

Além das toxinas, outros fatores da patogênese de ETEC são marcantes como os fatores de colonização (CFA), pois, garantem que a bactéria se ligue fortemente e especificamente, em receptores da mucosa intestinal favorecendo a liberação das toxinas para o epitélio (CROXEN, 2013).

d) *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC/STEC).

Atualmente é denominada *E. coli* produtora de toxina *Shiga*. Constitui importante causa de doenças veiculadas por alimentos. Os sintomas relacionados à infecção podem variar desde um desconforto intestinal leve até quadros mais graves como colite hemorrágica (CH),

síndrome hemolítica urêmica (SHU) e púrpura trombocitopênica trombótica (PTT) (MITTELSTAEDT; CARVALHO, 2006; MAJOWICZ et al., 2014).

A diarreia causada por EHEC/STEC pode durar de 5 a 10 dias, e no geral é autolimitada, a persistência deste sintoma pode favorecer a invasão da bactéria para a corrente sanguínea e a sequência deste episódio é a adesão bacteriana ao endotélio renal e liberação de toxinas, causando obstrução e micro vascularização o que leva a forma mais severa da infecção, a Síndrome hemolítica urêmica (SHU), que é caracterizada por anemia hemolítica, trombocitopenia e falência renal aguda que pode ser fatal (MITTELSTAEDT; CARVALHO, 2006; ROSA et al., 2016).

Os graves sintomas causados pelas cepas de STEC em humanos estão relacionados com a produção da toxina *Shiga* (TS), que é considerada uma toxina potente, sendo classificadas como Stx1 e Stx2, essas toxinas provocam danos celulares aos hospedeiros. Destaca-se que entre as classes diarreiogênicas de *E. coli*, as produtoras da toxina *Shiga* (EHEC/STEC) são consideradas mais patogênicas relacionadas com infecções humanas (KOOCHAKZADEH et al., 2014; ROSA et al., 2016).

Quanto aos fatores de virulência a Stx1 possui homologia estrutural e funcional com a toxina *Shiga* que é produzida pela *Shigella dysenteriae* tipo 1, e possui três variantes, já a Stx2 se mostra bastante heterogênea, pois apresenta sete variantes e demonstra-se que Stx2 é cem vezes mais tóxica para o homem do que a Stx1, outra característica de Stx2 é que ela está mais frequentemente associada com a SHU e ainda pode causar lesão A/E no epitélio intestinal pela presença do gene de origem cromossomal *eae* como acontece na EPEC, além da presença de enterohemolisinas, que reforça sua patogenicidade (NGUYEN, 2012; CROXEN; FINLAY, 2013; BASU et al., 2016).

Esse grupo de *E. coli* possui mais de 50 sorotipos, sendo que o O157:H7 é o mais comum e mais bem caracterizado (MITTELSTAEDT; CARVALHO, 2006). O sorotipo O157:H7 passou a ser considerado um importante patógeno para doenças veiculadas por alimentos a partir da década de 80 através dos registros de surtos de origem alimentar nos Estados Unidos devido à ocorrência do sintoma de colite hemorrágica que foi originado depois do consumo de alimento contaminado por este patógeno, e na década seguinte infecções causadas por EHEC foram relatadas em mais de 30 países com registros de grandes surtos no Japão, Costa Rica, Estados Unidos e Escócia (MITTELSTAEDT; CARVALHO, 2006; BERTÃO; SARIDAKIS, 2007).

No Brasil apesar de já terem sido isolados em alguns processos de doença, não foram relatados surtos causados por EHEC/STEC, crianças menores de dez anos e idosos estão entre

os principais grupos de risco, sendo que a frequência é maior em crianças menores de 4 anos (MITTELSTAEDT; CARVALHO 2006; CALDORIN et al., 2013; CROXEN et al., 2013).

Destaca-se que as EHEC/STEC são encontradas na microbiota intestinal de vários animais como ovinos, caprinos, aves, suínos, animais domésticos e bovinos. Sua transmissão ocorre pelo consumo de água e alimentos contaminados e de pessoa a pessoa, sendo que os alimentos de origem bovina contaminados representam um meio de transmissão, levando em consideração que o gado é o principal reservatório deste grupo de bactérias (NATARO; KAPER, 1998; BERTÃO; SARIDAKIS, 2007).

e) *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC).

As cepas de EAEC estão associadas com diarreia aquosa e mucoide, podendo ser ou não sanguinolenta, e ainda vir acompanhada de dor abdominal, vômitos e febre baixa. A diarreia aguda, é autolimitada e mais frequente, mas dependendo de fatores inerentes ao hospedeiro, pode ser persistente podendo ter a duração superior a 14 dias (GOMES et al., 2016), em muitos casos parece causar infecção subclínica ou apenas colonização intestinal (LIMA et al., 2013).

A infecção causada por EAEC acomete principalmente crianças nos países em desenvolvimento, porém, pode causar diarreia persistente em adultos. É o segundo agente mais frequentemente relacionado à gastroenterite em turistas que se deslocam para países subdesenvolvidos (HUANG et al., 2007; OKHUYSEN; DUPONT, 2010).

Dos fatores de virulência da EAEC o padrão de aderência agregativa A/A é o mais importante, este padrão é responsável pela expressão de fímbrias denominadas *aggregative adherence factors* (AAF I, II, III, IV) (GOMES, 2016).

A EAEC produz uma toxina termolábil e uma citotoxina termoestável enteroagregativa além de secretar toxinas do tipo ST e hemolisina (PIAZZA et al., 2009; JONSON, 2015). São sugeridos três estágios para a patogênese de EAEC: 1º- adesão das fímbrias agregativas ao epitélio intestinal; 2º- produção de biofilme e aumento da secreção de muco pelos enterócitos; 3º- resposta inflamatória com liberação de citosinas provocando danos ao epitélio intestinal e aumento de secreção de fluido intestinal (HUANG et al., 2007).

f) *Escherichia coli* Difusamente Aderente (DAEC).

Inicialmente, a denominação *E. coli* difusamente, era utilizado para denominar qualquer *E. coli* que aderisse às células HEP-2 e He-Laque sem formar microcolônias típicas de EPEC, com a identificação da EAEC, a DAEC foi reconhecida como uma categoria

independente e capaz de causar diarreia. Esta categoria tem como característica de induzir efeito citopático através de lesões nas microvilosidades por aderência das bactérias. Estão associadas com diarreia em crianças maiores de doze meses (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

Estudos têm revelado que DAEC é isolada na mesma frequência entre pacientes sintomáticos com quadro de diarreia, como em assintomáticos. Este patógeno foi revelado como causador de diarreia em pacientes internados na França sem a presença de nenhum outro patógeno envolvido na infecção, demonstrando que DAEC pode estar presente também em países desenvolvidos (TADDEI, 2005).

É considerada uma categoria controversa e sua associação com diarreia no Brasil já foi demonstrada, mas, somente em crianças com idade inferior a 12 meses (SCALETSKY, 2002), porém, em alguns estudos DAEC foi associada em causar diarreia em crianças com cerca de cinco anos de idade inclusive relacionando o risco de diarreia causada por DAEC com o aumento de idade. Estudos também demonstram a presença de DAEC ser mais frequente em pacientes assintomáticos do que em sintomáticos (TADDEI, 2005).

2.3 - ANTIBIÓTICOS B-LACTÂMICOS: VISÃO GERAL

A classe dos antimicrobianos β -lactâmicos, é amplamente prescrita para o tratamento das mais diversas infecções. A característica comum entre os membros desta classe, é a presença do anel beta-lactâmico em sua estrutura química. Fazem parte desta classe as penicilinas, as cefalosporinas, os carbapenêmicos e os monobactâmicos (GOODMAN; GILMAN, 2012). Esta classe de antimicrobianos demonstra vantagem por ter alta especificidade, e por ser considerada de baixa toxicidade para a célula do hospedeiro (KOHANSKI et al., 2010; RAWAT; NAIR, 2010).

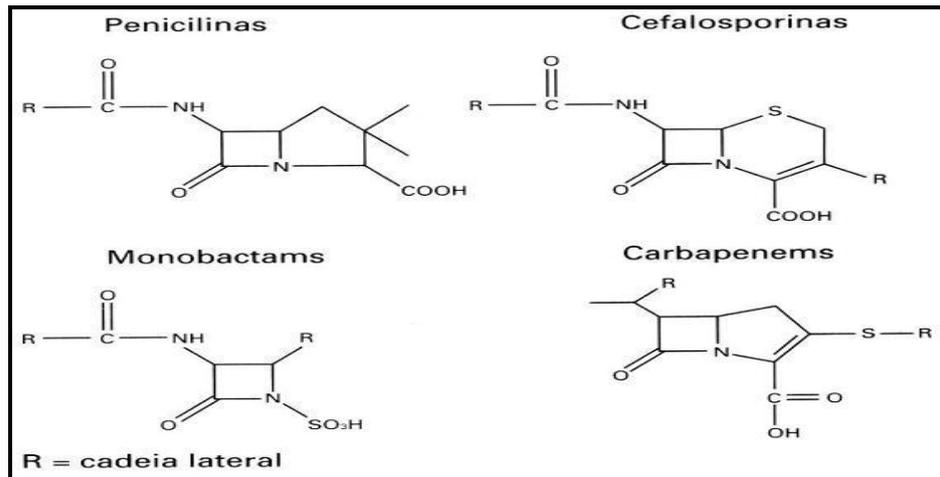


Figura 1 - Subclasse dos antibióticos β -lactâmicos, penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos.

Fonte: ICB/USP.BR.

Os β -lactâmicos têm a capacidade de destruir as bactérias sensíveis, através da inibição da formação das ligações cruzadas das cadeias de peptidoglicano, presentes na parede celular da bactéria e são necessárias para dar rigidez, o que lhe confere proteção. Esses antibióticos, agem ao se ligar de forma irreversível à enzima transpeptidase, também conhecidas como proteínas ligadoras de penicilinas (PLPs), e são responsáveis pela síntese dessas ligações. O resultado desses eventos, é a formação de uma parede celular mais fraca, que ocasiona lise celular. Os fármacos que fazem parte desta classe compartilham do mesmo mecanismo de ação, variando somente na PLP ao qual se ligará, levando em conta que cada microrganismo possui várias PLPs (GELLATI et al., 2009; GOODMAN; GILMAN, 2012).

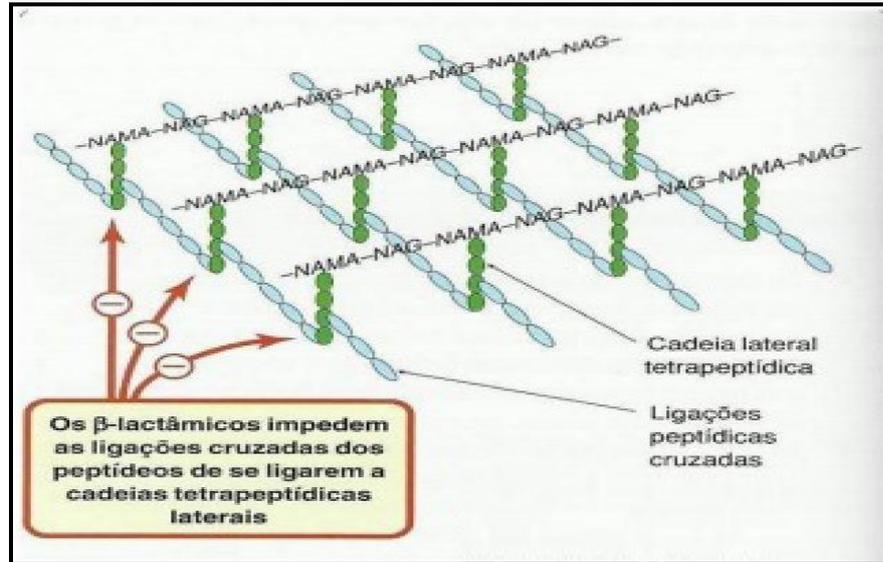


Figura 2 - Representação de uma camada única de peptidoglicano (NAG/NAM) mostrando o local de ação dos β -lactâmicos. **Fonte:** RANG et al., 2007.

2.4 - RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS: VISÃO GERAL

Os antimicrobianos são indispensáveis para o tratamento de infecções e diminuição das mortes ocasionadas por microrganismos, no entanto, o uso frequente, de forma indiscriminada além do descarte realizado de forma inadequada dessas substâncias, aumenta o risco de bactérias desenvolverem mecanismos de resistência frente aos antimicrobianos. Destaca-se que atualmente este é um problema mundial, pois com o aumento da circulação de cepas resistentes as opções de tratamento diminuem o que pode levar a falência terapêutica (TADESSE et al., 2012; HAHN et al., 2015).

A escolha correta do antimicrobiano por parte do prescritor é um fator importante que pode evitar a pressão seletiva exercida sobre as bactérias e conseqüentemente, a diminuição de cepas resistentes. Outro fator que merece atenção é o uso racional do antibiótico pelo usuário, enfatizando a importância da utilização deste recurso pelo tempo correto que foi prescrito, pois, ao utilizar o antibiótico em um tempo inferior ao determinado, o antimicrobiano não completa sua ação de inibição ou destruição da bactéria (UEDA et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2015).

Os mecanismos que permitem a bactéria adquirir resistência podem incluir a aquisição de elementos genéticos como os transposons que vão codificar o mecanismo de resistência e das mutações que ocorrem em consequência da pressão exercida pelos antibióticos. Desta forma, a resistência antimicrobiana pode surgir de qualquer uma das etapas necessárias para que o fármaco atinja seu alvo como: o acesso reduzido do antibiótico ao patógeno, aumento

da eliminação do antibiótico por bombas de efluxo, liberação de enzimas microbianas que destroem o fármaco, alteração das proteínas microbianas que transformam os pró-fármacos em moléculas ativas, alteração das proteínas alvos e desenvolvimento de vias metabólicas alternativas às que foram suprimidas pelo antibiótico (GOODMAN; GILMAN, 2012).

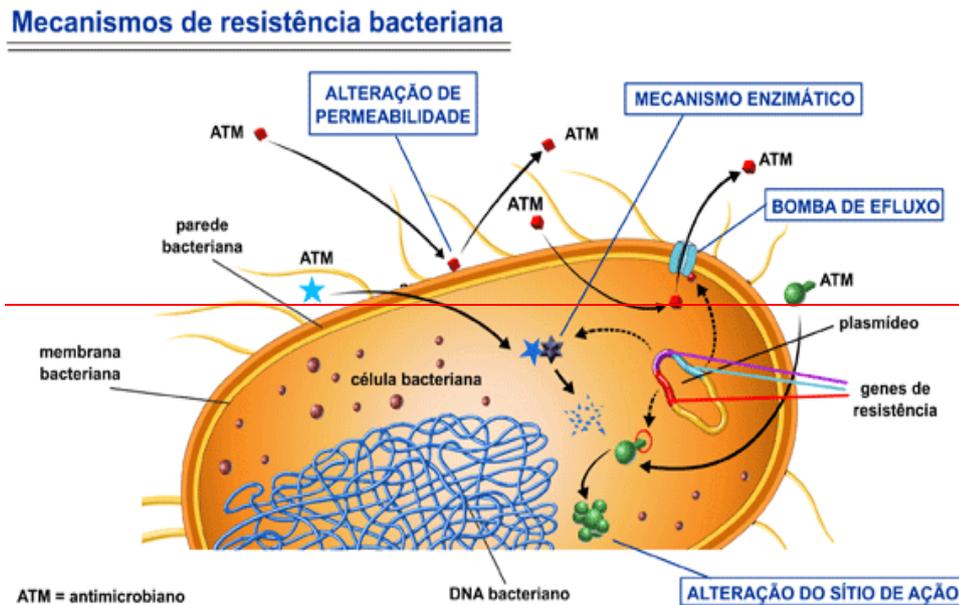


Figura 3 - Desenho esquemático dos principais mecanismos de resistência aos antibióticos.

Fonte: BRASIL, 2007.

Os mecanismos desenvolvidos pelas bactérias para sua defesa diante dos antimicrobianos assegurando sua sobrevivência no ambiente podem ser de origem intrínseca ou extrínseca e tem relação com o aumento da resistência (LOUREIRO et al., 2016). O mecanismo de resistência extrínseco está relacionado com a habilidade das bactérias em trocar elementos móveis (plasmídeos, transposons e integrons) que estão presentes na bactéria e lhe confere habilidade em desenvolver mecanismos que impedem que o fármaco atinja seu objetivo que é caracterizada como resistência adquirida.

A troca de elementos móveis ocorre pelos processos de conjugação, transformação e transdução. Outro fenômeno relacionado ao aumento da resistência é o da seleção natural, esse tipo de mecanismo é conhecido como intrínseco, é caracterizado pelo microrganismo possuir o gene de resistência a determinado antimicrobiano (BARCELLOS et al., 2016; LOUREIRO et al., 2016).

Os elementos genéticos móveis, são necessários para que as bactérias recebam material genético vindos de outras bactérias. Os plasmídeos são os elementos móveis mais

envolvidos nessas trocas, são caracterizados por DNA extra cromossômico, circular ou linear de cadeia dupla e que se autorreplicam, evoluem integralizando-se ao genoma bacteriano adicionando funções à bactéria como transportar genes de um fenótipo vantajoso, como por exemplo, o mecanismo de resistência aos antibióticos (RIBEIRO; CORTINA, 2016).

Os plasmídeos são também capazes, de transportar os genes de resistência de mais de um tipo de antibiótico, sem contar que uma bactéria pode possuir mais de um plasmídeo com informações de mais de um gene de resistência a antibióticos. Contribuindo assim para o surgimento de multirresistência (GUIMARÃES et al., 2010; BORTOLOTTI et al., 2018).

No Brasil, foi criada uma Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) Nº 20/10 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, Ministério da Saúde, que restringiu o uso de antimicrobianos de forma irracional, através do controle da prescrição deste medicamento, prevenindo desta forma possíveis surtos de resistência bacteriana (BRASIL, 2017).

Os problemas relacionados à resistência de microrganismos aos antibióticos, foram motivadores para que a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) lançasse em 2017 o Plano de Ação da Vigilância Sanitária em Resistência aos Antimicrobianos, é uma ferramenta que segue as recomendações de um plano da Organização Mundial de Saúde (OMS). No plano, as estratégias devem contribuir para a prevenção e o controle da resistência aos antimicrobianos (BRASIL, 2017). Neste documento, são relacionadas, as estratégias da ANVISA a respeito dos antimicrobianos que já estavam em execução anteriormente a este plano que cita que a,

(...) ANVISA vem realizando, desde a sua criação, ações relacionadas à resistência aos antimicrobianos, dentre as quais se destacam: a prevenção e o controle de infecções e da resistência em serviços de saúde; a regulação e o controle da venda de antimicrobianos; a vigilância de IRAS; a vigilância de surtos de infecções, novos mecanismos de resistência e microrganismos multirresistentes em serviços de saúde; o monitoramento da qualidade de medicamentos, incluindo os antimicrobianos; o estabelecimento de limites para resíduos de medicamentos veterinários em alimentos; e a verificação da presença de microrganismos resistentes em alimentos específicos (BRASIL/ANVISA, 2017, p.13-14).

De fato, a resistência a antimicrobianos, é vista como um problema de saúde pública, levando em consideração sua vasta ocorrência, que foi além do ambiente hospitalar, incorporando-se a ambientes naturais, como água e solo (KÜMMERER, 2004; LOUREIRO et al., 2016).

2.4.1 - Beta-lactamases

O mecanismo de resistência mais marcante na classe dos β – lactâmicos, ocorre pela ação da enzima Betalactamase, que possui a capacidade de hidrolisar o anel β -lactâmico, inativando o antibiótico, impedindo que ele se ligue ao seu alvo, não permitindo que o efeito da droga seja obtido (TEKINER; ÖZPINAR, 2016).

O uso das várias gerações de antibióticos β -lactâmicos, com diferentes espectros de ação, favoreceram as bactérias para que elas também produzissem beta-lactamases cada vez mais potentes. Fazendo com que as opções terapêuticas desta classe sejam cada vez mais limitadas (GHAFOURIAN et al., 2015).

As beta-lactamases podem ser de origem constitutiva ou indutiva. São codificadas em genes presentes em cromossomos, ou por elementos genéticos móveis como os transposons, integrons e plasmídeos. Atualmente as beta-lactamases podem ser classificadas conforme a propostas de Ambler, e Bush, Jacoby e Medeiros. Na proposta de Ambler elas são classificadas quanto a estrutura molecular da enzima em 4 grupos de A – D. Essa classificação é conhecida como classe molecular de Ambler e provavelmente é a mais utilizada. Por outro lado, a classificação de Bush, Jacoby e Medeiros leva em consideração o perfil de inibidores de beta-lactamases que inclui enzimas de grupos I a IV com subdivisões. (SILVA e LINCOPAN, 2012; ANDRADE, 2017).

As beta-lactamases são diferenciadas através da sua estrutura primária agrupadas em diferentes famílias a partir das formas parenterais conhecidas como TEM-1 e SHV-1 (WOERTHER et al., 2014; PHILIPPON et al., 2015; ALMEIDA, 2017).

- Enzimas Classe A ou Grupo II hidrolisam penicilinas e cefalosporinas
- Enzimas Classe B ou Grupo III hidrolisam carbapenêmicos
- Enzimas Classe C ou Grupo I hidrolisam cefalosporinas
- Enzimas Classe D hidrolisam penicilinas e cloxacilina
- Enzimas IV (penicilinases de *Pseudomonas cepacia*)

Nas bactérias Gram-negativas, as beta-lactamases estão retidas no espaço periplasmático, onde inativam os antibióticos, impedindo que ele chegue ao seu local de ação, conforme mostra a figura 4.

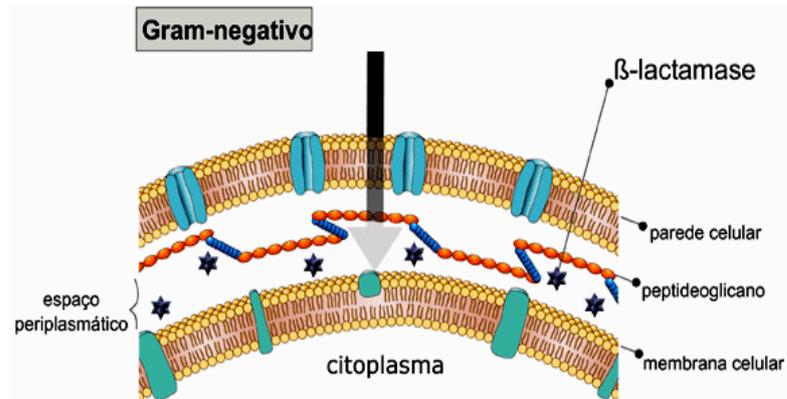


Figura 4 - Local de ação das enzimas beta-lactamases em bactérias Gram-negativas.

Fonte: BRASIL/ANVISA, 2008.

Enquanto nas bactérias Gram-positivas, essas enzimas são secretadas para o meio ambiente como exoenzimas (Figura 5).

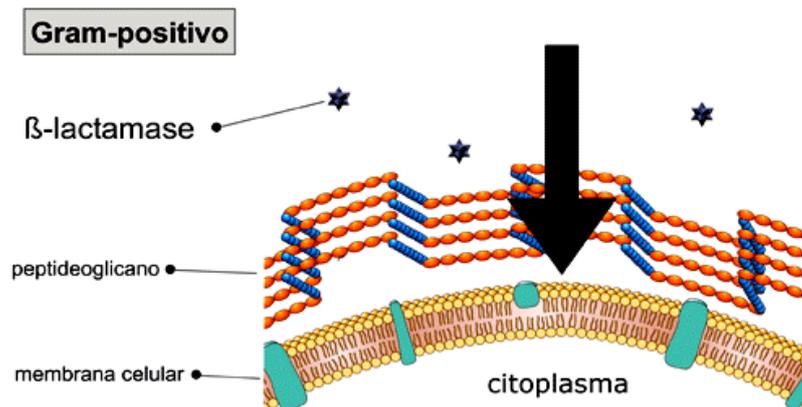


Figura 5 - Local de ação das enzimas beta-lactamases em bactéria Gram-positiva.

Fonte: BRASIL/ANVISA, 2008.

As várias enzimas que pertencem ao grupo das beta-lactamases são clinicamente importantes, no entanto quando se trata da família Enterobacteriaceae as enzimas beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) merecem destaque (MARTINEZ-MARTINEZ et al., 2014). A produção dessas enzimas tem sido de extrema importância na detecção da resistência de enterobactérias aos β -lactâmicos (ANDRADE, 2017).

2.4.1.1 - Beta-lactamases de Espectro Estendido (ESBL)

As enzimas Beta-lactamases de espectro estendido (ESBL), são reconhecidas por conferir resistência à bactéria contra os antibióticos da classe dos β -lactâmicos como as penicilinas, cefalosporinas e aztreonam (GHAFOURIAN et al., 2015; SAHA; JHORA, 2018). Estão presentes na família Enterobacteriaceae e se estenderam também para outras famílias de bactérias Gram-negativas (RAWAT; NAIR, 2010).

O sequenciamento do genoma de cepas produtoras de ESBL, revelou que elas são derivadas das Beta-lactamases parentais TEM e SHV a partir de mutações pontuais em sua estrutura primária. Posteriormente foi descoberta outra ESBL que não é derivada dessas duas enzimas, e que foi denominada CTX-M. Esta enzima, apresenta capacidade hidrolítica em cefalosporinas de amplo espectro (PARK et al., 2012; ANDRADE, 2017).

As infecções causadas por microrganismos produtores de ESBL, têm demonstrado ser um grande desafio terapêutico em todo o mundo, principalmente em pacientes hospitalizados onde os riscos para disseminação de ESBL estão relacionados à administração indiscriminada de cefalosporinas de espectro estendido. Internação hospitalar de longa duração, ventilação mecânica e cateterismo, são fatores que podem ser determinantes para a colonização de bactérias produtoras de ESBL (SAHA; JHORA, 2018).

A prevalência de ESBL tem sido observada em *Klebsiella* sp e *E. coli*, mas sua ocorrência já foi observada em outros membros da família Enterobacteriaceae como: *Proteus* sp, *Providencia* sp e *Enterobacter* sp. Ressalta-se que as primeiras cepas de bactérias produtoras de ESBL foram identificadas em hospitais. Este cenário mudou, já que cepas produtoras dessa enzima foram observadas em pacientes na comunidade. Em hospitais, as linhagens bacterianas com perfil ESBL podem permanecer por muito tempo no ambiente ocasionando surtos (AUGUSTI, 2007; ALMEIDA, 2017).

2.5 – IMPACTO DECORRENTE DA DISSEMINAÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA NO AMBIENTE AQUÁTICO SOBRE A SAÚDE HUMANA

A degradação do meio ambiente, como resultado das ações humanas tem comprometido a qualidade de vida da população e esta ameaça é constante, de modo que, os recursos naturais que são essenciais para a manutenção e qualidade de vida, vêm sofrendo mudanças negativas, o resultado dessas ações é observado na alteração dos fatores ambientais, como por exemplo, na mudança da sazonalidade e na escassez e qualidade da água para o consumo humano (JOVENTINO et al., 2010).

Atualmente, um dos maiores problemas enfrentados em relação à saúde pública são as doenças infecciosas e parasitárias veiculadas pela água, principalmente em países subdesenvolvidos onde a oferta deste recurso, em sua maioria, não está dentro dos padrões aceitáveis para o consumo, tendo em vista que o saneamento básico muitas vezes é precário, ineficiente ou não é ofertado (MARTINS et al., 2015).

A partir da premissa, que a água é essencial para a vida. Seu acesso deve ser garantido a todos de forma segura e livre de microrganismos, e em resposta a essa oferta, é observado que quando a população dispõe de água potável de qualidade, é notória a melhoria da saúde e da qualidade de vida da população (CABRAL, 2010).

Com o aumento populacional, as condições sanitárias de várias comunidades urbanas declinaram devido ao aumento de descargas de origem orgânica em efluentes dos corpos hídricos, contribuindo de forma significativa para o aumento da disseminação de microrganismos patogênicos, incluindo os que carregam genes de resistência a antibióticos (VASCONCELOS et al., 2010).

Diante deste fato, há uma preocupação constante por parte das autoridades sanitárias quanto ao sistema de abastecimento de água, destino de dejetos, tratamento de esgoto, coleta e destinação de resíduos sólidos gerados. Essa preocupação é relevante, já que todos os fatores citados podem convergir em sérios problemas ambientais, e conseqüentemente na saúde pública se não forem realizados corretamente (TORRES et al., 2012).

A proteção dos recursos hídricos, principalmente de excretas humanas e animais é essencial para que estes recursos não sejam contaminados por microrganismos de origem intestinal, inclusive os portadores de genes de resistência. A água contaminada por microrganismos de origem intestinal, representa risco de infecção ao ser ingerida ou ser usada para realizar atividades como: preparo de alimentos, higiene e lazer (SÁ et al., 2005; VASCONCELOS et al., 2010)

Outro fator preocupante, é o aumento da presença de fármacos em mananciais o que também compromete a qualidade da água impactando de forma negativa os ambientes aquáticos. A presença de antibióticos na água, pode por exemplo, contribuir para a seleção de bactérias resistentes (TORRES et al., 2012).

A presença de bactérias resistentes a antibióticos, ocorre em diversos ambientes aquáticos como rios, áreas costeiras, esgoto doméstico e hospitalar, sedimentos, águas superficiais, lagos, oceanos e água potável, o que faz com que a água, seja considerada um meio de disseminação, dispersão e evolução desses patógenos.

Por meio da água os genes de resistência são incorporados no ecossistema aquático, fazendo com que a população de microrganismos do ambiente seja alterada (CAUMO et al., 2010). Outro agravante para a disseminação de resistência no ambiente aquático são os lançamentos de resíduos dos processos relacionados à indústria farmacêutica, que podem gerar toxicidade para o meio ambiente, já que a grande maioria desses resíduos não são biodegradáveis (ARIAS; CARRILHO, 2012).

A Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) Nº 306/04 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) que trata do gerenciamento de resíduos, dispõe sobre o regulamento técnico de resíduos dos serviços de saúde, no entanto, este gerenciamento só tem aplicação nos sistemas de saúde não sendo estendido para o descarte doméstico de antibióticos. Desta forma, o descarte realizado pelo consumidor final é um fator de risco para a contaminação ambiental, pois através da pressão seletiva, ocorre o aumento de bactérias resistentes a antibióticos neste ambiente (ALVARENGA; NICOLETTI, 2010; BORTOLOTTI, 2018).

O impacto para a saúde humana diante do perfil de resistência bacteriana é preocupante. Após a descoberta do antibiótico, pouco tempo depois já se observava a ocorrência de resistência, e atualmente a possibilidade de óbitos ocasionados por infecções bacterianas, particularmente no ambiente hospitalar, é um fator crescente e preocupante (VASCONCELOS et al., 2010; VIEIRA; VIEIRA, 2017).

Destaca-se que, o reconhecimento da resistência bacteriana aos antimicrobianos é de grande importância, visto como um grave problema de saúde pública, ocasionando falha terapêutica e com isso prolongamento do tratamento e internações onerando o serviço público de saúde. Deste modo, a conscientização de profissionais para que a prescrição seja racional, e ainda da população para o uso e descarte adequado destes fármacos entre outros fatores merece atenção urgente, visando reduzir os riscos à saúde humana e ambiental (ARIAS; CARRILHO, 2012).

Dos mais variados tipos de resíduos que são despejados nos recursos hídricos os medicamentos representam um importante contaminante até porque no Brasil os antibióticos são utilizados de maneira excessiva, seja no uso humano ou animal (REGINATO; LEAL, 2010). Essa condição foi evidenciada, recentemente, em um relatório divulgado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) sobre a vigilância do consumo de antibióticos que coloca o Brasil com uma média de uso de antibióticos superior aos países da Europa, e ocupando a liderança nas Américas, esses dados atribuem ao Brasil a condição de um dos maiores consumidores de medicamentos do mundo (WHO, 2018).

A Organização Mundial da Saúde (OMS), a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) e a Organização Mundial para a Saúde Animal (OIE), lançaram estratégias para minimizar a disseminação da resistência a antibióticos, objetivando: garantir que os agentes antimicrobianos continuem a ser eficazes e úteis para curar doenças em seres humanos e animais; promover o uso prudente e responsável dos agentes antimicrobianos; e garantir o acesso global a medicamentos de boa qualidade (INSSTAG et al., 2011; DIEZ, 2013).

Essas medidas surgem a partir do termo “ONE HEALTH- Saúde Única”. Este termo apesar de antigo, ultimamente vem sendo bastante abordado, principalmente a cada surto de doenças registrado (WALLACE et al., 2014). A definição do termo, expõe a necessidade das abordagens integradas onde a saúde humana e a saúde animal são interdependentes e ligadas à saúde dos ecossistemas em que eles estão inseridos (INSSTAG et al., 2011).

A resistência antimicrobiana está presente nesta abordagem holística, levando em consideração que o antibiótico é um insumo de saúde que está presente, na saúde humana, animal, na pecuária, aquicultura entre outros. Inclusive os dados relacionados ao uso dos antibióticos no manejo animal precisam ser também monitorados/fiscalizados. As medidas preventivas são necessárias para a garantia da saúde da população em geral, daí a importância desta abordagem “ONE HEALTH” (INSSTAG et al., 2011; WALLACE et al., 2014).

3 - OBJETIVOS

3.1 – GERAL:

Determinar o perfil de resistência fenotípico aos antibióticos da classe dos β -lactâmicos, dos isolados de *Escherichia coli* do ambiente hídrico urbano, do município de Belém (PA). Além de verificar se estes isolados são produtores da enzima Beta-lactamases de Espectro Estendido (ESBL).

3.2 – ESPECÍFICOS

- Verificar a presença da bactéria *Escherichia coli* em amostras de água superficial (praia, lago e rio);
- Determinar o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos da classe dos β -lactâmicos dos isolados de *Escherichia coli* provenientes do ambiente aquático.
- Identificar a presença da enzima Beta-lactamases de Espectro Estendido (ESBL) nos isolados de *E. coli*.

4 - MATERIAL E MÉTODOS

4.1 - TIPO DE ESTUDO E AMOSTRAGEM: O presente estudo caracteriza-se como do tipo, descritivo e transversal. Foram analisadas amostras de água superficial oriundas de diferentes cursos d'água (rio, lago e praia). As amostras utilizadas no estudo foram coletadas no período de abril/2017 a outubro/2018, e analisadas no Laboratório de Microbiologia Ambiental, do Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Universidade Federal do Pará (UFPA).

4.2 – PROCEDÊNCIA DAS AMOSTRAS DE ÁGUA

4.2.1 - Parque Ambiental (Estadual) do Utinga: As amostras de água do Utinga foram coletadas do lago Água Preta (10 pontos), que junto com o lago Bolonha formam os mananciais de abastecimento de água, localizado no Parque Estadual (Ambiental) do Utinga, município de Belém (PA). O Parque do Utinga foi criado no Decreto Estadual N° 1.552 de 03/05/1993, visando a proteção dos lagos Bolonha e Água Preta das alterações antrópicas que possam prejudicar a qualidade da água utilizada no abastecimento público da cidade de Belém (PA). Apresenta uma área de 1.340 ha e é considerado o maior parque ambiental em área urbana da Amazônia. Foram coletadas amostras de água em doze pontos de amostragens nos meses de maio e setembro de 2017 (dez pontos de amostragem no lago Água Preta e dois pontos no lago Bolonha).

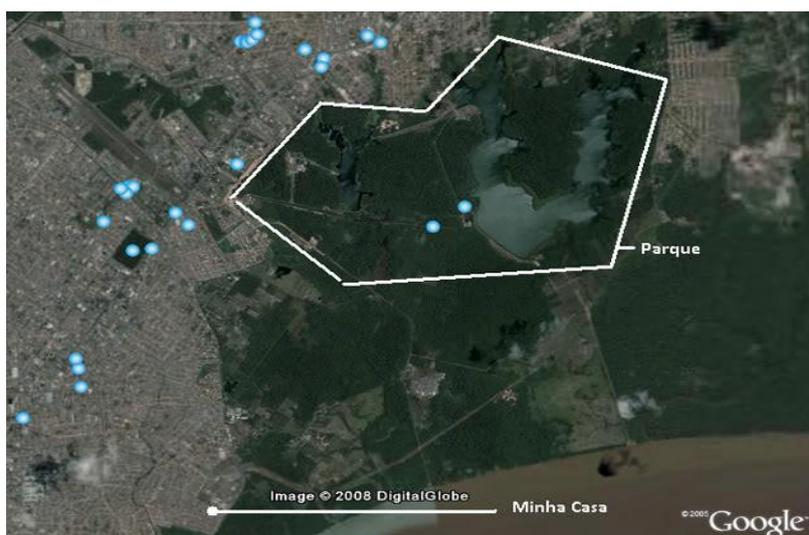


Figura 6 - Imagem do Parque Ambiental do Utinga, Belém-PA.

Fonte: Google, 2018.

4.2.2 - Rio Guamá: Foram também coletadas amostras de água superficial procedentes do rio Guamá. O rio Guamá juntamente com os lagos Água Preta e Bolonha, formam o Complexo Hídrico do Utinga (VASCONCELOS; SOUZA, 2011). Este rio é de grande importância para o abastecimento de água do município de Belém já que somente o volume dos mananciais seria insuficiente para o abastecimento da cidade, desta forma há um sistema de bombeamento que realiza a captação das águas do rio Guamá para complementar o volume dos mananciais (ARAÚJO JÚNIOR et al., 2013). Foram coletadas amostras de água em nove pontos de amostragens no período de abril/2017.



Figura 7 - Rio Guamá, município de Belém-PA
Fonte: Google, 2018.

4.2.3 - Praias da ilha de Mosqueiro: A ilha fluvial de Mosqueiro é um distrito pertencente ao município de Belém-PA, que possui 20 praias de água doce e faz parte dos principais polos turísticos do estado do Pará (CABRAL et al., 2015). As amostras de água foram coletadas nas praias do Farol e do Murubira, no período de março a outubro de 2018.



Figura 8 - Ilha de Mosqueiro, Belém-PA.
Fonte: ASCOM/UFPA 2015.

4.3 - PROCEDIMENTO DE COLETA E ANÁLISE DAS AMOSTRAS DE ÁGUA: Volumes de 1000 mL de água superficial (rio, lagos e praias) foram coletados em frascos de polipropileno esterilizados, seguindo identificação e armazenamento em caixas isotérmicas para exame laboratorial (CETESB/ANA, 2011). A análise microbiológica das amostras de água foi realizada no Laboratório de Microbiologia Ambiental (ICB/UFPA), para a pesquisa de indicadores sanitários, através da técnica do Substrato Cromogênico Definido ONPG-MUG (INDEXX /Colilert®). Os procedimentos de análise microbiológica seguiram o *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2005).

4.4 - ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE *Escherichia coli*: A confirmação da presença de *E. coli* foi realizada a partir da transferência de inóculo dos poços com fluorescência, quando submetidos à luz UV, para placas de Petri contendo Ágar Eosina Azul de Metileno (EMB), que é um meio seletivo e diferencial para Enterobactérias, seguindo semeadura por esgotamento. As placas foram acondicionadas em estufa bacteriológica a temperatura de $35 \pm 2^\circ \text{C}$ por 24 horas. Após a incubação foram selecionadas 3 a 5 Unidades Formadoras de Colônias (UFC) com características macroscópicas (fenotípicas) compatíveis para *E. coli* (colônias com “brilho verde metálico”). Na etapa de caracterização fenotípica (identificação) procedeu-se a realização das seguintes provas bioquímicas: Ágar TSI (Triple Sugar Iron Agar / Ágar Tríplice Açúcar Ferro); Indol; Vermelho de Metila (VM); Motilidade; Citrato de Simmons e Ágar Lisina Descarboxilase. Os isolados de *E. coli* foram semeados em meio de conservação para análises posteriores. Destaca-se que os procedimentos dos testes bioquímicos seguiram as recomendações do Winn et al., 2018.

4.5 - PERFIL DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS:

4.5.1 - Repique bacteriano: Os isolados de *E. coli* estocados em meio de conservação, foram transferidos para o meio de triagem Ágar Açúcar Triplo Ferro e de conservação, o Ágar Nutriente, seguindo a incubação na estufa a $35 \pm 2^\circ$ por 24 horas; depois desta etapa de isolamento e identificação, foi realizado o antibiograma.

4.5.2 - Teste Fenotípico Antibiograma: Os isolados de *Escherichia coli* foram submetidos ao teste de sensibilidade aos antimicrobianos seguindo as normas do *Clinical and Laboratory Standart Institute* - CLSI, e utilizando o método de difusão em disco de Kirby-Bauer (Bauer et al., 1966; BRASIL, 2003). Na etapa inicial foi preparada uma suspensão dos isolados de *E.*

coli em solução fisiológica esterilizada até alcançar a turbidez padrão correspondente a 0,5 da escala Mc Farland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL). Em seguida, com *swab* de algodão estéril, a suspensão foi semeada em placas de Petri contendo Ágar Mueller-Hinton (MH). Após absorção do inóculo foram colocados os discos comerciais de antibióticos sobre a superfície do Ágar MH com a auxílio de uma pinça estéril. Em seguida as placas foram incubadas em estufa bacteriológica a $35 \pm 2^\circ$ C por 24 horas. Na tabela 1 estão listados os antibióticos utilizados no teste do antibiograma.

Tabela 1 - β -lactâmicos e as subclasses testadas no antibiograma e os intervalos para interpretação dos halos.

β -lactâmicos (Subclasse)	Sensível	Intermediária	Resistente
<u>Penicilina</u>			
Ampicilina 10 μ g	≥ 17	14-16	≤ 13
<u>Cefalosporinas</u>			
Cefuroxima 30 μ g	≥ 18	15-17	≤ 14
Cefoxitina 30 μ g	≥ 18	15-17	≤ 14
Cefazolina 30 μ g	≥ 15	-	≤ 14
Ceftazidima 30 μ g	≥ 21	18-20	≤ 17
Cefepima 30 μ g	≥ 25	19-24	≤ 18
Ceftriaxona 30 μ g	≥ 23	20-22	≤ 19
<u>Carbapenêmicos</u>			
Imipenem 10 μ g	≥ 23	20-22	≤ 19
Meropenem 10 μ g	≥ 23	20-22	≥ 19
Aztreonam 30 μ g	≥ 21	18-20	≤ 17
<u>Inibidores da β-lactamase</u>			
Piperacilina +tazobactam 100/10 μ g	≥ 21	18-20	≤ 17
Amoxicilina+ ácido clavulânico 30 μ g	≥ 18	14-17	≤ 13

A leitura das placas foi realizada fazendo-se a medição dos diâmetros dos halos de inibição ao redor do disco de antibiótico de acordo com a descrição da técnica de disco difusão em ágar. E os resultados foram comparados com os valores de referência, classificando as cepas com perfil resistente, intermediário e sensível para cada antibiótico utilizado (BRASIL, 2003; CLSI, 2017). No controle de qualidade do teste foi utilizada a cepa de *E. coli* ATCC 25922.

4.5.3 - Pesquisa de β -lactamases de Espectro Estendido (ESBL): Na pesquisa *E. coli* produtoras de betalactamases de espectro estendido (Extended-Spectrum Betalactamase - ESBL), foi realizada a técnica de aproximação de disco. A diluição e o semeio na placa foram realizados como descrito anteriormente no teste do antibiograma. Na sequência do teste um disco de amoxicilina com ácido clavulânico foi colocado no centro da placa, em seguida foram distribuídos, com uma distância de 30 mm de centro a centro, os discos de ceftriaxona (30 μ g); ceftazidima (30 μ g), cefepima (30 μ g) e o aztreonam (30 μ g). As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a $35 \pm 2^\circ$ C por 24 horas. Na interpretação do teste é observado o aparecimento da zona fantasma (sinergia) entre os antimicrobianos, aumento ou distorção do halo que é indicativo de cepa produtora de ESBL. O resultado foi interpretado de acordo com os critérios estabelecidos pelo Manual *Clinical and Laboratory Standards Institute* para Enterobactérias (BRASIL, 2003; CLSI, 2017).

4.6 - ORDENAÇÃO DE DADOS e ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA: Os dados obtidos foram organizados em planilha eletrônica do Microsoft Office Excel 2013 para elaboração dos gráficos e tabelas. Justifica-se, a ausência de apreciação no Comitê de Ética de Pesquisa por tratar-se de amostras ambientais (água superficial).

5 - RESULTADOS

5.1 - ISOLADOS DE *Escherichia coli* E PERFIL DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

Os resultados do antibiograma foram analisados utilizando-se critérios estabelecidos pelo CLSI (2017), e a partir dos dados obtidos foram construídas tabelas, assim como gráficos para demonstrar o perfil de suscetibilidade antimicrobiana.

Os 70 isolados de *E. coli* analisados neste estudo foram procedentes de três tipos diferentes de água superficial (lago, praia e rio), sendo que entre os isolados bacterianos 18 (26%) eram do lago Água Preta/Utinga; 18 (26%) da praia do Farol; 20 (28%) da praia do Murubira, localizadas na ilha do Mosqueiro; e 14 (20%) da água do rio Guamá.

Os isolados de *E. coli* foram testados frente a 12 tipos de antibióticos beta-lactâmicos e os resultados estão expressos a seguir. A tabela 2 demonstra o perfil da suscetibilidade das cepas de *E. coli* testadas contra os antibióticos β -lactâmicos.

Tabela 2 - Perfil geral do antibiograma demonstrando a suscetibilidade dos isolados de *E. coli* frente aos antibióticos da classe β -lactâmicos.

Antibióticos β -lactâmicos	Sensível		Intermediário		Resistente	
	N	%	N	%	N	%
Amoxi+ac.clavul 20/10 μ g	64	92	1	1	5	7
Ampicilina 10 μ g	54	78	1	1	15	21
Piperacilina+tazobactam 100/10 μ g	69	99	1	1	0	0
Cefepima 30 μ g	67	96	3	4	0	0
Cefazolina 30 μ g	50	71	13	19	7	10
Ceftriaxona 30 μ g	64	91	4	6	2	3
Cefoxitina 30 μ g	63	90	0	0	7	10
Ceftazidima 30 μ g	68	98	1	1	1	1
Cefuroxima 30 μ g	59	84	0	0	11	16
Imipenem 10 μ g	51	73	17	24	2	3
Meropenem 10 μ g	69	99	1	1	0	0
Aztreonam 30 μ g	67	96	1	1	2	3

Os isolados de *E. coli* testados mostraram uma variação de 71 a 99% de sensibilidade. Os antibióticos Meropenem e Piperacilina+Tazobactam foram os que demonstraram maior eficiência no teste, onde 99% dos isolados de *E. coli* testados foram sensíveis a estes fármacos, o menor percentual de sensibilidade foi observado para o antibiótico Cefazolina, com 71% de sensibilidade.

A taxa de sensibilidade intermediária variou de 0 a 24% sendo que o maior percentual desta constatação é para o antibiótico Imipenem 24%, enquanto o menor percentual foi demonstrado para Cefuroxima e Cefoxitina, com 0%, respectivamente.

O percentual de resistência variou de 0 a 21% sendo que a maior taxa foi demonstrada para os isolados testados contra o antibiótico Ampicilina (21%), e o menor para Imipenem e Ceftazidima (1%). Destaca-se ainda que os isolados de *E. coli* testados não demonstraram resistência aos antibióticos Meropenem, Cefepime e Piperacilina+Tazobactam. Nota-se que nenhum antibiótico mostrou 100% de eficiência frente isolados bacterianos testados neste estudo. No quadro 1 estão listados 25 isolados de *E. coli*, do total de 70, que mostraram perfil de resistência a no mínimo um (1) e no máximo sete (7), dos doze (12) antibióticos testados.

Quadro 1 - Perfil de resistência de *Escherichia coli* oriundas do lago Água Preta, praia do Murubira e Farol (Mosqueiro) e rio Guamá, coletadas no período de abril de 2017 a outubro de 2018, município Belém (PA).

Registro	LOCAL	RESISTÊNCIA
PA 4.7	Lago Água Preta	CFZ, AMC, CRX, AMP, CFO
PA 1.2	Lago Água Preta	AMP
PA 1.1	Lago Água Preta	AMP
PA 12.2	Lago Água Preta	IPM
PA 11	Lago Água Preta	AMP
PA 1.3	Lago Água Preta	AMP
PA 1.4	Lago Água Preta	CRX, AMP
PA 5.1	Lago Água Preta	CRX
M 2.1	Praia Murubira	CRX, CFO
M 1.1.4	Praia Murubira	CRX
M 1.3	Praia Murubira	AMP
M 2.4	Praia Murubira	CFZ, CRO,
M 3.1	Praia Murubira	CFZ, CRO, CAZ, CRX, ATM, AMP, CFO
M 1.4	Praia Murubira	AMP
M 3.3	Praia Murubira	AMP
F 2.4	Praia Farol	AMP
F 2.2.3	Praia Farol	CFZ, AMC, AMP, CFO
F 2.2.4	Praia Farol	CFZ, AMC, CRX, AMP, CFO
F 3.4	Praia Farol	CFZ, AMC, CRX, ATM, CFO
F 3.2.1	Praia Farol	IPM
F 2.1	Praia Farol	CFZ, AMC, AMP, CFO
F 1.1	Praia Farol	CRX
P 6.1	Rio Guamá	CRX
P 6.2 t	Rio Guamá	CRX
P 9.2	Rio Guamá	AMP

Legenda: AMP (Ampicilina); ATM (Aztreonam); AMC (Amoxicilina + Clavulanato); CAZ (Ceftazidima); CFO

(Cefoxitina); CFZ (Cefazolina); CPM (Cefepime); CRX (Ceftriaxona); CRO (Cefuroxima); IMP (Imipenem); PPT (Piperacilina + Tazobactam); MER (Meropenem).

Os dados apresentados na tabela 3 demonstram que a maior ocorrência de resistência foi observada para o antibiótico Ampicilina (AMP) com 15 cepas, sendo que a maior frequência desta ocorrência foi observada em isolados do lago Água Preta, dos 8 pontos estudados em 6 foram encontradas cepas resistentes a este antibiótico. Outra frequência a se destacar é que os isolados de *E. coli* resistentes a Ampicilina (AMP) e a Cefuroxima (CRX) ocorreram em todos os cursos d'água avaliados.

Tabela 3 - Frequência de isolados de *E. coli* com perfil de resistência procedentes do ambiente hídrico urbano, município de Belém – PA.

	AMC	AMP	ATM	CAZ	CFO	CFZ	CRO	CRX	IPM
Ambiente Hídrico									
Lago Água preta	1	6	-	-	1	1	-	3	1
Praia Farol	4	4	1		4	4		3	1
Praia Murubira	-	4	1	1	2	2	2	3	-
Rio Guamá	-	1	-	-	-	-	-	2	-
Total	5	15	2	1	7	7	2	11	2

Legenda: AMP (Ampicilina); ATM (Aztreonam); AMC (Amoxicilina + Clavulanato); CAZ (Ceftazidima); CFO (Cefoxitina); CFZ (Cefazolina); CPM (Cefepime); CRX (Cefuroxima); CRO (Ceftriaxona); IMP (Imipenem); PPT (Piperacilina + Tazobactam); MER (Meropenem).

A figura 9 demonstra o percentual de isolados resistentes em relação ao total (25/100%), e o local de origem dos isolados de *E. coli*, destacando que o maior percentual (8/32%) foi identificado no lago Água Preta; o percentual dos isolados oriundos de água praias foram iguais (7/28%) e o menor percentual está demonstrado no rio Guamá (3/12%).

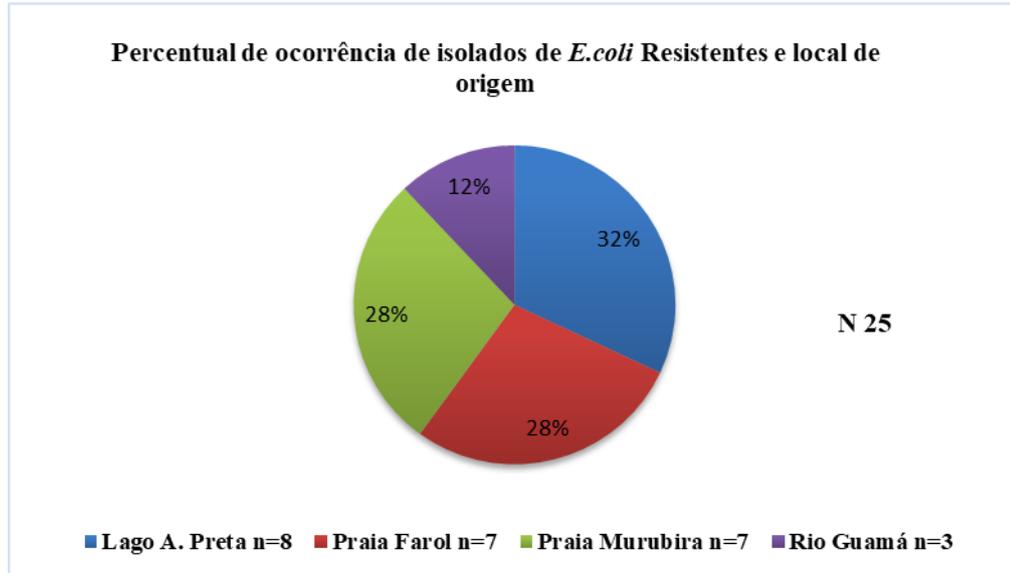


Figura 9 – Frequência dos isolados de *E. coli* com perfil de resistência e local de origem.

Os dados da figura 10 são referentes ao percentual de isolados que demonstraram sensibilidade intermediária identificados em cada curso d'água, em relação ao total das cepas (29/100%) com esta característica. Percebe-se que (13/45%) os isolados do lago Água Preta revelaram ter sensibilidade intermediária aos antibióticos testados, inclusive esse valor é bem superior quando comparado aos demais isolados de *E. coli* que demonstraram este perfil. No caso de água de praia foi observado perfil intermediário dos isolados das praias do Farol (8/28%) e do Murubira (7/24%); e o menor percentual foi demonstrado nos isolados de *E. coli* procedentes do rio Guamá (1/3%).

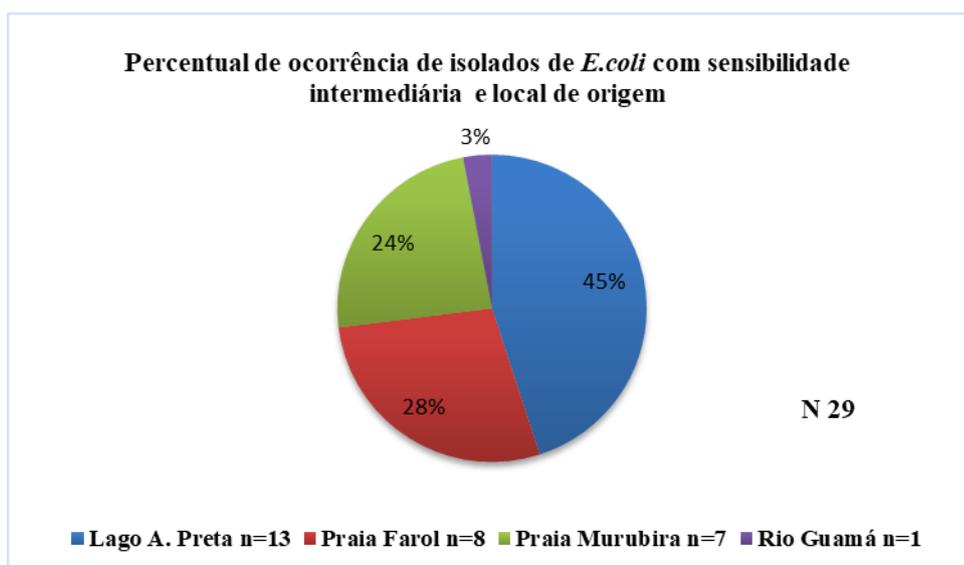


Figura 10 - Frequência dos isolados de *E. coli* com perfil intermediário e local de origem

5.3 - DETECÇÃO DE ESBL

O teste fenotípico para a detecção da produção de ESBL foi realizado com quatro (4) isolados que apresentaram resistência a alguma das Cefalosporinas de terceira geração, como Cefotaxima, Ceftriaxona e Ceftazidima. E a confirmação desse perfil fenotípico foi realizado através do teste de aproximação de disco, para a detecção de ESBL. Destaca-se que os resultados revelaram que nenhum isolado de *E. coli* produziu a enzima ESBL.

6 – DISCUSSÃO

A detecção de cepas de *E. coli* originadas de ambiente aquático e que são resistentes a antibióticos particularmente os β -lactâmicos é relevante, por se tratar de uma classe muito utilizada na terapêutica tanto em ambiente hospitalar quanto ambulatorial (SUÁREZ; GUDIOL, 2009).

Na análise geral em relação ao perfil de suscetibilidade (Tabela 2), os isolados demonstraram maior percentual do fenótipo resistente para o β -lactâmico Ampicilina que é um integrante da subclasse das penicilinas. Observou-se que, das 70 cepas 15 (21%) demonstraram este perfil, o mesmo percentual foi relatado por Oliveira et al. (2012) no estudo sobre a ocorrência de *E. coli* multirresistentes em praias de Lajeado - TO. Schneider et al. (2009) demonstraram o perfil de resistência de *E. coli* em águas superficiais e encontraram um percentual de 36,5% de resistência para Ampicilina. Este percentual foi próximo ao encontrado por França e Melloni (2014), que utilizaram em seus estudos águas de rio e de cachoeira, e demonstraram resistência das cepas para a Ampicilina em 36,6%. Em um estudo mais recente, CHO et al. (2018) detectaram a resistência a Ampicilina em 32,4% de cepas de *E. coli* isoladas da bacia hidrográfica do Alto Oconee, no nordeste da Geórgia.

Os achados mencionados reforçam os demonstrados neste trabalho. Entretanto, são percentuais inferiores aos encontrados por Amaya et al. (2012), que informaram 100% de resistência a Ampicilina em *E. coli* quando estudaram diferentes fontes aquáticas em Leon, na Nicarágua. E o oposto também foi relatado nos resultados de Vasconcelos et al. (2010) que demonstram 100% de sensibilidade para este antibiótico. A variação dos percentuais demonstrados pode indicar que a ocorrência de resistência antibacteriana em corpos d'água deve-se a alguns fatores como: proximidade com áreas de cultivo; esgotos hospitalares; sazonalidade (período chuvoso); entre outros (VASCONCELOS et al., 2010).

Na continuação da análise geral em relação ao perfil de suscetibilidade, pode-se destacar outros β -lactâmicos que os isolados de *E. coli* demonstraram ser resistentes e que fazem parte da subclasse das Cefalosporinas, esses antibióticos foram classificados em quatro gerações dependendo da ordem de seu desenvolvimento, propriedades estruturais comuns e espectro antimicrobiano (MELLA et al., 2001). Foram testados seis antibióticos deste grupo, e em cinco foi detectada resistência dos isolados, foram eles: a Cefuroxima (14%) (segunda geração), Cefoxitina (9%), Cefazolina (9%) (primeira geração), Ceftriaxona (3%) e Ceftazidima (1%) (terceira geração).

Hahn et al. (2015) relataram 32,4% de resistência para Cefoxitina em Gram-negativos. Akiba et al. (2016) ao estudar a resistência de *E. coli* a algumas Cefalosporinas determinaram

100% dos isolados resistentes a Cefazolina, percentual bem acima do mencionado no presente estudo. A resistência a Ceftriaxona foi de 3% neste estudo, resultado bem próximo ao encontrado por Amaya e colaboradores que relataram 4%.

Ao analisar a ocorrência de perfil fenotípico de Enterobactérias resistentes aos β -lactâmicos, Santos (2018) relatou 8,6% das cepas como resistentes a Cefuroxima, percentual menor que o encontrado neste estudo (14%).

A única Cefalosporinas em que os isolados não apresentaram resistência foi a Cefepima. Este resultado é um bom indicativo já que esta Cefalosporinas é de 4ª geração considerado um antibiótico menos suscetível à inativação enzimática pela AMPc, mas que são frequentemente inativadas pelas ESBLs. No entanto, estudos relatam que este antibiótico vem mantendo sua atividade contra *E. coli* resistentes a outras Cefalosporinas (THOMSON; MOLAND, 2001; NOGUEIRA et al., 2006).

O Aztreonam é o único representante da classe dos monobactâmicos e a detecção da resistência para este β -lactâmico foi de 3% nas cepas testadas de *E. coli*. Alguns trabalhos também demonstraram a resistência a este antibiótico, porém com percentuais acima, como o de Abreu et al. (2010) que relataram 12,8%, e mais recentemente Bortoloti et al. (2018) que detectaram porcentagem média de 15% em amostras de água de praias.

A associação de uma penicilina com inibidor de β -lactamase também foram incluídos no estudo, sendo eles a amoxicilina+ac.clavulânico, onde os isolados demonstraram resistência em 6%, e a Piperacilina+Tazobactam, que não foi constatada a resistência a este antibiótico nesse estudo, sendo eficaz em 99% das cepas. A associação amoxicilina+Clavulanato no estudo de Amador et al. (2015) mostrou um alto percentual de cepas de *E. coli* resistentes para este tipo de fármaco em 43,5% de seu estudo sobre o perfil de resistência em águas residuais tratadas e lançadas no rio Mondego, Coimbra, Portugal. Em contrapartida, neste estudo, foi observado um percentual de 6% das cepas resistentes para esta associação. Quando há resistência a um inibidor da β -lactamase, os pesquisadores têm sugerido a ação de outro mecanismo de resistência além de ESBL (RODRIGUES; MESQUITA, 2016).

Em relação os Carbapenêmicos foram testados dois representantes desta subclasse o Imipenem, onde a detecção de resistência entre os isolados de *E. coli* foi de 1%, enquanto o Meropenem nenhum isolado foi resistente. Destaca-se que esta constatação é satisfatória, pois os Carbapenêmicos estão inseridos na terapia antibacteriana de escolha em infecções no ambiente hospitalar causadas por bactérias Gram-negativas multirresistentes, incluindo as Enterobactérias produtoras de ESBL (NORDMANN et al., 2009).

Ao observar a ocorrência das cepas resistentes aos antibióticos em cada recurso hídrico, os isolados resistentes a ampicilina foi mais frequente. No lago Água Preta foi detectada maior frequência de isolados resistentes, sendo que dos oito (8) isolados analisados, seis (6) demonstraram resistência a este antibiótico (Tabela 3). Ressalta-se que vários estudos relatam a ocorrência deste antibiótico no ambiente hídrico, como citado anteriormente neste estudo. Deve-se destacar também que a Cefuroxima foi detectada em todos os cursos d'água analisados, sendo que esta constatação pode ser devido ao despejo de esgoto hospitalar no ambiente hídrico urbano, já que esta Cefalosporina é bastante utilizada no ambiente hospitalar (HARRIS, 2015).

A constatação da resistência de *E. coli* a um fármaco bastante utilizado na clínica em amostras ambientais, alerta a comunidade de saúde já que este agente está envolvido nas mais variadas infecções em humanos e animais (CAUMO et al., 2010).

O maior percentual de resistência antimicrobiana aos β -lactâmicos em relação ao local de origem das cepas na análise da figura 9, foi registrado no lago Água Preta (32%) este fato é preocupante pois, este recurso faz parte do manancial do sistema de abastecimento hídrico da cidade de Belém (PA). Este resultado é diferente do encontrado Vasconcelos et al. (2010) que também avaliaram o perfil de resistência de águas de locais de abastecimento público e não identificaram estirpes resistentes aos β -lactâmicos. Já Bortoloti et al. (2016) corroborando com este trabalho, identificaram cepas de *E. coli* resistentes a antibióticos incluindo os β -lactâmicos em um percentual de até 61%, ao estudarem várias fontes de água de abastecimento populacional em períodos chuvoso e seco.

Vasconcelos e Souza (2011) detectaram alguns determinantes para a contaminação do manancial do Utinga onde está localizado o lago Água Preta como: despejo de resíduos na área pela população do entorno; ausência de coleta regular dos resíduos sólidos localizados nas proximidades do Parque Ambiental do Utinga, onde estão localizados os lagos; e esgotos oriundos do entorno e de bairros distantes; entre outros.

Os isolados originados das águas de praia Farol e Murubira revelaram o mesmo percentual de resistência (28%). Os resultados deste estudo para estes cursos d'água, são superiores aos relatados por Oliveira et al. (2012), que na avaliação de águas de praias detectaram que 19,5% das bactérias *E. coli* foram resistentes aos antibióticos, inclusive aos β -lactâmicos.

Ao pesquisarem a resistência de *E. coli* a antimicrobianos em água de praia em Quebec, Turgeon et al. (2012) identificaram 27,9% e 38,4% de isolados resistentes nos anos de 2004 e 2005. Em um estudo mais recente, Ebomah et al. (2018), demonstraram que 100%

das estirpes de *E. coli* foram resistentes aos antimicrobianos entre eles os β -lactâmicos.

As praias do Farol e do Murubira, pertencem ao distrito de Mosqueiro, município de Belém (PA), a contaminação hídrica dessas praias é decorrente entre outros fatores, da alteração ambiental devido ao desmatamento, desbarrancamento e pela ocupação desordenada (CABRAL, et al., 2015). As águas recreacionais têm sido associadas como um potencial reservatório de resistência antimicrobiana de *E. coli* (Hamelin et al., 2007).

Dentre os isolados de *E. coli* analisados neste trabalho, o menor percentual de resistência detectado foi do rio Guamá (12%). Hahn et al. (2015) relacionaram bactérias Gram-negativas a resistência antimicrobiana incluindo aos da classe de interesse deste estudo em 77,3% dos isolados provenientes do Rio dos Sinos (RGS), inclusive com valor bem acima do encontrado neste estudo.

Para Oliveira et al. (2012), a degradação dos recursos hídricos vem ocorrendo de maneira constante e de vários modos, destacando o despejo direto de esgoto em rios, uma vez que as áreas do entorno serem habitadas de maneira desordenada, o que faz com que o destino final, dos mais variados tipos de resíduos sejam os cursos d'água mais próximos, representando risco à saúde e ao bem-estar da população. Santos et al. (2014) em seu estudo sobre a qualidade da água do rio Guamá e da baía do Guajará relatam que resíduos sólidos e líquidos alcançam os principais cursos d'água da cidade de Belém de forma direta ou indireta, sem receber qualquer tipo de tratamento, aumentando dessa forma a contaminação desses recursos.

Neste estudo a pesquisa para a detecção da enzima ESBL também foi realizada. As ESBL são reconhecidas tipicamente pela sua capacidade hidrolítica apresentada frente as Penicilinas, Cefalosporinas e o Aztreonam (BUSH; FISHER, 2011). Destaca-se que nesse estudo não foram detectados isolados produtores de ESBL. As prevalências, assim como, as características fenotípicas dos isolados produtores dessa enzima variam dependendo da região em que o estudo é realizado. No entanto, *E. coli* é uma das espécies em que a enzima é mais frequentemente detectada (FREITAS et al., 2003).

Entretanto, vários estudos já evidenciaram a ocorrência de ESBL em isolados bacterianos procedentes de ambientes aquáticos. Hassen et al. (2018), demonstraram 29,1% em isolados de Enterobactérias procedentes de águas superficiais e de estações de tratamento na Tunísia. Gekenidis et al. (2018) detectaram 22% em águas de irrigação. Liu et al. (2018) evidenciaram um percentual menor 2,8% em *E. coli* isoladas da água de rio.

A produção desta enzima entre as Enterobactérias geralmente é associada às taxas mais altas de falência terapêutica e mortalidade em pacientes com quadro de bacteremias

quando comparadas com o mesmo quadro onde as bactérias não são produtoras de ESBL. Ressalta-se que muitos outros mecanismos de resistência estão presentes entre as *Entrebactérias*, originando multirresistência às várias classes de antibióticos (GASTALHO et al., 2014; FRIEDMAN et al., 2016).

Os cursos d'água envolvidos no estudo estão localizados no município Belém-PA, onde os baixos índices de saneamento básico se refletem nos altos índices de doenças de veiculação hídrica, além de problemas ambientais relevantes. Esses problemas são influenciados entre outros, pelo aumento demográfico desordenado e pelo lançamento de esgoto sem tratamento nos corpos receptores dos recursos hídricos (SOUSA et al., 2018).

A resistência antimicrobiana é um tema relevante, por tratar-se de um problema de impacto na saúde humana e no meio ambiente, vários estudos abordaram a preocupação de diversos países com a presença de fármacos no ambiente aquático, principalmente por não haver parâmetros aceitáveis de tais substâncias nesse ambiente e por sua capacidade de persistência no ambiente podendo ocasionar prejuízos aos seres humanos e na biota (CARVALHO et al., 2016).

Por fim, os resultados desse estudo demonstram a necessidade de monitoramento do ambiente aquático, tendo em vista a detecção de isolados de *E. coli* com perfil de resistência aos antibióticos procedentes de diferentes cursos d'água, receptores de efluentes domésticos e industriais, dos centros urbanos onde há deficiência dos serviços de saneamento básico, como no município de Belém-Pará.

7 - CONCLUSÃO

- Foi observado, a ocorrência de *Escherichia coli* resistentes a antimicrobianos β -lactâmicos em todos os ambientes aquáticos estudados (lago, praia, rio). Revelando que a disseminação dos genes de resistência vem ocorrendo nestes ambientes. Representando potencial risco para a população.

- A ocorrência de resistência antimicrobiana foi detectada em 36% dos isolados

- A ampicilina foi o antibiótico em que os isolados demonstraram maior resistência. Confirmando que, as *E. coli* demonstram prevalência desta característica fenotípica para este antibiótico, entre os β -lactâmicos.

- O maior percentual de isolados resistentes, foi detectado no lago Água Preta, importante corpo d'água que faz parte do complexo de abastecimento da cidade de Belém-PA.

- O uso racional dos antibióticos e legislação específica para o destino deste recurso em todas as atividades, visando a mitigação da disseminação, haja visto que a presença de *Escherichia coli* resistentes e multirresistentes é um possível indicativo de contaminação provenientes de esgoto hospitalar, residencial e de atividades que envolve o uso de antibióticos.

- É necessário ampliar o monitoramento da ocorrência de isolados de *E. coli* resistentes a antimicrobianos no ambiente hídrico urbano visando garantir a qualidade microbiológica da água a ser distribuída para o consumo da população, tendo em vista que o rio Guamá e o lago Água Preta são mananciais de abastecimento de água do município de Belém-PA.

8 - REFERÊNCIAS

- ABREU, E. T.; et al. Avaliação da resistência a antibióticos de bactérias isoladas de efluente hospitalar. **Acta Scientiarum Technology** 32 (1): 1-5, 2010.
- ALVARENGA, L. S. V.; NICOLETTI M. A. Descarte doméstico de medicamentos e algumas considerações sobre o impacto ambiental decorrente. **Revista Saúde** 4(3): 34-39, 2010.
- ALM, E.; BURKE, J.; SPAIN, A. Patterns and persistence of antibiotic resistance in faecal indicator bacteria from freshwater recreational beaches. **J. Appl. Microbiology** 117(1): 273-285, 2014.
- ALMEIDA, M.C.; SIMÕES, M.J.S.; RADDI, M.S.G. Ocorrência de infecção urinária em pacientes de um hospital universitário. **Revista de Ciência Farmacêutica Básica Aplicada**. 28 (2): -9 -215, 2007.
- AMARAL, L. A. et al. Água de consumo humano como fator de risco a saúde em propriedades rurais. **Revista Saúde Pública** 37 (4): 510-514, 2003.
- AMAYA, E; et al. Antibiotic resistance patterns of *Escherichia coli* isolates from different aquatic environmental sources in Leon, Nicaragua. **Clinical Microbiology and Infection** 18 (9): 347-354, 2012.
- ANDRADE, L. N; DARINI, A. L. C. Bacilos Gram-negativos produtores de beta-lactamases: que *bla bla bla* é esse? **Journal of Infection Control** 6 (1): 16-25, 2017.
- AKIBA, M; et al. Distribution and Relationships of Antimicrobial Resistance Determinants among Extended-Spectrum-Cephalosporin-Resistant or Carbapenem-Resistant *Escherichia coli* Isolates from Rivers and Sewage Treatment Plants in India. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 60 (5): 2972–2980, 2016.
- ALMEIDA, M. V. A; et al. Drug resistance, AmpC- β -lactamase and extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae isolated from fish and shrimp. *Revista Instituto Medicina Tropical de São Paulo* 59 (70): 1-7, 2017.
- AMADOR, P. P.; et al. Antibiotic resistance in wastewater: Occurrence and fate of *Enterobacteriaceae* producers of Class A and Class C β -lactamases **Journal of Environmental Science and Health** 50 (1): 26-39, 2015.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. Washington: APHA, 2005
- ARAÚJO JÚNIOR, A. C. R.; DE AZEVEDO, A. K. A.; OLIVEIRA, I. S. Problemática da Água na Região Metropolitana de Belém (RMB) - Pará: Aspectos Histórico-Geográficos. **Acta Geográfica**, v. 7, n. 15, 2013.

ARIAS, M. V. B; CARRILHO C. M. D. Resistência antimicrobiana nos animais e no ser humano. Há motivo para preocupação? **Revista Semina: Ciências Agrárias** 33(2): 775-790, 2012.

AUGUSTI, G. R. et al. Prevalência de produção de beta-lactamases de espectro estendido em bacteremias por *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*. **Scientia Medica** 17 (4): 192-196, 2007.

AUGUSTO, K. L; et al. Perfil de resistência aos antimicrobianos e prevalência da produção de beta-lactamases de espectro estendido em cepas de *Escherichia coli* em um hospital terciário do Ceará, Brasil (2010-2013). **Revista Médica UFC** 56(1): 8-13

BARCELOS, D. H. F; et al. Pesquisa de enterobactérias resistentes a antimicrobianos isoladas em poços tubulares na região serrana do espírito santo (Brasil). **Revista Águas Subterrâneas** 30 (1): 53-56, 2016.

BARRETO, I. F; et al. Perfil de sensibilidade de bactérias isoladas em uroculturas de pacientes atendidos em um hospital localizado no estado do paraná sensibilidade em uropatógeno. **Cad. da Esc. de Saúde** 17 (2): 52-60, 2018.

BASU, D; et al. A subunidade A1 da toxina Shiga 2 tem maior afinidade por ribossomos e maior atividade catalítica do que a subunidade A1 da toxina Shiga 1. **Infection and Immunity** 84(1): 149–161, 2016.

BELL, V; et al. Rotas da ciência e da saúde: inovação em antibióticos entre a Europa e os Estados unidos da América (1940-1960). **Europa, Atlântico e o mundo, mobilidades, crises, dinâmicas e culturais**. Universidade de Coimbra: 429-448, Coimbra, 2017.

BERTÃO, A. M. S; SARIDAKS H. O. *Escherichia coli* produtora de toxina shiga (STEC): principais fatores de virulência e dados epidemiológicos. **Revista Semina: Ciências Biológicas e da Saúde** 28 (2): 81-92, 2007.

BETTELHEIM, K; GOLDWATER, P. Serotypes of Non-O157 Shigatoxigenic *Escherichia coli* (STEC). **Journal Advances in Microbiology** 4 (7): 377-389, 2014.

BORTOLOTI, K. C. S; et al. Qualidade microbiológica de águas naturais quanto ao perfil de resistência de bactérias heterotróficas a antimicrobianos. **Engenharia Sanitária e Ambiental** 23(4):717-725.2018

BRASIL. **Lei N° 8080, de 19 de setembro de 1990**. Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento e dá outras providências. Disponível em <http://www.planalto.gov.br/ccivil_09/LEIS/8080.htm>. Acesso em: 23 nov. 2017.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão: Norma Aprovada**. 8. ed. Brasília: ANVISA, 2003.

BUSH, K; FISHER J.F. Epidemiological Expansion, Structural Studies, and Clinical Challenges of New β -Lactamases from Gram-Negative Bacteria. **Annu Rev Microbiol** 65(8) 455-478. 2011.

CABRAL, E. R; et al. Gestão Ambiental em Espaços de Lazer e Turismo: As Praias Urbanas da Amazônia Brasileira. **Revista Rosa dos ventos**.7(2): 269-287, 2015.

CABRAL, J.P.S. Water Microbiology. Bacterial Pathogens and Water. **Int J Environ Res Public Health** 7(10): 3657–3703, 2010.

CALDORIN, M; et al. Ocorrência de *Escherichia coli* produtora de toxina *Shiga* (STEC) no Brasil e sua importância em saúde pública. **BEPA, Bol. Epidemiol. Paul. (Online)** 10 (110): 4-20, 2013.

CAMPOS, L. C; FRANZOLIN, M. R; TRABULSI, L. R. Diarrheagenic *Escherichia coli* categories among the traditional enteropathogenic E. coli O serogroups: a review. **Mem. Instituto Oswaldo Cruz** 99 (6):545-552, 2004.

CARVALHO, C. T; et al. O uso indiscriminado de antibióticos e os impactos nos ambientes aquáticos. **Periódico eletrônico Fórum Ambiental da Alta Paulista** 12 (2):123-131, 2016.

CAUMO, K; et al. Resistência bacteriana no meio ambiente e implicações na clínica hospitalar. **Revista Liberato** 11 (16): p.8, 2010.

CDDEP, the Center for Disease Dynamics, Economics & Policy. The State of the World's Antibiotics: 1-84. Washington, 2015.

CHANDRAN, A; MAZUNDER, A. Pathogenic potential, genetic diversity and population structure of *Escherichia coli* strains isolated from a forest-dominated watershed (Comox Lake) in British Columbia, Canada. **Journal Appl Environ Microbiol** 81: 1788–1798, 2015.

CHEN H. D; FRANKEL G. Enteropathogenic *Escherichia coli*: unravelling pathogenesis. **FEMS Microbiology Reviews** 29(1): 1 January 2005, Pages 83–98.

CHO S; et al. Prevalence and characterization of *Escherichia coli* isolated from the Upper Oconee Watershed in Northeast Georgia. **Journal Plos One** 13(5): 1-15, 2018.

CICUTA, M.E; et al Beta-lactam resistance in enterobacteria isolated from animal and water. **Revista Veterinária** 25 (1):1-4, 2014.

CLARKE, S.C; et al. Virulência de *Escherichia coli* enteropatogênica, um Patógeno Global. **Revisões de Microbiologia Clínica** 16 (3): 365-378, 2016.

CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-First Informational Supplement**. CLSI document M100 - S21. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2017.

COSTA, W. F; et al. Análise bacteriológica da água e o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos das *Escherichia coli* isoladas. **Journal Health NPEPS**. 1(2):160-177, 2016.

CROXEN, M. A; FINLAY B. B. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. **Clin. Microbiol Rev** 26(4):822-80. 2013.

DIEZ, J. G. O conceito "One Health" no contexto da crise. Conferência: **III Jornada de Saúde Pública Veterinária** 10.13140/RG.2.1.3459.9845, 2013.

EBOMAH, K. E; et al. Pathogenic *Escherichia coli* Strains Recovered from Selected Aquatic Resources in the Eastern Cape, South Africa, and Its Significance to Public Health” **International Journal of Environmental Research and Public Health**15(7), 2018.

FAULA, L. L; et al. Perfil de suscetibilidade antimicrobiana e identificação de patótipos diarreio gênicos entre amostras de *Escherichia coli* isoladas de alimentos. **R. Bras. Ci. Vet** 24 (1:) 108-115, 2017.

FRANÇA, P. T. R; MELLONI R. Avaliação microbiológica de águas de recreação por meio da análise de resistência de bactérias heterotróficas a antibióticos. **RBRH – Revista Brasileira de Recursos Hídricos** 19(4):107-113, 2014

FREIRE, T. A. S. **Águas não tratadas no norte de Portugal qualidade microbiológica e resistência aos antibióticos**. Dissertação (Mestrado em Controle de Qualidade). Cidade do Porto, Universidade do Porto, 2015. 118 p.

FREITAS, A. L. P; et al. Extended- spectrum Beta-lactamases in *Klebsiella* spp. and *Escherichia coli* obtained in a Brazilian teaching hospital: detection, prevalence and molecular typin. **Brazilian journal of microbiology** 34(4): 344-348, 2003.

FRIEDMAN, N.D; et al. The negative impact of antibiotic resistance. **Clinical Microbiology and Infection** 22 (8): 416-422, 2016.

GAVRONSKI, S. **Investigação da resistência aos carbapenêmicos em enterobactérias isoladas de um hospital de Blumenau/SC: detecção laboratorial e aspectos epidemiológicos**. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Florianópolis, Universidade Federal de Santa Catarina, 2017. 158 p.

GASTALHO, S; et al. Uso de antibióticos em aquacultura e resistência bacteriana: Impacto em saúde pública. **Acta Farmacêutica Portuguesa** 3 (1): 27-41, 2014.

GHAFOURIAN, S. Extended Spectrum Beta-lactamases: Definition, Classification and Epidemiology. **Curr. Issues Mol. Biol.** 17: 11-22, 2015.

GEKENIDIS M. T; et al. Antibiotic resistant indicator bacteria in irrigation water: High prevalence of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) - producing *Escherichia coli*. **PLOS ONE** 13(11):2018

GELLATI, L. C; et al. *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina: disseminação emergente na comunidade. **An Bras Dermatol** 84(5):501-506, 2009.

GOODMAN e GILMAN. **As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman e Gilman**. 12 ed. Porto Alegre: Mc Graw Hill, 2012. 1376 p.

GOMES, T. A.T; et al. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Braz. J. Microbiol** 47(1): 3-30, 2016.

GUIMARÃES, D. O; et al. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova** 33 (3): 667-679, 2010.

HAHN, A. B. B; et al. Avaliação do perfil de resistência a antimicrobianos e metais pesados em micro-organismos isolados do Rio dos Sinos, RS, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências** 13 (3): 155-164, 2015.

HAMELIN K; et al. Occurrence of Virulence and Antimicrobial Resistance Genes in *Escherichia coli* Isolates from Different Aquatic Ecosystems within the St. Clair River and Detroit River Areas. **Journal Applied and Environmental Microbiology** 73(2): 477–484. 2007.

HARRIS P. N. Clinical management of infections caused by Enterobacteriaceae that express extended-spectrum β -lactamase and AmpC enzymes. **Semin Respir Crit Care Med**. 36(1):56-73, 2015.

HIRSCH, D.; et al. Identificação e resistência a antimicrobianos de espécies de *Aeromonas* móveis isoladas de peixes e ambiente aquáticos. **Ciência Agrotécnica** 30 (6): 1211-1217,2006.

HASSEN, B; et al. Multidrug Resistance and the Predominance of blaCTX-M in Extended Spectrum Beta-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae of Animal and Water Origin. **J. Mol Microbiol Biotechnol** 28(4): 201-206.

HUANG, D. B; et al. Virulence characteristics and the molecular epidemiology of enteroaggregative *Escherichia coli* isolates from travellers to developing countries. **Journal of Medical Microbiology** 56: 1386–1392, 2007.

ISHII, S; et al. Relationship between phylogenetic groups, genotypic clusters, and virulence gene profiles of *Escherichia coli* strains from diverse human and animal sources. **Appl Environ Microbiol**. 73(18): 5703-10. 2007

JAWETZ, E; MELNICK, J.L; ADELBERG, E. **Medical Microbiology**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013, 877 p.

JONSSON, R; et AL. Novel Aggregative Adherence Fimbria Variant of Enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infect. Immun** 83(4) 1396-1405, 2015.

JOVENTINO, E. S; et al. Comportamento da diarreia infantil antes e após consumo de água pluvial em município do semiárido brasileiro. **Revista Texto e Contexto Enfermagem** 19 (4):691-699, 2010.

KAPER, J. B.; NATARO, J.P.; MOBBLEY, H.L.T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature reviews microbiology** 2 (2): 123-140, 2004.

KOHANSKI, M. A.; et al. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. **Nature Reviews: Microbiology** 8(6): 423-435, 2010.

KOOCHAKZADEH, A.; et al. Survey on O157:H7 enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) in cattle in Golestan province, Iran. **Iranian Journal of Microbiology** 6 (4): 276–280, 2014.

KÜMMERER, K. Resistance in the environment. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** 54 (2):311-320, 2004.

LAVAGNOLI, L. S; et al. Factores asociados con la contracción de enterobacterias resistentes al carbapenem. **Rev. Latino-Am. Enfermagem** 25: 04-27, 2017.

LEÃO, R. N. Q de. **Medicina Tropical e Infectologia na Amazônia**. Belém: Samauma, 2013, 1762p.

LIMA, I. F. N; et al. Prevalence of enteroaggregative *Escherichia coli* and its virulence-related genes in a case–control study among children from north-eastern. **Journal of Medical Microbiology** 62 (5): 683-693, 2013.

LIU, H; et al. Molecular characteristics of extended spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* isolated from the rivers and lakes in Northwest China. **BMC Microbiol** 18 (1): 125, 2018.

LOPES, P.R.K. **Qualidade microbiológica e pesquisa de *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (Stec) na cadeia produtiva do leite**. Dissertação (Mestrado em Ciências Aplicadas a Produtos para a Saúde) Niterói, Universidade Federal Fluminense, 2016. 117p.

LOUREIRO, R. J; et al. O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. **Rev. Portuguesa de Saúde Pública**. 34(1):77–84, 2016.

MACHADO, A. L; et al. Resistência antimicrobiana em cepas de *Escherichia coli* isoladas de pescado marinho comercializado na feira livre do Mucuripe - Fortaleza-Ce, Brasil. **Bol. Inst. Pesca** 41 (4): 931 – 943, 2015.

MAJOWICZ, S.E.; et al. Global Incidence of Human Shiga Toxin–Producing *Escherichia coli* Infections and Deaths: A Systematic Review and Knowledge Synthesis. **Foodborne Pathogens and Disease** 11 (6): 447-455, 2014.

MARTINEZ-MARTINEZ, L.; GONZALEZ-LOPEZ, J. J. Carbapenemases in Enterobacteriaceae: types and molecular epidemiology. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 32(4): 4-9, 2014.

MARTINS, A. F. M. M. **Prevalência de resistência a antimicrobianos em isolados ambientais de *Escherichia coli* e Enterococos**. Dissertação Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto Instituto Politécnico do Porto.

MARTINS, G. A. F; et al. Estudo epidemiológico e da qualidade da água em uma escola de ensino fundamental do município de Uberlândia, Minas Gerais: aspectos ambientais e sociais. **Em Extensão** 14(2): 104-121, 2015.

MELLA, S.M; et al. Propiedades microbiológicas, clasificación y relación estructura-actividad de cefalosporinas e importancia de las cefalosporinas de cuarta generación. **Rev Chil Infect** 18(1): 7-19, 2001.

MITTELSTAEDT, S; CARVALHO, V. M. Enteroemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) O157:H7 – Review. **Revista do Instituto da Ciência da Saúde** 24 (3): 175-182, 2006.

NATARO, J.P; KAPER, J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical microbiology rev* 11 (1): 142-185, 1998.

NAVE, H. H; et al. Perfil do gene de virulência e análise de repetições em tandem de número variável Multilocus (MLVA) de isolados de *Escherichia coli* enteroinvasora (EIEC) de pacientes com diarreia em Kerman, Irã. **Jundishapur Journal of Microbiology** 9 (6): 2016.

NGUYEN, Y; SPERANDIO V. Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) Pathogenesis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology** 2: 90, 2012.

NOGUEIRA K.S; et al. Occurrence of Extended-spectrum Beta-lactamases in Enterobacteriaceae isolated from hospitalized patients in Curitiba, Southern Brazil. **Braz J Infect Dis** 10 (6): 390-395, 2006.

NORDMANN, P; et al. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase producing bacteria. **The Lancet Infectious Diseases** 9 (4): 228-236, 2009.

OLIVEIRA, D. V; et al. Qualidade da água e identificação de bactérias Gram-negativas isoladas do arroio dilúvio. Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Evidência** 12 (1): 51-62, 2012.

OLIVEIRA, K.W; et al. Ocorrência de *Escherichia coli* multirresistentes a antimicrobianos nas principais praias do reservatório de lajeado – TO. **Engenharia ambiental- Espírito Santo do Pinhal** 9 (3): 338-351, 2012.

OLIVEIRA M.A; et al. *Enterobacteriaceae*: bactérias intestinais de organismos aquáticos, um risco à saúde pública – revisão de literatura. **Revista Científica de Medicina Veterinária** 13 (25): 1-20, 2015.

OKHUYSEN, P. C; DUPONT H. L. Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC): A Cause of Acute and Persistent Diarrhea of Worldwide Importance. **The Journal of Infectious Diseases** 202 (4): 503–505, 2010.

PAIVA, R.F.P.S de; SOUZA, M.F.P da. Associação entre condições socioeconômicas, sanitárias e de atenção básica e a morbidade hospitalar por doenças de veiculação hídrica no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública** 34 (1): 1-11, 2018

PARK, S. H; et al. Molecular Epidemiology of Extended-Spectrum B-Lactamase Producing *Escherichia Coli* in the Community and Hospital in Korea: Emergence of ST131 Producing CTX-M-15. **BMC Infectious Diseases** 12 (1): 12-149, 2012.

PARSOT, C. *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli* pathogenicity factors. **FEMS Microbiology Letters** 252 (1): 11–18, 2005.

PEIL, G.H.S. Avaliação da qualidade bacteriológica da água utilizada para abastecimento público no município de Pelotas-RS-Brasil. **Revista Ciência e Natura** 37 (1): 79-84, 2015.

PEREIRA, A.L.; PITA, J.R. ALEXANDER FLEMING (1881-1955) da descoberta da penicilina (1928) ao Prémio Nobel (1945). **Revista da Faculdade de Letras HISTÓRIA** 3(6): 129-151, 2005.

PHILIPPON, A; et al. A Structure-Based Classification of Class A β -Lactamases, a Broadly Diverse Family of Enzymes. **Clinical Microbiology Review** 29(1): 29-57, 2015.

PIAZZA, R.M.F; et AL. Infecções Intestinais causadas por *Escherichia coli* - Aspectos Microbiológicos. In: **Tratado de Infectologia**. São Paulo: Atheneu, 2009. p.1101- 1107.

QADRI, F; et al. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in Developing Countries: Epidemiology, Microbiology, Clinical Features, Treatment, and Prevention. **Clinical Microbiology Reviews** 18 (3): 465–483, 2005.

RASHEED M. U; et al. Antimicrobial drug resistance in strains of *Escherichia coli* isolated from food sources. **Rev. Inst. Med. trop** 56 (4): 341-346, 2014.

RAWAT, D; NAIR D. Extended-spectrum β -lactamases in Gram negative bacteria. **Journal of Global Infectious Diseases** 2(3): 263-273, 2010.

REGITANO, J. B; LEAL, R. M. P. L. Comportamento e impacto ambiental de antibióticos usados na produção animal brasileira comportamento e impacto ambiental de antibióticos usados na produção animal brasileira. **R. Bras. Ci. Solo** 34:601-616, 2010.

RIBEIRO, M; CORTINA, M.A. As principais bactérias de importância clínica e os mecanismos de resistência no contexto das Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS). **Revista Científica UMC** 1 (1): 1-12, 2016.

ROCHA, D.C.C. da; et al. Caracterização molecular de *Escherichia coli* enteropatogênica atípica em animais silvestres capturados na Região Amazônica. **Revista Pan Amaz Saúde** 8(1):9-16, 2017.

RODRIGUES, F.C.B.; MESQUITA, A.R.C. Enterobactérias produtoras de Beta-lactamase de espectro ampliado (ESBL) em uroculturas de transplantados renais: frequência e perfil de resistência. **Revista Brasileira de Análises Clínicas** 48(2):129-131, 2016

RODRIGUEZ-ANGELES, Guadalupe. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. **Salud Pública México** 44 (5): 464-475, 2002.

ROSA, J. L; et al. Características da *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC). **Saúde e ciência em ação – Revista Acadêmica do Instituto de Ciências da Saúde** 2 (1): 66-78, 2016.

SÁ, L.C de; et al. Qualidade microbiológica da água para consumo humano em duas áreas contempladas com intervenção de saneamento – Belém do Pará, Brasil. **Revista Epidemiologia e Serviços de Saúde** 14 (3): 171-180, 2005.

SAHA, M.R; JHORA, S.T. Detection of extended spectrum beta-lactamase producing Gram-negative organisms: hospital prevalence and comparison of double disc synergy and E-test methods. **IMC Journal of Medical Science** 12 (1): 32-36, 2519-1586.2018.

SANTOS, M.L.S; et al. Influência das condições da maré na qualidade de água do Rio Guamá e Baía do Guajará. **Tropical Jornal** 14 (1): 17-25, 2014.

SCALETSKY, I. C. A; et al. Diffusely Adherent *Escherichia coli* as a Cause of Acute Diarrhea in Young Children in Northeast Brazil: A Case-Control Study. **Journal of Clinical Microbiology** 40(2) (2002): 645–648, 2002.

SCHNEIDER, R. N.; NADVORNY, A.; SCHMIDT, V. Perfil de resistência antimicrobiana de isolados de *Escherichia coli* obtidos de águas superficiais e subterrâneas, em área de produção de suínos. **Revista Biotemas** 22 (3): 11-17, 2009.

SCHUROFF, P. A; et al. Qualidade microbiológica da água do Lago Igapó de Londrina - PR e caracterização genotípica de fatores de virulência associados a *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) e *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC). **Revista Semina: Ciências Biológicas e da Saúde** 35 (2): 11-20, 2014.

SHAW R. K; et al. Interaction of enteropathogenic *Escherichia coli* with human intestinal mucosa: role of effector proteins in brush border remodeling and formation of attaching and effacing lesions. **Infection and Immunity** 73(2): 1243-1251, 2005.

SILVA, K.C; LINCOPAN, N. Epidemiologia das betalactamases de espectro estendido no Brasil: impacto clínico e implicações para o agronegócio. **Jornal Bras Patol Med Lab.** 48(2): 91-99, 2012.

SOSPEDRA, I; et al. Liquid chromatography-ultraviolet detection and quantification of heat-labile toxin produced by enterotoxigenic *E. coli* cultured under different conditions. **Toxicon** 141: 73-78, 2017.

SOUSA, E; et al. Panorama situacional do serviço de esgotamento sanitário e sua relação com doenças de veiculação hídrica na região metropolitana de Belém – Pará. **Revista. Gestão e Sustentabilidade. Ambiental** 7 (3): 487-503, 2018

SOUSA JUNIOR, M.A.de; FERREIRA, E.S. dos; CONCEIÇÃO, G.C. da. Betalactamases de Espectro Ampliado (ESBL):um Importante Mecanismo de Resistência Bacteriana e sua Detecção no Laboratório Clínico. **Revista NewsLab.**63, 2004. 23 p.

SOUZA, C.O.; et.al. *Escherichia coli* enteropatogênica: uma categoria diarreio gênicas versátil. **Revista Pan Amazônica Saúde** 7 (2): 79-91, 2016.

SOUZA, C. P. F. A. de; FALQUETO, E. Descarte de Medicamentos no Meio Ambiente no Brasil. **Revista Brasileira Farmácia** 96 (2): 1142-1158, 2015.

STEFANIAK, L.A; et al. Resistência bacteriana: a importância das Beta-lactamases. **Revista UNINGÁ** 4(1): 123-137, 2005.

SUÁREZ, C; GUDIOL. F. Antibióticos betalactâmicos. Enfermedades Infecciosas y Microbiología **Clínica Elsevier.** 27(2): 116-129, 2009.

TADDEI, C. R; et al. Secreted auto transporter toxin produced by a diffusely adhering *Escherichia coli* strain causes intestinal damage in animal model assays. **FEMS Microbiol Lett** 15(2): 250-263, 2005.

TADESSE, D.A.; et al. Antimicrobial Drug Resistance in *Escherichia coli* from Humans and Food Animals, United States, 1950–2002. **Journal Emerging Infectious Diseases** 18 (5): 741-749, 2012.

TARDOCCHI, C.F.T; et al. Avaliação Microbiológica e Físico-química da Água para Consumo Humano do Município de Itaperuna/RJ. **Boletim do Observatório Ambiental Alberto Ribeiro Lamego** 8 (2): 33-46, 2014.

TEKINER I. H; ÖZPINAR H. Occurrence and characteristics of extended spectrum Beta-lactamases-producing Enterobacteriaceae from foods of animal origin **Brazilian journal of microbiology** 4 (7): 444–451, 2016.

THOMSON, K e MOLAND, E. S. Cefepime, Piperacillin-Tazobactam, and the Inoculum Effect in Tests with Extended-Spectrum -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae. **American Society for Microbiology** 45 (12).3548-3554.2001.

TORRES, N. H; et al. Fármacos no ambiente – revisão. **REA- Revista de Estudos Ambientais** 14 (4): 67-75, 2012.

TRABULSI, L.R; ORDONEZ, J.G. *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC). In: (Org). Microbiologia. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 277-283.

TRABULSI, L. R; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 6. ed. São Paulo: Atheneu, 2015. 912 p.

TURGEON, P; et al. Antimicrobial-resistant *Escherichia coli* in public beach waters in Quebec. **Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology** 23(2): 20-25, 2012.

UD-DIN, A; WAHID. S. Relationship among *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC) and their differentiation. **Brazilian Journal of Microbiology** 45 (4): 1131–1138, 2014.

UEDA J; et al. Impacto ambiental do descarte de fármacos e estudo da conscientização da população a respeito do problema. **Revista Ciências do Ambiente On-Line** 5(1):1-6, 2009

VASCONCELOS, F; et al. Perfil de resistência antimicrobiana de *Escherichia coli* isoladas do açude Santo Anastácio, Ceará, Brasil. **Arquivo do Instituto de Biologia** 77 (3): 405-410, 2010.

VASCONCELOS, V. de M. M.; SOUZA, C. F. Caracterização dos parâmetros de qualidade da água do manancial Utinga, Belém, PA, Brasil. **Ambi Água**, Taubaté 6 (2): 305-324, 2011.

VIEIRA, P. N; VIEIRA, S. L.V. Uso irracional e resistência a antimicrobianos em hospitais. **Arq. Cienc. Saúde UNIPAR, Umuarama** 21(3): 209-212, 2017.

WATSON, V. E; et al. Association of Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* with Diarrhea and Related Mortality in Kittens. **Journal of Clinical Microbiology** 55(9):2719-2735. 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. Relatório da OMS sobre Vigilância do Consumo de Antibióticos 2016 – 2018. **ISBN 978-92-4-151488-0** 127p.2018.

WINN, W.C.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; KONEMAN, E.W.; PROCOP. G.W.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WOODS, G.L. **Koneman Diagnóstico Microbiológico: texto e atlas colorido**. 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2018.

WOERTHER, P.L; et al. Trends in Human Fecal Carriage of Extended-Spectrum β -Lactamases in the Community: Toward the Globalization of CTX-M. **Clinical Microbiology Reviews** 26 (4): 744-758, 2013.

YAMASHITA, N.; et al. Ocorrência de bactérias resistentes aos antimicrobianos na bacia do rio Yodo, Japão, e determinação de bactérias produtoras de beta- lactamases. **Ecotoxicol. Environ Saf.** 143: 38-45.

ZINSSTAG, J; et al. From “one medicine” to “one health” and systemic approaches to health and well-being. **Preventive Veterinary Medicine** 101:148–156, 2011.