



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de São José do Rio Preto

Luciângela de Oliveira Pereira

Perfil de resistência aos antimicrobianos em coliformes isolados do
Sistema Municipal de Abastecimento de Água de São José do Rio
Preto-SP

São José do Rio Preto-SP
2013

Luciângela de Oliveira Pereira

Perfil de resistência aos antimicrobianos em coliformes isolados do
Sistema Municipal de Abastecimento de Água de São José do Rio
Preto-SP

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, área Bioquímica e Biologia Molecular de Microrganismos, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus São José do Rio Preto, SP.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Mara Corrêa Lelles Nogueira

São José do Rio Preto-SP
2013

Pereira, Luciângela de Oliveira

Perfil de resistência aos antimicrobianos em coliformes isolados do Sistema Municipal de Abastecimento de Água de São José do Rio Preto-SP / Luciângela de Oliveira Pereira. – São José do Rio Preto: [s.n.], 2013.

81 f. : 14 il. ; 30 cm.

Orientador: Mara Corrêa Lelles Nogueira

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Microbiologia. 2. Coliformes. 3. Beta-lactamase de espectro estendido. 4. Quinolonas. 5. Água. I. Nogueira, Mara Corrêa Lelles. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU- 579.84

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
Campus de São José do Rio Preto – UNESP

Luciângela de Oliveira Pereira

Perfil de resistência aos antimicrobianos em coliformes isolados do
Sistema Municipal de Abastecimento de Água de São José do Rio
Preto-SP

Dissertação apresentada para obtenção do
título de Mestre em Microbiologia, área
Bioquímica e Biologia Molecular de
Microrganismos, junto ao Programa de Pós-
Graduação em Microbiologia do Instituto
de Biociências, Letras e Ciências Exatas da
Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”, Campus São José do Rio
Preto, SP.

Banca Examinadora

Prof^a. Dr^a. Mara Corrêa Lelles Nogueira
Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
Orientadora

Dr^a. Miyoko Jakabi
Instituto Adolfo Lutz – São Paulo

Prof^a. Dr^a. Márcia Cristina Bisinoti
UNESP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto-SP
21 de maio de 2013

AGRADECIMENTOS

A Deus e a meus Santos, por guiarem constantemente meus pensamentos e ideias por caminhos prósperos e de luz.

Aos meus pais, Juarez e Izilda, pelo amor, dedicação e principalmente, confiança de que eu conquistaria meus sonhos, fazendo dos meus os seus.

À minha irmã Lilian, que sempre esteve presente nos diversos momentos da minha vida, apoiando de todas as formas a minha carreira.

Ao meu namorado, Wellington, pelo seu amor, carinho, apoio e companheirismo.

À minha amiga-irmã Patrícia Maldonado, pela amizade, pela paciência, pelos conselhos e pelos incontáveis momentos de alegria e descontração.

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Mara Corrêa Lelles Nogueira, por ter me acolhido em sua equipe de pesquisa, pelo apoio e por seus valiosos ensinamentos durante a pós-graduação.

Aos membros da banca examinadora, que tão gentilmente aceitaram dispensar seu tempo na correção deste trabalho, adicionando experiência e conhecimento ao mesmo.

À Prof^a. Dr^a. Alessandra Vidotto e à Prof^a. Dr^a. Eleni Gomes, pela grande contribuição neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Mauricio Lacerda Nogueira, por ceder o Laboratório de Pesquisa em Virologia para a realização de grande parte deste trabalho.

Às amigas Máira Arroyo, Juliana Tiemi, Simone Quintão, Mayra Mataruco, pela paciência, atenção e colaboração. Vocês foram essenciais para a realização deste trabalho e muito importantes nesta fase da minha vida!

Ao colaborador Tiago Casella pela orientação em diversas etapas desta pesquisa.

À Milena Polotto, por colaborar na identificação dos isolados.

À Tatiana Elias Colombo, por auxiliar nos sequenciamentos dos genes.

À amiga Jacqueline Tanury, por incentivar e apoiar meu crescimento profissional.

À amiga e companheira de trabalho Fernanda Pires, por sua dedicação em realizar as análises microbiológicas no SeMAE. Agradeço pela sincera amizade e pela imensa colaboração!

À UNESP, pela oportunidade de aprimorar meus conhecimentos através deste curso de pós-graduação.

À FAMERP, pelo espaço amplamente utilizado durante o desenvolvimento do projeto.

Ao SeMAE por autorizar esta pesquisa, pelo apoio e contribuição para realização deste curso de pós-graduação.

RESUMO

Bactérias resistentes aos antimicrobianos são um importante problema de saúde pública, pois causam infecções de difícil tratamento que resultam em maiores períodos de internação, aumento das taxas de mortalidade e dos custos da assistência à saúde. Entre as estratégias para a prevenção e controle deste problema, a detecção de bactérias resistentes no ambiente tem ganhado importância, e neste contexto, o ambiente aquático tem recebido atenção por ser um importante reservatório de genes de resistência, destacando-se os genes que codificam as β -lactamases de espectro estendido (ESBLs) e de resistência às quinolonas. A produção de ESBLs é uma ameaça à terapia antimicrobiana, pois estas enzimas inativam as cefalosporinas de terceira geração, que constituem a principal opção para o tratamento de infecções graves por bactérias Gram-negativas. A resistência às quinolonas também é um problema porque estes antimicrobianos são alternativas para o tratamento de infecções por bactérias Gram-negativas produtoras de ESBLs. Este estudo teve como objetivos investigar no Sistema Municipal de Abastecimento de São José do Rio Preto-SP, a presença de coliformes resistentes às cefalosporinas de terceira geração e às quinolonas, e investigar nos isolados a presença de genes determinantes da produção de ESBLs do tipo TEM, SHV e CTX-M, e de resistência às quinolonas (*qnrA*, *qnrB* e *qnrS*). O total de 7899 amostras de água foi coletado entre julho a novembro de 2011. Estas foram submetidas à filtração em membrana utilizando o Ágar Endo para o isolamento bacteriano. Os testes de suscetibilidade aos antimicrobianos foram realizados de acordo com o CLSI e em adição foi realizado teste fenotípico para produção de ESBL. PCR com *primers* específicos foram conduzidos para a detecção dos genes *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M}, *qnrA*, *qnrB* e *qnrS*. Entre os 72 coliformes isolados, nenhum apresentou teste fenotípico positivo para produção de ESBLs, porém 22 isolados apresentaram resistência a alguma das cefalosporinas de terceira geração. Dentre estes, 40,90% isolados apresentaram o gene *bla*_{SHV-like} e 9,09% isolados apresentaram o gene *bla*_{TEM-1}. A resistência ao

ceftiofur, uma cefalosporina de terceira geração para uso veterinário, também foi observada em 13 isolados. As β -lactamases tipo AmpC, ACT- 1 e MIR-1 foram detectadas em 2 isolados e em 3 isolados foi detectado o gene *qnrS*. Neste estudo observamos que nos coliformes isolados de águas distribuídas em São José do Rio Preto, as taxas de resistência aos β -lactâmicos e quinolonas são baixas, sendo que não foram detectados coliformes produtores de ESBLs. Entretanto, a presença de coliformes resistentes ao ceftiofur pode indicar a ocorrência de uma fonte de contaminação específica, que deve ser identificada. A detecção *Serratia marcescens* e *Klebsiella pneumoniae* carreadoras do gene *qnrS* reflete a ampla disseminação deste mecanismo de resistência às quinolonas na comunidade, principalmente quando considera-se a baixa frequência de detecção de coliformes nas amostras estudadas. Sendo assim, apesar de a água distribuída pelo SeMAE apresentar baixos índices de contaminação por coliformes resistentes aos antimicrobianos, estudos de vigilância devem ser continuamente realizados.

Palavras-chave: coliformes, β -lactamases de espectro estendido, quinolonas.

ABSTRACT

Bacteria resistant to antimicrobial cause infections which require longer periods of hospitalization, increase the mortality rates and also the expenses with health care. Among the strategies for the prevention and control of this problem, the detection of resistant bacteria in the environment has been more important and, in this context, the aquatic environment has been paid attention for being an important reservoir of resistance gene, especially the genes encoding the extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) and quinolone resistance. The production of ESBLs is a threat to antimicrobial therapy because these enzymes inactivate third generation cephalosporins, which are the primary choice for treatment of severe infections caused by Gram-negative bacteria. The quinolone resistance is also a problem because they are alternatives for antimicrobial treatment of infections caused by Gram-negative bacteria producing ESBLs. This study aimed to investigate in Municipal System of Supply in São José do Rio Preto-SP, the presence of coliform bacteria resistant to third generation cephalosporins and to quinolones and also investigate in isolated bacteria the presence of determinant genes for ESBLs production (TEM, SHV and CTX-M) and of quinolones resistance (qnrA, qnrB and qnrS). All the 7899 water samples were collected from July to November 2011. They were subjected to membrane filtration using Endo Agar for bacterial isolation. The antimicrobial susceptibility testings were carried out according to CLSI and in addition was performed phenotypic test for ESBL production. PCR with specific primers were performed in order to detect genes bla_{SHV} , bla_{TEM} , bla_{CTX-M} , qnrA, qnrB e qnrS. None of the 72 isolated coliforms presented this phenotypic test positive for ESBL production, but 22 isolated coliforms presented resistance to any of the third generation cephalosporines. Out of them, 40.90% isolated presented $bla_{SHV-like}$ gene and 9.09% isolated presented bla_{TEM-1} gene. Resistance to ceftiofour, a third generation cephalosporine for veterinary use, was also observed in 13 isolated ones. AmpC type β -lactamases, ACT- 1 and MIR-1 were detected in 2 isolated

*coliforms and in 3 isolated was detected the qnrS gene. This study showed that the coliform isolates from water distributed in São José do Rio Preto, rates of resistance to β -lactams and quinolones are low, and no coliforms were detected ESBL producers. However, the presence of coliform bacteria resistant to ceftiofur may indicate the occurrence of a specific contamination source, to be identified. The detection *Serratia marcescens* and *Klebsiella pneumoniae* gene carrier qnrS reflects the wide dissemination of this mechanism of resistance to quinolones in the community, especially when one considers the low frequency of detection of coliforms in the samples studied. Thus, although the water distributed by SeMAE show low levels of contamination by coliforms resistant to antimicrobials surveillance studies should be carried out continuously.*

Keywords: *coliforms, β -lactamases extended spectrum, quinolone.*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Fotografia 1 – Características das colônias de coliformes em Ágar Endo	51
Fotografia 2 – Gel de eletroforese da multiplex-PCR para detecção dos genes <i>bla_{SHV}</i> , <i>bla_{TEM}</i> e <i>bla_{CTX-M}</i>	61
Fotografia 3 – Gel de eletroforese da multiplex-PCR para detecção dos genes <i>bla_{SHV}</i> , <i>bla_{TEM}</i> e <i>bla_{CTX-M}</i>	62
Fotografia 4 – Gel de eletroforese da PCR para detecção dos genes <i>bla_{MIR-1}</i> / <i>bla_{ACT-1}</i>	65
Fotografia 5 – Gel de eletroforese da PCR para detecção do gene <i>qnrS</i>	66
Gráfico 1 – Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos β -lactâmicos	54
Quadro 1 – Padrão microbiológico da água para consumo humano	36
Quadro 2 – Antimicrobianos utilizados nos testes de suscetibilidade	39
Quadro 3 – <i>Primers</i> utilizados na PCR para detecção dos genes <i>bla_{SHV}</i> , <i>bla_{TEM}</i> e <i>bla_{CTX-M}</i>	43
Quadro 4 – <i>Primers</i> utilizados na PCR para detecção dos genes <i>AmpC</i>	45
Quadro 5 – <i>Primers</i> utilizados na PCR para detecção dos genes <i>qnrA</i> , <i>qnrB</i> e <i>qnrS</i>	46
Quadro 6 – <i>Primers</i> que foram utilizados para as reações de sequenciamento de genes <i>bla</i>	48
Quadro 7 – Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos nos isolados onde foi detectado o gene <i>bla_{SHV-like}</i>	63
Quadro 8 – Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos nos isolados onde foi detectado o gene <i>bla_{TEM-1}</i>	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Suscetibilidade aos antimicrobianos e diversidade genotípica das cepas isoladas no estudo.....	55
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AK – amicacina

AMC – amoxicilina/ácido clavulânico

ATCC – “American Type Culture Collection”

ATM – aztreonam

CAZ – ceftazidima

CESP – *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Serratia* e *Providencia*

CN – gentamicina

CRO – ceftriaxona

CTX – cefotaxima

DNA - Deoxyribonucleic Acid (Ácido desoxirribonucleico)

dNTP – “Desoxynucleoside Triphosphate”

EFT – ceftiofur

ENO – enrofloxacin

ETP – ertapenem

EUCAST – European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

FAMERP – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto

FEP – cefepima

FOX – cefoxitina

g – grama

°C – Graus Celsius

IPM – imipenem

KF – cefalotina

LEV – levofloxacin

µl – microlitro

mM – milimolar

MgCl₂ - Cloreto de Magnésio

MXF – moxifloxacin

NA - ácido nalidíxico

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

OFX – ofloxacina

pb – pares de base

PCR – *Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia de Polimerase)

pmol - picomol

rpm – rotações por minuto

SAM – ampicilina/sulbactam

SeMAE – Serviço Municipal Autônomo de Água e Esgoto

TOB – tobramicina

TZP – piperacilina/tazobactam

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	17
2 REVISÃO DA LITERATURA	21
2.1 Caracterização da família Enterobacteriaceae	21
2.2 Enterobacteriaceae e Resistência às Drogas β -Lactâmicas	22
2.2.1 ESBLs do tipo SHV	24
2.2.2 ESBLs do tipo TEM	25
2.2.3 ESBLs do tipo CTX-M	25
2.3 β -lactamase AmpC	27
2.4 Resistência às quinolonas	27
3 RELEVÂNCIA	31
4 OBJETIVOS	33
4.1 Objetivo geral	33
4.2 Objetivos específicos	33
5 MATERIAL E MÉTODOS	35
5.1 Localização geográfica e caracterização da área estudada	35
5.2 Coleta das Amostras	35
5.3 Análises Microbiológicas realizadas no SeMAE	37
5.4 Análises Microbiológicas realizadas na FAMERP	38
5.4.1 Identificação dos isolados	38
5.4.2 Testes de suscetibilidade aos antimicrobianos	38
5.4.3 Teste fenotípico para produção de ESBL	40
5.5 Estudos Moleculares	41
5.5.1 Reativação dos isolados e extração de DNA genômico bacteriano	41
5.5.2 Detecção dos genes <i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{TEM} e <i>bla</i> _{CTX-M} por Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)	42

SUMÁRIO

5.5.3 Detecção dos genes AmpC por Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)	43
5.5.4 Detecção dos genes <i>qnrA</i> , <i>qnrB</i> e <i>qnrS</i> por Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)	45
5.5.5 Sequenciamento dos genes identificados	46
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
6.1 Resultados Microbiológicos	50
6.1.1 Análise estatística	51
6.1.2 Suscetibilidade aos antimicrobianos	53
6.1.3 Teste fenotípico para a produção de ESBL	54
6.2 Resultados Moleculares	61
6.2.1 Detecção de genes de resistência às drogas β -lactâmicas	61
6.2.2 Detecção de genes de resistência às quinolonas	66
7 CONCLUSÕES	68
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A água é um recurso indispensável para a sobrevivência humana e de todas as espécies vivas, pois nenhum processo metabólico ocorre sem a sua ação direta e indireta. Assim, a qualidade da água de abastecimento exerce uma influência decisiva na qualidade de vida das populações (SETTI, 2000; NETO & FERREIRA, 2007). Neste contexto, é importante considerar que a qualidade da água distribuída tem forte impacto sobre a saúde pública, pois a ingestão de água contaminada é uma reconhecida forma de transmissão de doenças infecciosas e um importante problema de saúde pública em todo o mundo, responsável por altas taxas de mortalidade e morbidade (WHO, 2012).

No município de São José do Rio Preto, situado no noroeste do Estado de São Paulo, o órgão responsável pelo serviço de abastecimento de água é o SeMAE - Serviço Municipal Autônomo de Água e Esgoto, que realiza a captação, adução, tratamento, reserva e distribuição de água potável, além da coleta, afastamento e tratamento dos esgotos domésticos do município de São José do Rio Preto e distritos de Talhado e Engenheiro Schmidt (SeMAE, 2006). A fim de garantir a qualidade da água destinada ao consumo humano e reduzir o risco para a saúde da população, o SeMAE realiza análises laboratoriais que avaliam a qualidade da água fornecida no município, de acordo com a Portaria 2914, de 12 de dezembro de 2011, normatizada pelo Ministério da Saúde do Brasil, para definir os parâmetros organolépticos, físicos, químicos, microbiológicos e radioativos de potabilidade da água (BRASIL, 2011).

Entre as análises determinadas pela Portaria 2914/2011, incluem-se os ensaios microbiológicos para a detecção de bactérias do grupo dos coliformes, que são bacilos Gram negativos, pertencentes à família Enterobacteriaceae. A presença de coliformes termotolerantes, principalmente *Escherichia coli*, é considerada como indicador da contaminação microbiana de origem fecal, indicando falhas no controle sanitário, sendo que elevadas contagens podem estar relacionadas à presença de níveis significativos de enteropatógenos (MADIGAN

et al., 2010; BRASIL, 2011). Entre estes, destacam-se espécies de Enterobacteriaceae, sendo diversos sorotipos de *E. coli*, *Salmonella* spp. e *Shigella* spp. responsáveis por infecções cuja gravidade varia desde gastroenterites autolimitadas até infecções sistêmicas, que necessitam de internação hospitalar e tratamento com antimicrobianos (ASHBOLT, 2004; FLECKENSTEIN et al., 2010; SÁNCHEZ-VAGAS et al., 2011; SHAKOOR et al., 2012). Além disso, outras espécies de Enterobacteriaceae como *K. pneumoniae*, *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Morganella morganii*, *Proteus* spp. e *Providencia* spp., além de diferentes sorotipos de *E. coli* podem causar infecções extraintestinais após translocar-se do trato gastrointestinal para outros sítios corporais (SHAKOOR et al., 2012). Nos últimos anos, tem emergido na comunidade cepas de *E. coli* e *Klebsiella* spp., que são uropatogênicas multirresistentes, e algumas cepas de *K. pneumoniae* tem demonstrado capacidade de causar abscesso piogênico primário de fígado e diarreia (FLECKENSTEIN et al., 2010; SHAKOOR et al., 2012).

A resistência aos antimicrobianos apresentada por Enterobacteriaceae é um importante problema de saúde pública em todo o mundo, pois causa falha da antibioticoterapia, maiores períodos de internação hospitalar, aumento das taxas de mortalidade e elevação dos custos da assistência à saúde (TALBOT et al., 2006; PITOUT, 2008; SOSTARICH et al., 2008). Este fenômeno é visto como consequência do uso indiscriminado de antimicrobianos na medicina humana, veterinária e na agricultura (WHO, 2001). Nos últimos anos, a presença de bactérias apresentando resistência a diversas classes de antimicrobianos em ambientes aquáticos e em águas destinadas ao consumo humano tem recebido atenção e destacado o papel destes ambientes e da água como importante reservatório de bactérias e de genes de resistência (AZEVEDO et al., 2012).

As principais rotas de contaminação microbiológica da água são o descarte de efluentes domésticos, hospitalares, industriais e agrícolas sem tratamento (BAQUERO et al., 2008), que podem conter diversas espécies de Enterobacteriaceae resistentes a múltiplos antimicrobianos (DOLEJSKA et al., 2011; BOECK et al., 2012; HERNANDEZ et al., 2012). Estas bactérias,

adquiridas por humanos e animais pelo consumo de água contaminada, colonizam e/ou causam infecções e são posteriormente excretadas no meio ambiente, onde potencialmente contaminam novos reservatórios ambientais, incluindo fontes de água potável (RYSZ & ALVAREZ, 2004; PRUDEN et al., 2006; MADIGAN et al., 2010). Além disso, o ambiente aquático é considerado um “bioreator”, ocorrendo intensa troca de genes de resistência entre diferentes espécies de bactérias, e onde novos mecanismos de resistência constantemente surgem e evoluem (LUPO et al., 2012).

Sendo assim, a importância de se estudar a disseminação de bactérias resistentes a antimicrobianos e a diversidade de genes de resistência no ambiente aquático tem sido reforçada (PRUDEN et al., 2012). Este estudo visa avaliar a presença de Enterobacteriaceae do grupo dos coliformes resistentes aos antimicrobianos da classe dos β -lactâmicos e quinolonas nas águas distribuídas para a população de São José do Rio Preto. Os dados aqui apresentados poderão fornecer indicativos para a adoção de medidas de controle, auxiliando a contenção da emergência e prevenindo a evolução futura da resistência.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2. 1 Caracterização da família Enterobacteriaceae

As Enterobacteriaceae são bastonetes retos, não formadores de esporos, com motilidade variável, são oxidase negativos, catalase positivos, anaeróbios facultativos, fermentadores de glicose com e sem produção de gás, redutoras de nitrato a nitrito, além de crescerem em meios básicos, ricos e seletivos (MURRAY, 2002). Estão amplamente distribuídas na natureza, sendo encontradas no solo, águas, plantas, frutas, vegetais, carnes, ovos, grãos, trato gastrointestinal de animais, insetos e do homem (SILVA et al., 2010).

Entre as Enterobacteriaceae, existe um subgrupo de bactérias denominado coliformes totais, que é composto por espécies que produzem a enzima β -galactosidase e são capazes de fermentar a lactose com produção de gás, em 24 a 48 horas, a 35° C. Mais de 20 espécies se encaixam nessa definição, que inclui a *E. coli*, espécie cujo habitat natural é o trato gastrointestinal de humanos e de animais endotérmicos, e espécies não exclusivamente entéricas, como *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp. e *Serratia* spp., entre outras. Os coliformes termotolerantes, comumente chamados de coliformes fecais, são uma subdivisão do grupo dos coliformes totais, restringindo-se aos membros capazes de fermentar a lactose em 24 horas a 44,5-45,5 °C. Este grupo inclui pelo menos três gêneros, que são: *Escherichia*, *Klebsiella* e *Enterobacter* (MURRAY, 2002; SILVA et al., 2005; SILVA et al., 2010).

A presença de *Escherichia coli* na água de abastecimento indica contaminação de origem fecal, sendo que elevadas contagens podem estar relacionadas a níveis significativos de contaminação por outras espécies de enteropatógenos, como a *Salmonella* spp e *Shigella* spp. (GILL et al., 1996; EISEL et al., 1997; JAY, 2000).

2.2 Enterobacteriaceae e Resistência às Drogas β -Lactâmicas

As drogas β -lactâmicas estão entre as drogas antimicrobianas mais prescritas em todo o mundo (LIVERMORE, 1995). Esta família é constituída por penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos, cefamicinas e carbapenêmicos (GUPTA, 2007), sendo que as cefalosporinas de espectro estendido e os carbapenêmicos estão entre as principais escolhas para o tratamento de infecções graves causadas por diferentes espécies de Enterobacteriaceae (COQUE, 2008). Estas drogas compartilham um componente estrutural característico, o anel β -lactâmico, imprescindível para a inativação das transpeptidases que catalisam ligações cruzadas na fase final de síntese do peptidoglicano. A ação desses antimicrobianos resulta na formação de uma parede celular bacteriana frágil, que sofre lise devido a diferenças na pressão osmótica entre o meio extracelular e intracelular (FONZÉ, 1995; MADIGAN et al., 2010).

Entre os patógenos da família Enterobacteriaceae, a produção de β -lactamases é o principal mecanismo de resistência aos β -lactâmicos (MEDEIROS & CRELLIN, 1997; SMET et al., 2009). As β -lactamases são enzimas que hidrolisam os antibióticos β -lactâmicos pela hidroxilação irreversível da ligação amida do anel β -lactâmico, gerando compostos sem atividade antimicrobiana (BUSH, 2001). Dois esquemas são comumente utilizados na classificação das β -lactamases: a classificação molecular de Ambler (AMBLER, 1980; AMBLER et al., 1991) e a classificação funcional de Bush-Jacoby-Medeiros (BUSH et al., 1995). A classificação molecular de Ambler baseia-se na homologia de aminoácidos entre as enzimas, e reconhece quatro classes, designadas de A a D. As classes A, C e D são enzimas que contêm serina em seu sítio ativo e a classe B é representada pelas metaloenzimas, contendo zinco no sítio ativo. A classificação funcional de Bush-Jacoby-Medeiros baseia-se na similaridade entre os perfis de substratos e inibidores das β -lactamases, sendo mais utilizada em estudos microbiológicos. Entretanto, atualmente, utiliza-se a combinação das características estruturais e funcionais das β -lactamases (GISKE et al., 2009).

Membros da família Enterobacteriaceae comumente expressam β -lactamases de espectro restrito, que conferem resistência à penicilinas mas não às cefalosporinas de amplo-espectro (BUSH et al., 1995; LIVERMORE, 1995). O surgimento das β -lactamases de espectro estendido (ESBLs), veio em resposta à introdução, no início dos anos 80, das cefalosporinas de terceira geração, com amplo espectro de atividade, exemplificando a capacidade de adaptação apresentada por patógenos da família Enterobacteriaceae (PATERSON & BONOMO, 2005).

A ação das ESBLs não se restringe apenas às penicilinas e cefalosporinas de primeira e segunda geração, mas também sobre as oxiamino-cefalosporinas (cefalosporinas de terceira geração como a cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona) e cefalosporinas de quarta geração (cefepime) e monobactams (aztreonam) (STÜRENBURG & MACK, 2003). Essas enzimas representam um importante problema de saúde pública, pois as bactérias produtoras são a maior causa de falha terapêutica com cefalosporinas (BRADFORD, 2001; BUSH, 2001).

A maioria das ESBLs identificadas em Enterobacteriaceae é do tipo TEM, SHV e CTX-M (BRADFORD, 2001; BONNET, 2004), sendo que, atualmente, as CTX-M são as mais frequentemente encontradas entre isolados clínicos humanos de origem hospitalar e da comunidade (BAUERNFEID et al., 1990; BONNET, 2004; ROMERO et al., 2005; BUSH, 2013). Atualmente, existem descritas 172 β -lactamases do tipo SHV, 208 tipo TEM e 141 tipo CTX-M (<http://lahey.org/studies/>, último acesso em 05/05/2013).

A maioria das ESBLs são codificadas por genes localizados em cassetes gênicos localizados em plasmídeos conjugativos, sequências de inserção (IS), integrons e transposons, o que explica sua facilidade de disseminação por transferência horizontal entre diferentes espécies de bactérias Gram-negativas, principalmente as Enterobacteriaceae (MEDEIROS, 1997; POIREL et al., 2001). Esta transferência horizontal de genes de resistência ocorre inclusive no meio ambiente, e para agravar o problema, genes de ESBLs podem coexistir em integrons de classe 1 com cassetes de genes de resistência a outras classes de

antimicrobianos, como aminoglicosídeos, fluoroquinolonas, cefamicinas e sulfas, resultando no fenótipo de multirresistência que favorece sua seleção (FLUIT & SCHMITZ, 2004; ALEKSHUM & LEVY, 2004; CARATTOLI, 2008).

2.2.1 ESBLS do tipo SHV

As β -lactamases tipo SHV, são enzimas disseminadas entre as Enterobacteriaceae, além de serem encontradas em outros bacilos Gram negativos (LIVERMORE & WOODFORD, 2006).

As ESBLS tipo SHV possuem esta denominação em função da sua estrutura química (“sulphydryl variable”) (NAAS et al., 2008) e são originadas de mutações pontuais no gene *bla*_{SHV-1}, que codifica uma enzima de espectro restrito, a SHV-1 que possui atividade contra as penicilinas (HERITAGE et al., 1999). Mutações em *bla*_{SHV-1} resultam em remodelamento do sítio ativo da enzima e expansão de sua atividade hidrolítica (JACOBY & BUSH, 2005), sendo as mutações que codificam a substituição de glicina por serina, na posição 238 ou de glutamato por lisina, na posição 240, as mais comuns nas ESBLS do tipo SHV, conferindo resistência a ceftazidima e a cefotaxima, respectivamente (HULETSKY et al., 1993).

A primeira ESBLS tipo SHV foi detectada em isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella ozaenae* e *Serratia marcescens*, em 1983, sendo denominada SHV-2 (KNOTHE et al., 1983). Atualmente encontram-se distribuídas por todo o mundo (BONNET, 2004; CORKILL et al; 2001; GARCIA et al., 2008; MENDES et al; 2004; MINARINI et al., 2007). Geralmente, variantes de *bla*_{SHV} estão localizados em transposons e podem ser disseminados facilmente pelos plasmídeos conjugativos entre diferentes espécies de bactérias (HAEGGMAN et al., 2004; JACOBY & MUÑOZ-PRICE, 2005; PITOUT et al., 2008).

2.2.2 ESBLs do tipo TEM

As ESBL tipo TEM são derivadas de enzimas de espectro restrito TEM -1 e TEM-2 (PATERSON & BONOMO, 2005). A primeira variante descrita, TEM-1, foi assim nomeada em homenagem a uma menina grega de nome Temoneira, de quem foi isolada (NAAS et al., 2008). TEM-1 e TEM-2 são codificadas por genes *bla*_{TEM} localizados em sua maioria no cromossomo bacteriano (LIVERMORE, 1995; GUPTA, et al. 2007). Mutações pontuais permitiram a remodelagem de seu sítio ativo e expansão de sua atividade hidrolítica sobre as oximino-cefalosporinas, como a cefotaxima e ceftazidima (SIROT et al., 1987; JACOBY & BUSH, 2005).

Em 1987, foi descrita TEM-3, a primeira ESBL tipo TEM, identificada em isolados clínicos de *K. pneumoniae* (SIROT et al., 1987). Posteriormente, novas variantes foram descritas, sendo codificadas por genes localizados em transposons e plasmídeos, o que permite a rápida disseminação entre diversas espécies de bactérias (HAEGGMAN et al., 2004; JACOBY & MUÑOZ-PRICE, 2005). De fato, as ESBLs tipo TEM encontram-se distribuídas globalmente (BONNET, 2004; CORKILL et al; 2001; GARCIA et al., 2008; MENDES et al; 2004; MINARINI et al., 2008), e são identificadas em importantes patógenos da família Enterobacteriaceae (HERITAGE et al., 1999), destacando-se *E. coli* e *K. pneumoniae*, mas têm sido também descritas em outras espécies como *Enterobacter aerogenes* e *Salmonella* spp., além de bacilos Gram negativos não fermentadores, como *Pseudomonas aeruginosa* (BRADFORD, 2001).

2.2.3 ESBLs do tipo CTX-M

O potencial hidrolítico sobre as cefalosporinas de amplo espectro constitui uma característica intrínseca das β -lactamases tipo CTX-M, não sendo resultante de mutações em enzimas precursoras, como ocorre com as enzimas das famílias

SHV e TEM (BUSH et al., 1993; BONNET, 2004; BABIC et al., 2006). As CTX-M são reconhecidas por hidrolisarem preferencialmente a cefotaxima, apesar de, atualmente, serem conhecidas algumas variantes de CTX-M com alta capacidade hidrolítica sobre a ceftazidima (BONNET et al., 2001; BOU et al., 2002; PITOUT et al., 2004; POIREL et al., 2001).

A primeira CTX-M foi identificada na Alemanha, em 1989, em um isolado clínico de *E. coli* e denominada CTX-M-1 (PITOUT et al., 2004). Em 1990, foi descrita a CTX-M-2, isolada de cepas de *Salmonella* resistentes à cefotaxima durante uma epidemia na Argentina (BAUERNFEIND et al., 1990). Estas enzimas são atualmente as ESBLs mais frequentemente encontradas em espécies da família Enterobacteriaceae, principalmente na Europa e em alguns países da América do Sul (BAUERNFEIND et al., 1990; BONNET, 2004; CANTON & COQUE, 2006; PITOUT & LAUPLAND, 2008; BUSH, 2013).

As enzimas CTX-M, são agrupadas de acordo com a similaridade da sequência de aminoácidos em cinco grupos distintos, CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9, CTX-M-25. O grupo CTX-M-1, inclui as enzimas CTX-M-3, -10, -11, -12, -15, -22, -23, -28, -29, -30, -32, -33, -36, -54, -55, -57 e UOE-1. O grupo CTX-M-2 inclui as enzimas CTX-M-2, -4, -7, -20, -31, -44. O grupo CTX-M-8 inclui as enzimas CTX-M-8, CTX-M-40 e CTX-M-63. O Grupo CTX-M-9 inclui as enzimas CTX-M-9, -13, -14, -16 a -19, -21, -27, -45, -46, -47, -48, -49 e -50. O grupo CTX-M-25 inclui CTX-M-25, -26, -39 e -41 (BONNET, 2004; CANTON & COQUE, 2006).

As CTX-M apresentam um perfil pandêmico, estando difundidas entre várias espécies bacterianas. Isto tem sido demonstrado pelo reconhecimento de múltiplos clones e elementos genéticos móveis que carregam genes *bla*_{CTX-M} (CANTON & COQUE, 2003; PATERSON & BONOMO, 2005; TALBOT et al., 2006; PITOUT & LAUPLAND, 2008) e sua alta prevalência na comunidade (ENSOR et al., 2006). A facilidade de disseminação de *bla*_{CTX-M} é explicada por sua localização em cassetes gênicos localizados em transposons inseridos em plasmídeos conjugativos, que se disseminam horizontalmente entre diversas espécies bacterianas (POIREL et al., 2001; CANTON & COQUE, 2006).

2.3 β -lactamase AmpC

As β -lactamases AmpC são enzimas codificados por genes de origem cromossômica denominadas *ampC* (*bla*_{MIR}, *bla*_{LAT}, *bla*_{ACT}, *bla*_{CMY}, *bla*_{FOX}, *bla*_{MOX}, *bla*_{DHA}, *bla*_{ACC}, *bla*_{BIL}, etc) e encontradas naturalmente em Enterobacteriaceae do grupo CESP (*Citrobacter*, *Enterobacter*, *Serratia* e *Providencia*). Nas bactérias deste grupo, ocorre a produção constitutiva das β -lactamases cromossômicas tipo AmpC que conferem diminuição de sensibilidade ou resistência a penicilinas associadas com inibidores de β -lactamases, cefalosporinas de 1ª geração e cefamicinas (LINDQUIST et al, 1989; PÉREZ-PÉREZ & HANSON, 2002; LIVERMORE & WOODFORD, 2006).

Em outras espécies de Enterobacteriaceae, estas enzimas também podem ser produzidas, mas os genes que as codificam têm localização plasmidial (PÉREZ-PÉREZ & HANSON, 2002). As enzimas tipo AmpC plasmidiais (pAmpC) foram identificadas em 1989, e no presente são conhecidas quarenta e três variedades de CMY, sete de FOX, quatro de ACC, LAT e MIR, três de ACT e MOX e duas de DHA. CMY-2, é a pAmpC mais comumente encontrada entre membros da família Enterobacteriaceae (JACOBY, 2009).

2.4 Resistencia às quinolonas

As quinolonas são moléculas sintéticas desenvolvidas a partir de modificações da estrutura 4-quinolonas. Em 1962, foi descrito o ácido nalidíxico, um composto com atividade contra bactérias Gram- negativas (LESCHER et al., 1962). Seu uso clínico foi limitado ao tratamento de infecções urinárias não complicadas. Algumas modificações estruturais nesta primeira geração de quinolonas foram realizadas na tentativa de expandir o espectro de atividade e assim surgiram as quinolonas de segunda geração, como o ácido oxolínico e a cinoxacina (SPANGLER et al, 1996; BLONDEAU, 2004).

A terceira geração de quinolonas foi marcada pela adição do flúor, o que levou à classificação de seus compostos como floroquinolonas. A atividade contra Gram positivos em associação com a fluoração resultou em maior solubilidade desses fármacos em soluções oftálmicas, aumentando a utilidade terapêutica das quinolonas. (ITO et al., 1980).

Diferentes mecanismos estão envolvidos na resistência à quinolonas. Os principais mecanismos são a inibição da ação da DNA girase e topoisomerase IV impedindo a replicação do DNA bacteriano. Além disso, a diminuição do acúmulo do antimicrobiano no interior da célula bacteriana por impermeabilidade da membrana e hiperexpressão de sistemas de bomba de efluxo têm sido descrita. Estes mecanismos são mediados por genes cromossômicos (VILA et al., 1994; RUIZ, 2003).

Em 1994, foi descrito o primeiro determinante plasmidial de resistência às quinolonas (MARTINEZ-MARTINEZ et al., 1998), sendo que a produção de peptídeos de resistência às quinolonas (QnrA, QnrB, QnrC, QnrD e QnrS) tem ganhado destaque por ser encontrada em várias espécies de bactérias Enterobacteriaceae. As proteínas da família Qnr atuam através da inibição alostérica, impedindo a ligação da quinolona à topoisomerase IV e à DNA girase. Conferem resistência ao ácido nalidíxico e reduzida suscetibilidade às fluoroquinolonas (ROBICSEK et al., 2006).

A presença de Qnr A tem sido reportada em enterobactérias na Ásia, em muitos países europeus e, recentemente na América do Sul, destacando-se o Brasil (CAMBAU et al., 2006; WU et al., 2007; ELLINGTON et al., 2007; MINARINI et al., 2007; LAVILLA et al., 2008). O gene *qnrS* foi detectado primeiramente no Japão, em *Shigella flexneri* causadora de toxinfecção alimentar (HATA et al., 2005). Em 2006, outra variante do gene *qnr*, nomeado *qnrB*, foi identificado nos Estados Unidos em amostras bacterianas provenientes da Índia (ROBICSEK et al., 2006).

O número de infecções causadas por bactérias resistentes às quinolonas em diversas partes do mundo é agravado pela presença concomitante de outros mecanismos de resistência, como aos antibióticos β -lactâmicos, os quais são

extensivamente utilizados na prática clínica. Recentemente, muitas publicações têm ressaltado o aumento do percentual das enterobactérias que apresentam sensibilidade diminuídas às fluoroquinolonas e que são produtoras de ESBL, no Brasil e no mundo, em consequência da associação de mecanismos de resistência bacteriana (PATERSON et al., 2000; RODRIGUEZ-MARTINEZ et al., 2003; BRASME et al., 2007; HO et al., 2007; PEREIRA et al., 2007).

RELEVÂNCIA

3 RELEVÂNCIA

Bactérias resistentes a antimicrobianos presentes em águas destinadas para o consumo humano podem transmitir genes de resistência para bactérias presentes na microbiota intestinal humana e de animais (KRUSE & SORUM, 1994; CAPOZZI & SPANO, 2009). De fato, crescentes evidências demonstram que a resistência clínica está intimamente associada com bactérias e genes de resistência ambientais (ABRIOUEL et al., 2008), determinando a necessidade de compreensão da função ecológica de bactérias resistentes em ambientes não clínicos (MARTINEZ, 2007), como uma importante ferramenta para o delineamento de estratégias de prevenção e controle da disseminação da resistência (MENDES et al., 2005).

A determinação de agentes microbianos na água e o conhecimento do perfil fenotípico e genotípico de resistência a antimicrobianos é de fundamental importância, considerando que a resistência antimicrobiana constitui um risco à saúde pública, podendo comprometer o tratamento humano com antimicrobianos, no que se refere à dificuldade da escolha terapêutica em certas infecções, bem como a necessidade do uso de drogas mais onerosas. Portanto, as observações de resistência enfatizam a necessidade de um uso prudente e crítico dos antimicrobianos, buscando a prevenção da emergência e da disseminação de microrganismos resistentes.

Este estudo contribuirá para a identificação de indicadores de contaminação das águas do Sistema de Abastecimento do Município de São José do Rio Preto, visando fornecer subsídios ao SeMAE e demais órgãos de vigilância em saúde para controle e prevenção de doenças de transmissão e de origem hídrica, para melhoria das condições de vida da comunidade em questão e da qualidade da saúde pública.

OBJETIVOS

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar a suscetibilidade aos antimicrobianos em coliformes isolados de amostras de água tratada provenientes do Sistema Municipal de Abastecimento de Água de São José do Rio Preto- SP.

4.2 Objetivos específicos

- Determinar a presença e isolar Enterobactérias do grupo coliformes em amostras de água obtidas das saídas dos reservatórios e das redes de distribuição;
- Identificar nos isolados o perfil de susceptibilidade aos antibióticos β -lactâmicos e às quinolonas;
- Identificar os isolados produtores de ESBLs;
- Investigar nos isolados resistentes às cefalosporinas de terceira geração, a presença dos genes responsáveis pela produção das principais ESBLs (TEM, SHV, CTX-M);
- Detectar os genes que codificam as proteínas de resistência às quinolonas, denominadas: QnrA, QnrB e QnrS.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Localização geográfica e caracterização da área estudada

O município de São José do Rio Preto, localizado na região noroeste do Estado de São Paulo, conta com uma área total de 431,963 km², população em 2010 de 408.258 (IBGE, 2010). Cerca de 27% do abastecimento de água do município é originário do manancial superficial, representado pela Represa Municipal e os 73% restantes, são provenientes de mananciais subterrâneos, constituídos pelos Aquíferos Bauru e Guarani (PREFEITURA DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO, 2012).

O Serviço Municipal Autônomo de Água e Esgoto - SeMAE, possui uma Estação de Tratamento de Água (ETA) de ciclo completo, na qual é realizado o tratamento da água proveniente do manancial superficial, utilizando hipoclorito de sódio para desinfecção. Para o tratamento de água subterrânea é adicionado o hipoclorito de sódio na tubulação adutora do poço, para posterior distribuição (SeMAE, 2006).

5.2 Coleta das Amostras

O presente estudo teve seu início após autorização da Superintendência do SeMAE, que tem o objetivo de contribuir com projetos que visam avaliar a qualidade da água tratada (ofício1993/2011).

No período em que foram coletadas as amostras selecionadas para este estudo, a legislação que estava em vigor era a Portaria MS nº 518/2004, que foi substituída em dezembro de 2011 pela Portaria MS nº 2914, não havendo alterações nas orientações para a coleta de amostras destinadas à pesquisa de coliformes (BRASIL, 2004; BRASIL, 2011).

Para fins de análises microbiológicas, é realizada a pesquisa de coliformes totais e *Escherichia coli*, sendo coletadas duas amostras semanais nos reservatórios. Nas redes de distribuição, a amostragem é de acordo com a população abastecida. A legislação vigente estabelece como padrão microbiológico de água para consumo humano a ausência de *E. coli* em 100 mL de amostra de água e na saída do tratamento a ausência de coliformes totais em 100 mL de amostra de água, como descrito no Quadro 1. Estabelece também que ações corretivas devem ser adotadas e novas amostras devem ser coletadas após a detecção de amostras com resultados positivos para contaminação (BRASIL, 2011).

Quadro 1 - Padrão microbiológico da água para consumo humano.

Tipo de água		Parâmetro		VMP ⁽¹⁾
Água para consumo humano		<i>Escherichia coli</i> ⁽²⁾		Ausência em 100mL
Água tratada	Na saída do tratamento	Coliformes totais ⁽³⁾		Ausência em 100mL
	No sistema de distribuição (reservatórios e rede)	<i>Escherichia coli</i>		Ausência em 100mL
		Coliformes totais ⁽⁴⁾	Sistemas ou soluções alternativas coletivas que abastecem menos de 20.000 habitantes	Apenas uma amostra, entre as amostras examinadas no mês, poderá apresentar resultado positivo
			Sistemas ou soluções alternativas coletivas que abastecem a partir de 20.000 habitantes	Ausência em 100mL em 95% das amostras examinadas no mês.

Notas: (1) valor máximo permitido.

(2) Indicador de contaminação fecal.

(3) Indicador de eficiência do tratamento.

(4) Indicador de integridade do sistema de distribuição (reservatório e rede).

Fonte: Portaria MS nº 2914/2011.

Amostras de água foram coletadas nas saídas dos reservatórios e nas redes de distribuição municipais de São José do Rio Preto, no período de julho a novembro de 2011, pela equipe de técnicos de laboratório do SeMAE.

Para coleta foram utilizadas bolsas plásticas estéreis e descartáveis *Whirl-Pak® THIO BAGS* (Nasco, WI, USA), contendo um comprimido de 10 mg de tiosulfato de sódio, que neutraliza a ação do cloro adicionado à água para o tratamento.

5.3 Análises Microbiológicas realizadas no SeMAE

As análises microbiológicas foram realizadas segundo metodologia recomendada pelo *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater* (2005), sendo empregada a técnica de membrana filtrante. Foram utilizadas amostras de 100 mL de água. Após a filtração, a membrana foi posicionada em placa de Petri, sobre a superfície do Ágar *Endo* (*Sartorius Stedim Biotech GmbH, Goettingen, Germany*), aderindo-se a este. O Ágar *Endo* é destinado à detecção e enumeração de bactérias coliformes em amostras de água. Nesse meio de cultura as cepas de *E. coli* formam colônias vermelho escuras com brilho metálico (dourado), os outros coliformes formam colônias vermelho escuras sem brilho metálico e as bactérias que não fermentam a lactose formam colônias incolores.

As placas de Ágar *Endo* foram incubadas a 35 °C em estufa bacteriológica, por 18-24 horas. Após este tempo, cada colônia isolada apresentando morfologia típica de coliformes foi coletada e cultivada em caldo *Brain Heart Infusion* - BHI, (*Oxoid, Hampshire, England*), a 35 °C por 16-18 horas. Após este tempo, 0,7 mL de cada cultura foi transferido para criotubos estéreis contendo 0,3 mL de glicerol 50% estéril para armazenamento em coleção de cultura em freezer a -80 °C no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto - FAMERP. Para cada isolado, o armazenamento foi realizado em triplicata.

5.4 Análises Microbiológicas realizadas na FAMERP

5.4.1 Identificação dos isolados

Cada isolado foi reativado em caldo BHI e purificado pela técnica de esgotamento, em placa de Ágar *Mac Conkey* (*Oxoid, Hampshire, England*). Após o isolamento em meio seletivo, todos os isolados foram submetidos à coloração de Gram para a confirmação das características morfológicas e tintoriais típicas de *Enterobacteriaceae*.

Para a identificação das cepas foi utilizado o Enterokit B (Probac, São Paulo, Brasil), que consiste dos seguintes meios: EPM, MILi e Citrato de Simmons. O meio EPM contém os testes de fermentação e produção de gás em glicose, produção de H₂S, hidrólise de uréia e desaminação de triptofano. O meio MILi contém os testes de motilidade, indol e descarboxilação da lisina. O Citrato de *Simmons* oferece o teste de utilização do citrato como única fonte de carbono. Os três meios totalizam oito testes que somados a fermentação da lactose na placa de isolamento (Ágar *Mac Conkey*), permitem identificar a grande maioria das *Enterobacteriaceae*.

5.4.2 Testes de suscetibilidade aos antimicrobianos

A determinação do padrão de suscetibilidade aos agentes antimicrobianos foi realizada pelo método de disco difusão, de acordo com as recomendações do *Clinical Laboratory Standards Institute* – CLSI (2011). Foram utilizados discos comercialmente disponíveis (*Oxoid – Hampshire, England*) dos antimicrobianos descritos no Quadro 2.

Quadro 2 - Antimicrobianos utilizados nos testes de suscetibilidade.

Classe	Sub-classe	Sigla	Antimicrobiano	Concentração
β-lactâmicos	Penicilinas	AMC	amoxicilina/ácido clavulânico	30µg (2:1)
		SAM	ampicilina/sulbactam	20µg
		TZP	piperacilina/tazobactam	110µg (10:1)
	Cefalosporina 1ª geração	KF	cefalotina	30µg
	Cefalosporina 4ª geração	FEP	cefepima	30µg
	Cefalosporina 3ª geração	CTX	cefotaxima	30µg
		EFT	ceftiofur	30µg
		CAZ	ceftazidima	30µg
		CRO	ceftriaxona	30µg
	Cefamicina	FOX	cefoxitina	30µg
	Monobactâmico	ATM	aztreonam	30µg
	Carbapenêmicos	ETP	ertapenem	10µg
		IPM	imipenem	10µg
Aminoglicosídeos	CN	gentamicina	10µg	
	TOB	tobramicina	30µg	
	AK	amicacina	30µg	
Quinolonas	LEV	levofloxacina	5µg	
	ENO	enrofloxacina	5µg	
	OFX	ofloxacina	5µg	
	MXF	moxifloxacina	5µg	
	NA	ácido nalidíxico	30µg	
	CIP	ciprofloxacina	5µg	

As cepas *Escherichia coli* ATCC 25922 (ESBL negativa) e *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 (ESBL positiva) foram utilizadas como controle. Os resultados foram interpretados de acordo com o CLSI (2011), exceto para a Moxifloxacina, que foram interpretados de acordo com o *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* – EUCAST (2011) e para o Ceftiofur e a Enrofloxacina, que seguem o CLSI de recomendações para bactérias isoladas de animais (2008).

O inóculo bacteriano foi preparado pela transferência de uma colônia isolada para um tubo contendo 4-5 mL de Caldo *Muller Hinton* (Oxoid, England). A cultura foi incubada a 37 °C, até alcançar ou exceder a turbidez de uma solução padrão de *Mc Farland* 0,5 (em geral, de duas a seis horas). A turbidez da cultura

em crescimento foi ajustada com Caldo *Muller Hinton*, obtendo-se uma turbidez óptica comparável à da solução padrão de *Mc Farland* 0,5. Em condições assépticas, um *swab* de algodão estéril foi mergulhado na suspensão ajustada e girado várias vezes, apertando-o firmemente contra a parede interna do tubo, acima do nível do líquido (retirando qualquer excesso do inóculo). A suspensão bacteriana foi inoculada na placa de *Ágar Muller Hinton* (*Oxoid, England*), utilizando o *swab* para a distribuição uniforme em toda a superfície do ágar. Com o auxílio de uma pinça previamente flambada e resfriada, o conjunto de discos antimicrobianos foi colocado na superfície de uma placa de ágar semeada, pressionando-os de encontro à placa, de maneira a assegurar o contato completo com a superfície de ágar. Foram colocados, no máximo, 12 discos em uma placa de 150 mm. As placas foram invertidas e colocadas em estufa, a 37 °C. Após 16-18h de incubação, as culturas foram analisadas para verificar se o inóculo bacteriano foi satisfatoriamente semeado. O halo de inibição foi considerado a área sem crescimento a olho nu. Os diâmetros dos halos foram mensurados, incluindo o diâmetro dos discos, utilizando-se uma régua, que foi encostada na parte de trás da placa de Petri invertida. De acordo com os tamanhos dos halos de inibição, os micro-organismos foram classificados como sensíveis, intermediários, ou resistentes aos agentes testados.

As cepas que apresentaram resistência às cefalosporinas de terceira geração foram selecionadas e submetidas à identificação automatizada utilizando-se o sistema *Vitek 2* e os cartões GN e AST-N105 (*BioMérieux, France*), seguindo as orientações do fabricante.

5.4.3 Teste fenotípico para produção de ESBL

A produção das β -lactamases foi confirmada pela utilização do método de disco aproximação ou sinergismo de disco duplo (DDS) de acordo com o método descrito por JARLIER e colaboradores (1998). A suspensão bacteriana foi

ajustada ao padrão de 0,5 na escala de *McFarland* e inoculada sobre a superfície da placa de *Ágar Muller Hinton (Oxoid)*, com 4 mm de altura. Os discos de amoxicilina/ácido clavulânico foram colocados no centro da placa e, ao seu redor, os antimicrobianos marcadores (cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona e cefepime) foram estrategicamente posicionados a uma distância de 20 mm (centro a centro de cada disco). O aparecimento de uma terceira zona de inibição (zona fantasma) entre o disco contendo amoxicilina/ácido clavulânico e qualquer um dos substratos utilizados como marcadores após incubação por 18 a 20 horas a 35 °C foi interpretado como confirmação fenotípica da produção de ESBL.

5.5 Estudos Moleculares

5.5.1 Reativação dos isolados e extração de DNA genômico bacteriano

Inicialmente os isolados foram reativados em caldo *Brain Heart Infusion-BHI (Oxoid, Hampshire, England)* e uma alíquota de cada suspensão bacteriana reativada, de aproximadamente 1,5mL, foi colocada em tubos de polipropileno de 1,5 mL e centrifugada a 15.000 g, por 10 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* foi homogeneizado com 200 µL de H₂O *Milli-Q (Millipore)*. Em seguida, foi realizada mais uma centrifugação a 15.000 g por 10 minutos, a 4 °C, o sobrenadante foi novamente desprezado e o *pellet* homogeneizado em 40 µL de H₂O *Milli-Q*. Os tubos foram colocados no termobloco a 100 °C, por 10 minutos. Após este período, os tubos foram submetidos a um choque térmico, sendo colocados no gelo por dois minutos. Os tubos foram centrifugados a 15.000 g, por 10 segundos, a 4 °C. O sobrenadante, contendo o DNA, foi acondicionado em outro tubo de polipropileno de 1,5 mL, previamente identificado, onde foram adicionados 500 µL de etanol absoluto (Merck Chemicals) (-20 °C) e deixado em gelo por 20 minutos. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 16.000 g por 10

minutos e o sobrenadante foi descartado. Foram então, adicionados, 250 µL de etanol 70% (-20 °C) e, novamente, a mistura foi submetida à centrifugação a 16.000 g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e a amostra incubada por 30 minutos a 37 °C em termobloco *Thermomixer comfort* (Eppendorf) (tubos abertos). Após todo o etanol ter evaporado, o DNA foi homogeneizado com 100 µL de tampão TE e 2 µL de RNase (2 mg/mL). O DNA obtido foi armazenado em freezer -20°C.

5.5.2 Detecção dos genes *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}* e *bla_{CTX-M}* por Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)

A detecção dos genes de resistência aos antibióticos β-lactâmicos foi realizada inicialmente por PCR usando-se os primers e protocolos descritos por Tollentino e colaboradores (2011).

Para a detecção do gene *bla_{SHV}* foram utilizados os *primers* Kp1 e Kp3, para a detecção de *bla_{TEM}*, os *primers* TEM F e TEM R, e para *bla_{CTX-M}*, os *primers* CTX-M F e CTX-M R. Os *primers* descritos estão no Quadro 3.

Para a realização do multiplex PCR em cada isolado, foram adicionados em tubo de polipropileno os seguintes reagentes: 2,5 µL de tampão (10X), 2,0 µL de MgCl₂ (25 mM), 2,0 µL de dNTP (2,5mM), 1,0 µL de cada *primer* (10 pmol), 10,3 µL de água *UltraPure* (Invitrogen, CA, USA) e 0,2 µL de Taq DNA *Polymerase* (5U/ µL), por último foi adicionado 2,0 µL do DNA obtido pelo procedimento de extração anteriormente descrito. Os tubos foram colocados no termociclador (*GeneAmp PCR System 9700*, Applied Biosystems, Foster City CA-USA), que foi programado com um passo inicial (95 °C por 5 minutos), seguido por 35 ciclos sequenciais de desnaturação (95 °C por 30 segundos), hibridização (53 °C por 30 segundos) e extensão (72 °C por 30 segundos). Após os ciclos sequenciais, um passo de 72 °C por 7 minutos foi realizado para extensão final das cadeias, seguido de um último passo a 4 °C, no qual as amostras são mantidas até que sejam retiradas do termociclador. Uma reação sem amostra de DNA foi

utilizada como controle negativo e foi denominada Branco. Como controle positivo para cada reação, foram utilizados DNA de cepas bacterianas pré-caracterizadas por sequenciamento no Laboratório de Microbiologia da FAMERP, para a presença de *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM} e *bla*_{CTX-M}.

Os produtos amplificados foram analisados em gel de agarose a 1%. Na fase final de preparação do gel de agarose, foi adicionado brometo de etídio (0,8 µL/ 100 mL). A eletroforese foi realizada a 100 volts, por 60 minutos. A aplicação no gel de agarose foi feita com 5 µL da reação, adicionados de 2 µL de solução de azul de bromofenol. O marcador de peso molecular de 100 pb (*Invitrogen, USA*) foi aplicado no gel para determinar o tamanho dos fragmentos obtidos.

O resultado foi observado sobre luz ultravioleta e fotografado utilizando o aparelho *Kodak Gel Logic 2200 Imaging System (Molecular Imaging Software)*.

Quadro 3 – *Primers* utilizados na PCR para detecção dos genes *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM} e *bla*_{CTX-M}.

Alvo	Primers	"Amplicon"	Referência
<i>bla</i> _{TEM}	TEM F- Primer forward: 5'-ATAAAATCTTGAAGACGAAA-3'	1088 pb	Tollentino et al., 2011
	TEM R- Primer reverse: 5'-GACAGTTACCAATGCTTAATCA-3'		
<i>bla</i> _{SHV}	Kp1- Primer forward: 5'-GGGTTATTCTTATTTGTCGC-3'	861 pb	Tollentino et al., 2011
	Kp3- Primer reverse: 5'-TTAGCGTTGCCAGTGCTC-3'		
<i>bla</i> _{CTX-M}	CTX-M F- Primer forward: 5'-TTTGCGATGTGCAGTACCAGTAA-3'	544 pb	Tollentino et al., 2011
	CTX-M R- Primer reverse: 5'-CGATATCGTTGGTGGTGCCATA-3'		

5.5.3 Detecção dos genes AmpC por Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)

Para detecção dos genes de β-lactamases AmpC foi utilizado o protocolo descrito Pérez-Pérez & Hanson (2002).

Para a detecção dos genes *MOX-1*, *MOX-2*, *CMY-1*, *CMY-8* a *CMY-11* foram utilizados os *primers* MOXMF e MOXMR, para a detecção dos genes *LAT-1* a *LAT-4*, *CMY-2* a *CMY-7*, *BIL-1*, os *primers* CITMF e CITMR, para os genes *DHA-1* e *DHA-2*, os *primers* DHAMF e DHAMR, para o gene *ACC*, os *primers* ACCMF e ACCMR, para os genes *MIR-1T* e *ACT-1*, os *primers* EBCMF e

EBCMR, e para os genes *FOX-1* a *FOX-5b*, os primers FOXMF e FOXMR. Os primers descritos estão no Quadro 4.

Para a realização do multiplex PCR em cada isolado, foram adicionados em tubo de polipropileno os seguintes reagentes: 5,0 µL de tampão (10X), 3,0 µL de MgCl₂ (25 mM), 4,0 µL de dNTP (2,5mM), 3,0 µL dos primers (10 pmol): MOXMF, MOXMR, CITMF, CITMR, DHAMF e DHAMR, e 2,5 µL dos primers (10 pmol): ACCMF, ACCMR, EBCMF, EBCMR, e 2,0 µL dos primers (10 pmol): FOXMF e FOXMR; 3,5 µL de água *UltraPure* (Invitrogen, CA, USA) e 0,5 µL de Taq DNA Polymerase (5U/ µL), por último foi adicionado 2,0 µL do DNA obtido pelo procedimento de extração anteriormente descrito. Os tubos foram colocados no termociclador (*GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems, Foster City CA-USA*), que foi programado com um passo inicial (94 °C por 3 minutos), seguido por 25 ciclos sequenciais de desnaturação (94 °C por 30 segundos), hibridização (64 °C por 30 segundos) e extensão (72 °C por 1 minuto). Após os ciclos sequenciais, um passo de 72 °C por 7 minutos foi realizado para extensão final das cadeias, seguido de um último passo a 4 °C, no qual as amostras são mantidas até que sejam retiradas do termociclador. Uma reação sem amostra de DNA foi utilizada como controle negativo e foi denominada Branco. Como controle positivo para cada reação, foram utilizados DNA de cepas bacterianas pré-caracterizadas por sequenciamento no Laboratório de Microbiologia da FAMERP, para a presença de *CMY*, *MIR-1* e *FOXs*.

Os produtos amplificados foram analisados em gel de agarose a 1%. Na fase final de preparação do gel de agarose, foi adicionado brometo de etídio (0,8 µL/ 100 mL). A eletroforese foi realizada a 100 volts, por 60 minutos. A aplicação no gel de agarose foi feita com 5 µL da reação, adicionados de 2 µL de solução de azul de bromofenol. O marcador de peso molecular de 100 pb (*Invitrogen, USA*) foi aplicado no gel para determinar o tamanho dos fragmentos obtidos.

O resultado foi observado sobre luz ultravioleta e fotografado utilizando o aparelho *Kodak Gel Logic 2200 Imaging System* (*Molecular Imaging Software*).

Quadro 4 – *Primers* utilizados na PCR para detecção dos genes AmpC.

Alvo	Primers	"Amplicon"	Referência
MOX-1, MOX-2, CMY-1, CMY-8 a CMY-11	MOXMF GCT GCT CAA GGA GCA CAG GAT	520	Pérez-Pérez & Hanson, 2002
	MOXMR CAC ATT GAC ATA GGT GTG GTG C		
LAT-1 a LAT-4, CMY-2 a CMY-7, BIL-1	CITMF TGG CCA GAA CTG ACA GGC AAA	462	Pérez-Pérez & Hanson, 2002
	CITMR TTT CTC CTG AAC GTG GCT GGC		
DHA-1, DHA-2	DHAMF AAC TTT CAC AGG TGT GCT GGG T	405	Pérez-Pérez & Hanson, 2002
	DHAMR CCG TAC GCA TAC TGG CTT TGC		
ACC	ACCMF AAC AGC CTC AGC AGC CGG TTA	346	Pérez-Pérez & Hanson, 2002
	ACCMR TTC GCC GCA ATC ATC CCT AGC		
MIR-1T , ACT-1	EBCMF TCG GTA AAG CCG ATG TTG CGG	302	Pérez-Pérez & Hanson, 2002
	EBCMR CTT CCA CTG CGG CTG CCA GTT		
FOX-1 a FOX-5b	FOXMF AAC ATG GGG TAT CAG GGA GAT G	190	Pérez-Pérez & Hanson, 2002
	FOXMR CAA AGC GCG TAA CCG GAT TGG		

5.5.4 Detecção dos genes *qnrA*, *qnrB* e *qnrS* por Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)

Para a detecção dos genes codificadores das proteínas Qnr, seguiu-se o protocolo de multiplex PCR descrito Cattoir e colaboradores (2007).

Para a detecção do gene *qnrA* foram utilizados os *primers* QnrA *forward* e *reverse*, para a detecção de *qnrB*, os *primers* QnrB *forward* e *reverse*, e para *qnrS*, os *primers* QnrS *forward* e *reverse*. Os *primers* descritos estão no Quadro 5.

Para a realização do multiplex PCR em cada isolado, foram adicionados em tubo de polipropileno os seguintes reagentes: 2,5 µL de tampão (10X), 2,0 µL de MgCl₂ (25 mM), 2,0 µL de dNTP (2,5mM), 1,0 µL de cada *primer* (10 pmol), 10,3 µL de água *UltraPure* (Invitrogen, CA, USA) e 0,2 µL de Taq DNA *Polymerase* (5U/ µL), por último foi adicionado 2,0 µL do DNA obtido pelo procedimento de extração anteriormente descrito. Os tubos foram colocados no termociclador (*GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems, Foster City CA-USA*), que foi programado com um passo inicial (95 °C por 10 minutos), seguido por 35 ciclos sequenciais de desnaturação (95 °C por 1 minuto), hibridização (54

°C por 1 minuto) e extensão (72 °C por 1 minuto). Após os ciclos sequenciais, um passo de 72 °C por 10 minutos foi realizado para extensão final das cadeias, seguido de um último passo a 4 °C, no qual as amostras são mantidas até que sejam retiradas do termociclador. Uma reação sem amostra de DNA foi utilizada como controle negativo e foi denominada Branco. Como controle positivo para cada reação, foram utilizados DNA de cepas bacterianas pré-caracterizadas por sequenciamento no Laboratório de Microbiologia da FAMERP, para a presença de *qnrA*, *qnrB* e *qnrS*.

Os produtos amplificados foram analisados em gel de agarose a 1%. Na fase final de preparação do gel de agarose, foi adicionado brometo de etídio (0,8 µL/ 100 mL). A eletroforese foi realizada a 100 volts, por 60 minutos. A aplicação no gel de agarose foi feita com 5 µL da reação, adicionados de 2 µL de solução de azul de bromofenol. O marcador de peso molecular de 100 pb (*Invitrogen, USA*) foi aplicado no gel para determinar o tamanho dos fragmentos obtidos.

O resultado foi observado sobre luz ultravioleta e fotografado utilizando o aparelho *Kodak Gel Logic 2200 Imaging System (Molecular Imaging Software)*.

Quadro 5 – Primers utilizados na PCR para detecção dos genes *qnrA*, *qnrB* e *qnrS*.

Alvo	Primers	"Amplicon"	Referência
<i>qnrA</i>	Primer forward: 5'-AGAGGATTTCTCACGCCAGG-3'	580 pb	Cattoir et al., 2007
	Primer reverse: 5'-TGCCAGGCACAGATCTTGAC-3'		
<i>qnrB</i>	Primer forward: 5'- GGMATHGAAATTCGCCACTG-3'	264 pb	Cattoir et al., 2007
	Primer reverse: 5'- TTTGCGYGYCGCCAGTCGAA-3'		
<i>qnrS</i>	Primer forward: 5'- GCAAGTTCATTGAACAGGGT-3'	428 pb	Cattoir et al., 2007
	Primer reverse: 5'-TCTAAACCGTCGAGTTCGGCG-3'		

5.5.5 Sequenciamento dos genes identificados

Os produtos obtidos nas reações de PCR foram purificados com etanol. O “amplicon” de cada reação foi transferido para um tubo de polipropileno de 1,5

mL, previamente identificado, nos quais foram adicionados acetato de sódio 3 M e etanol absoluto (*Merck Chemicals*), nas proporções de 10% e 3 vezes, respectivamente, do volume da PCR a ser purificado. Os tubos foram colocados em freezer -80°C por 1 hora, para a precipitação do DNA. Em seguida, foram centrifugados a 13200 rpm, por 20 minutos, a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 60 µL de etanol 70% (*Merck Chemicals*). Os tubos foram novamente centrifugados a 13200 rpm, por 20 minutos, a 4 °C, o sobrenadante foi descartado e os tubos foram abertos e invertidos para secar. Por fim, o precipitado foi homogeneizado em 20µl de água *Milli-Q*.

As sequências dos genes *bla_{SHV}* e *bla_{TEM}* foram determinadas utilizando-se o kit *Big Dye Terminator v 3.1* (*Applied Biosystems, CA, USA*), segundo recomendações do fabricante. O sequenciamento teve como finalidade confirmar se os “amplicons” correspondiam realmente aos genes procurados, e, posteriormente, identificar os tipos de SHV e TEM. Os *primers* que foram utilizados para o sequenciamento desses genes estão descritos no Quadro 6.

Na reação de PCR para sequenciamento foram utilizados 2,0 µL de *Big Dye Terminator*, 4,0 µL de solução tamponante (5X), 1,0 µL de *primer* específico (3,2 pmol/µL), 1,0 µL de DNA purificado e 12 µL água *UltraPure* (*Invitrogen, CA, USA*). A amplificação foi realizada em 25 ciclos: desnaturação a 96 °C por 30 segundos, hibridização a 50 °C por 15 segundos, extensão a 60 °C por 4 minutos.

Os produtos amplificados foram submetidos à precipitação. Para tanto, foram adicionados 80 µL de isopropanol 70% em cada tubo e o volume transferido para tubos de polipropileno de 1,5 mL. Os tubos foram homogeneizados em agitador (*Vórtex*), por 10 segundos. Após a incubação por 10 minutos a -20 °C, os tubos foram centrifugados a 13000 rpm, por 20 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi lavado com 200 µL de etanol 70% (*Merck Chemicals*). Os tubos foram centrifugados a 13000 rpm, por 10 minutos. O *pellet* foi lavado com 1,0 mL de etanol 70% e os tubos foram novamente centrifugados a 13000 rpm, por 15 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi totalmente descartado e, após a evaporação completa do etanol, o DNA precipitado foi reconstituído em 10 µL de formamida *high dye* (pH 7,0).

O DNA foi desnaturado a 95 °C, por 2 minutos e o sequenciamento foi realizado no equipamento 3130 *Genetic Analyser* (*Applied Biosystems-HITACHI*). As sequências foram analisadas com auxílio dos programas DS Gene 2.5 (*Accelrys, USA*) e BLAST (*Basic Local Aligning Search Toll*), este último disponível no portal do *National Center for Biotechnology Information* – NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>).

Quadro 6 – *Primers* que foram utilizados para as reações de sequenciamento de genes *bla*.

Fragmento amplificado	Primers	Referência
sequenciar <i>bla</i> _{SHV}	Primer forward: 5'-GGGTTATCTTATTGTGCGC-3'	Rasheed et al., 1997
	Primer forward: 5'-GAACAGCTGGAGCGAAAGAT-3'	
	Primer forward: 5'-CAGATCGGCGACAACGTCAC-3'	
	Primer forward: 5'-CTGCAGTGGATGGTGGACGA-3'	
	Primer forward: 5'-CCTGCTTGGCCCGAATAACA-3'	
	Primer reverse: 5'-GTGACGTTGTCGCCGATCTG-3'	
	Primer reverse: 5'-ATCTTTCGCTCCAGCTGTTC-3'	
	Primer reverse: 5'-TAATTTGCTCAAGCGGCTGC-3'	
sequenciar <i>bla</i> _{TEM}	Primer forward: 5'-TCAACATTTTCGTGTCGC-3'	Tollentino et al., 2011
	Primer reverse: 5'-AAAGGGAATAAGGGCGACAC-3'	
	Primer forward: 5'-CGTTTTCCAATGATGAGCAC-3'	
	Primer reverse: 5'-TCGGGGCGAAAACCTCTCAAG-3'	
	Primer forward: 5'-CATGAGTGATAACACTGCTGC-3'	
	Primer reverse: 5'-TTGGCAGCAGTGTTATCACTC-3'	
	Primer forward: 5'-ACTACTTACTCTAGCTTCCCG-3'	
	Primer reverse: 5'-TTAATTGTTGCCGGGAAGC-3'	

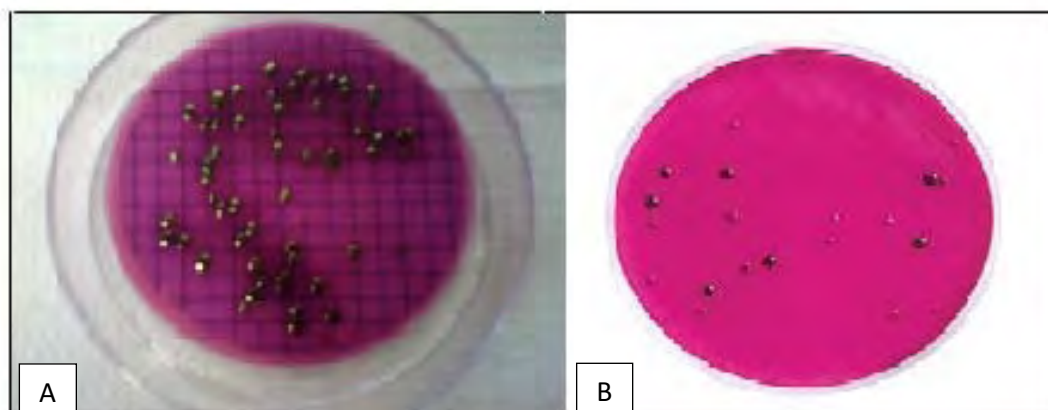
6 RESULTADOS

6.1 Resultados Microbiológicos

No período de 19 de julho a 01 de novembro de 2011, foi realizada pela equipe do SeMAE, a coleta de 7899 amostras de água para análise microbiológica, provenientes de 101 Sistemas de Abastecimento, compostos por reservatórios e suas respectivas redes de distribuição. Em 67(0,84%) amostras de água foi detectada a presença de colônias com características de coliformes (Fotografia 1). Dessas amostras, foram identificadas 72 isolados pertencentes ao grupo dos coliformes totais, sendo 5 isolados de *E. coli* (Tabela 1).

As amostras em que foram detectadas as colônias de coliformes estão em desacordo com a legislação vigente (BRASIL, 2011). A presença de *E. coli* é indicativo de contaminação recente da água, sendo que algumas cepas são comprovadamente patogênicas ao homem e animais. Além disso, a presença de *E. coli*, indica com maior segurança a possível presença de enteropatógenos (SANTANA, 2003; MADIGAN et al., 2010).

Fotografia 1 – Características das colônias de coliformes em Ágar *Endo* (*Sartorius Stedim Biotech GmbH, Goettingen, Germany*).



[A) Colônias vermelha escuras com brilho metálico, característica de *E. coli*. B) Colônias vermelha escuras sem brilho metálico, características de coliformes totais.]

6.1.1 Análise estatística

Conforme os padrões exigidos pela Portaria atual 2914/2011 e pela Portaria 518/2004, vigente no período em que foram realizadas as coletas, nas amostras com resultado positivo para coliformes devem ser observados os valores de cloro residual livre e turbidez. Os valores de cloro residual livre devem estar dentro do limite mínimo e máximo permitido: 0,2 mg/L e 2,0 mg/L. O parâmetro turbidez, característica que reflete o grau de transparência da água, não deve ultrapassar o valor máximo permitido de 5 UT (Unidade de Turbidez).

Os valores de cloro residual livre e turbidez obtidos pelas análises do monitoramento realizado pelo SeMAE, nas amostras que apresentaram resultado positivo para coliformes e amostras que apresentaram resultado negativo, no mesmo período, foram analisados estatisticamente. Para tal, foram selecionados aleatoriamente resultados de cloro residual livre e turbidez de 70 amostras negativas para coliformes.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa PRISMA 6.01. Foi realizada uma análise comparativa dos valores de cloro e turbidez para amostras negativas e positivas quanto à presença de coliformes. Deste modo, foi aplicado o Teste t de Student (para dados paramétricos) com nível de significância de $\alpha = 0,05$ (P valor $\leq 0,05$).

Para o parâmetro cloro residual livre o P valor foi 0,0003, indicando que existe diferença significativa entre os valores de cloro para as amostras positivas e negativas em relação à presença de coliformes. Assim, de acordo com o Teste t de Student, concluímos que a concentração de cloro dentro dos parâmetros estabelecidos pela legislação é determinante para a prevenção da contaminação por coliformes. Entretanto, entre as 67 amostras positivas para coliformes, apenas 3 (4,47%) apresentaram concentrações de cloro residual livre abaixo de 0,2 mg/L. A avaliação posterior mostrou que no momento da coleta os Sistemas de Abastecimento dos quais estas amostras são provenientes, estavam passando por um processo de manutenção. Em análises subsequentes à manutenção, a dosagem de cloro nestes Sistemas encontrava-se dentro dos parâmetros legais, e não foi detectada a presença de coliformes.

Em 64 das 67 amostras positivas para coliformes, as concentrações de cloro residual livre estavam dentro dos limites estabelecidos (acima de 0,2 mg/L). Acreditamos que este resultado possa ser explicado por duas hipóteses: *i*) as amostras de água podem ter sido contaminadas durante o procedimento de coleta, e os coliformes detectados podem ser provenientes das torneiras e do ambiente *ii*) estas cepas de coliformes podem apresentar algum mecanismo de resistência ao cloro, como previamente descrito por Cherchi e Gu em 2011. No caso da primeira hipótese, o treinamento continuado dos funcionários acerca das técnicas assépticas, poderá solucionar o problema. Para a confirmação da segunda hipótese, é necessário estudar os coliformes de forma a identificar possíveis mecanismos de resistência ao cloro. Esta abordagem torna-se interessante sob o ponto de vista de saúde pública, pois a habilidade de *E. coli* em desenvolver resistência ao cloro, pode levar a necessidade de futuras alterações nos sistemas de tratamento de água (SABY et al., 1999).

Nenhuma das amostras estudadas apresentou valores de turbidez acima do limite estabelecido. Além disso, de acordo com o Teste t de Student, o parâmetro turbidez foi considerado não significativo para a presença de coliformes nas amostras em questão ($P = 0,99$).

6.1.2 Suscetibilidade aos antimicrobianos

A Tabela 1 mostra o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos apresentado pelos 72 isolados.

Entre as drogas β -lactâmicas foram detectados 32 (44,44%) isolados que apresentaram resistência à amoxicilina/ácido clavulânico, 10 (13,88%) à ampicilina/sulbactam e 6 (8,33%) a piperacilina/tazobactam. Trinta e três (45,83%) apresentaram resistência a cefalotina, 2 (2,77%) a cefepima, 9 (12,50%) a cefotaxima, 13 (18,05%) ao ceftiofur, 2 (2,77%) a ceftriaxona, 30 (41,66%) a cefoxitina e 2 (2,77%) a ceftazidima. A resistência ao ertapenem foi observada em 2 (2,77%) isolados e ao imipenem em 6 (8,33%) isolados.

Dentre as quinolonas um (1,38%) isolado apresentou resistência a moxifloxacina e 4 (5,55%) ao ácido nalidíxico.

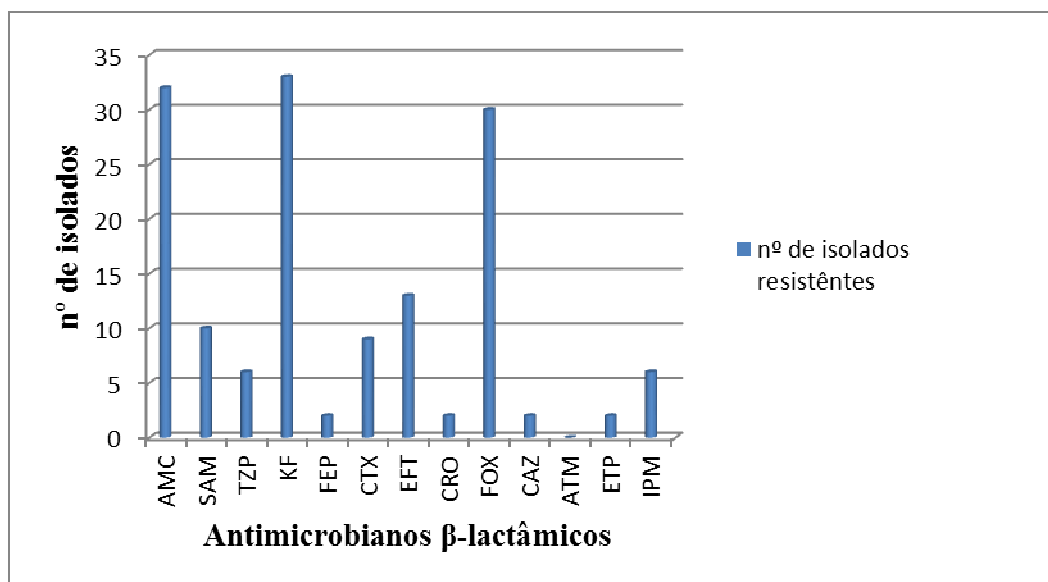
Quanto aos aminoglicosídeos, foi observada em 3 (4,16%) dos isolados resistência à gentamicina e em 1 (1,38%) resistência a amicacina. A caracterização dos mecanismos de resistência a esta classe de antimicrobianos não foi o objetivo deste estudo, mas devido à sua importância, será investigada futuramente.

Devido ao caráter qualitativo do teste de disco difusão, neste estudo consideramos todos os isolados que apresentaram resistência intermediária a um antimicrobiano como sendo resistentes. Esta abordagem amplia a possibilidade de detecção de genes de resistência nos isolados em que o valor do halo de inibição tenha sido incluído na faixa de suscetibilidade intermediária.

O Gráfico 1 demonstra que entre os antimicrobianos β -lactâmicos testados, a resistência à amoxicilina/ácido clavulânico, cefalotina e cefoxitina foi a

mais comumente observada. Este fato pode ser explicado pela alta prevalência de bactérias do grupo CESP, composto pelos gêneros *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Serratia* e *Providencia*. Foram identificadas pelo menos 26 isolados como pertencentes a este grupo, que produz uma β -lactamase constitutiva (AmpC) codificada por um gene cromossômico que confere redução de suscetibilidade ou resistência à penicilinas associadas com inibidores de β -lactamases, cefalosporinas de 1ª geração e cefamicinas (LINDQUIST et al, 1989; PÉREZ-PÉREZ & HANSON, 2002; LIVERMORE & WOODFORD, 2006).

Gráfico 1 – Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos β -lactâmicos



AMC: amoxicilina/ácido clavulânico; SAM: ampicilina/sulbactam; TZP: piperacilina/tazobactam; KF: cefalotina; FEP: cefepima; CTX: cefotaxima; EFT: ceftiofur; CRO: ceftriaxona; FOX: ceftiofur; CAZ: ceftazidima; ATM: aztreonam; ETP: ertapenem; IPM: imipenem.

6.1.3 Teste fenotípico para a produção de ESBL

A investigação da produção de ESBLs foi conduzida para 22 isolados que apresentaram resistência a alguma das cefalosporinas de terceira geração, como cefotaxima, ceftiofur, ceftriaxona e ceftazidima. A confirmação fenotípica pelo teste de disco aproximação não foi obtida para os isolados em questão.

Tabela 1 – Suscetibilidade aos antimicrobianos e diversidade genotípica das cepas isoladas no estudo.

Cepa	Identidade	Suscetibilidade aos Antimicrobianos (mm)*																						
		AMC	SAM	TZP	KF	FEP	CTX	EFT	CRO	FOX	CAZ	ATM	ETP	IPM	CN	TOB	AK	LEV	ENO	OFX	MXF ^a	NA	CIP	
		R ≤ 13	R ≤ 11	R ≤ 17	R ≤ 14	R ≤ 14	R ≤ 22	R ≤ 19	R ≤ 19	R ≤ 14	R ≤ 17	R ≤ 17	R ≤ 19	R ≤ 19	R ≤ 12	R ≤ 12	R ≤ 14	R ≤ 13	R ≤ 15	R ≤ 12	R ≤ 16	R ≤ 13	R ≤ 15	
		S ≥ 18	S ≥ 15	S ≥ 21	S ≥ 18	S ≥ 18	S ≥ 26	S ≥ 23	S ≥ 23	S ≥ 18	S ≥ 21	S ≥ 21	S ≥ 23	S ≥ 23	S ≥ 15	S ≥ 15	S ≥ 17	S ≥ 17	S ≥ 21	S ≥ 16	S ≥ 20	S ≥ 19	S ≥ 21	
1	<i>Citrobacter freundii</i>	10	6	24	12	28	26	6	26	12	24	29	26	25	18	NT	20	24	24	NT	NT	23	NT	NR
2	<i>Citrobacter freundii</i> / <i>Enterobacter cloacae</i> / <i>Serratia</i> spp.	8	12	24	11	30	26	23	29	9	24	30	26	28	22	NT	20	30	30	NT	NT	24	NT	NR
3	<i>Escherichia coli</i> ^b	20	22	26	18	12	11	6	32	24	25	30	29	30	17	NT	17	30	30	NT	NT	24	NT	NR
4A	<i>Citrobacter freundii</i> / <i>Enterobacter cloacae</i> / <i>Serratia</i> spp.	12	6	14	10	30	29	24	11	6	25	30	26	24	18	NT	20	32	30	NT	NT	26	NT	NR
4B	<i>Citrobacter freundii</i> / <i>Enterobacter cloacae</i> / <i>Serratia</i> spp.	16	6	26	9	30	28	24	28	14	24	30	29	29	23	NT	22	30	30	NT	NT	24	NT	NR
5	<i>Citrobacter freundii</i> / <i>Enterobacter cloacae</i> / <i>Serratia</i> spp.	12	21	26	11	32	29	24	26	6	26	30	28	28	20	NT	22	32	30	NT	NT	24	NT	NR
6	<i>Citrobacter freundii</i> / <i>Enterobacter cloacae</i> / <i>Serratia</i> spp.	10	22	29	10	34	32	NT	30	6	30	32	32	26	21	NT	22	30	32	32	30	25	NT	NR
7A	<i>Citrobacter freundii</i> / <i>Enterobacter cloacae</i> / <i>Serratia</i> spp.	9	20	28	9	32	30	NT	28	6	26	31	33	25	19	NT	21	30	30	30	30	25	NT	NR
7B	<i>Serratia liquefaciens</i>	10	15	26	9	32	31	NT	28	9	28	30	32	26	20	NT	22	30	30	30	28	25	NT	NR
8A	<i>Klebsiella oxytoca</i>	26	16	21	26	36	34	NT	32	28	33	36	32	28	19	NT	19	27	29	27	24	24	NT	NR
8B	<i>Citrobacter diversus</i>	24	20	25	24	30	30	NT	29	24	28	31	30	26	18	NT	18	24	27	25	24	22	NT	NR
9	<i>Citrobacter freundii</i>	8	17	24	6	29	16	NT	28	8	26	30	30	24	18	NT	19	28	26	26	24	23	NT	NR
11A	<i>Citrobacter freundii</i> / <i>Enterobacter cloacae</i> / <i>Serratia</i> spp.	6	10	18	10	30	NT	NT	27	14	NR	25	30	26	19	NT	20	27	28	26	24	21	NT	NR
11B	<i>Citrobacter freundii</i> / <i>Enterobacter cloacae</i>	11	19	24	10	32	26	NT	26	14	24	28	30	26	20	NT	21	25	24	24	22	21	NT	NR

* De acordo com CLSI (2008; 2011).

^a De acordo com EUCAST (2011).

^v Identificação realizada através do sistema Vitek 2 Compact

AK: amicacina; AMC: amoxicilina/ácido clavulânico; ATM: aztreonam; CAZ: ceftazidima; CN: gentamicina; CRO: ceftriaxona; CTX: cefotaxima; EFT: ceftiofur; ENO: enrofloxacina; ETP: ertapenem; FEP: cefepima; FOX: cefoxitina; IPM: imipenem; KF: cefalotina; LEV: levofloxacina; MXF: moxifloxacina; NA: ácido nalidíxico; OFX: ofloxacina; SAM: ampicilina/sulbactam; TOB: tobramicina; TZP: piperacilina/tazobactam; CIP: ciprofloxacina.

NR: teste não realizado ou gene não detectado. NT: antibiótico não testado. R: tamanho do halo que indica resistência ao antimicrobiano (números marcados em vermelho); S: tamanho do halo que indica sensibilidade ao antimicrobiano (números marcados em preto); valores intermediários a R e S indicam resistência intermediária ao antimicrobiano (números marcados em verde).

Tabela 1 (continuação). Suscetibilidade aos antimicrobianos e diversidade genotípica das cepas isoladas no estudo.

Cepa	Identidade	Suscetibilidade aos Antimicrobianos (mm)*																				Diversidade genética		
		AMC	SAM	TZP	KF	FEP	CTX	EFT	CRO	FOX	CAZ	ATM	ETP	IPM	CN	TOB	AK	LEV	ENO	OFX	MXF ^m			
		R ≤ 13 S ≥ 18	R ≤ 11 S ≥ 15	R ≤ 17 S ≥ 21	R ≤ 14 S ≥ 18	R ≤ 14 S ≥ 18	R ≤ 22 S ≥ 26	R ≤ 19 S ≥ 23	R ≤ 19 S ≥ 23	R ≤ 14 S ≥ 18	R ≤ 17 S ≥ 21	R ≤ 17 S ≥ 21	R ≤ 19 S ≥ 23	R ≤ 19 S ≥ 23	R ≤ 12 S ≥ 15	R ≤ 12 S ≥ 15	R ≤ 14 S ≥ 17	R ≤ 13 S ≥ 17	R ≤ 15 S ≥ 21	R ≤ 12 S ≥ 16	R ≤ 16 S ≥ 20	R ≤ 13 S ≥ 19	R ≤ 15 S ≥ 21	
12	<i>Citrobacter freundii</i> / <i>Enterobacter cloacae</i> / <i>Serratia</i> spp.	8	17	24	6	29	27	NT	27	8	24	29	29	23	18	NT	18	25	24	23	23	20	NT	NR
13A	<i>Citrobacter freundii</i> / <i>Enterobacter cloacae</i> / <i>Serratia</i> spp.	8	16	23	11	29	25	NT	15	8	22	28	20	21	19	NT	22	24	NT	26	24	19	NT	NR
13B	<i>Citrobacter freundii</i> / <i>Enterobacter cloacae</i> / <i>Serratia</i> spp.	NT	NT	14	6	19	20	NT	NT	8	15	27	26	24	22	NT	23	28	25	27	NT	20	NT	NR
14A	<i>Citrobacter freundii</i> / <i>Enterobacter cloacae</i> / <i>Serratia</i> spp.	10	18	25	11	30	29	NT	29	11	26	30	30	25	24	NT	23	30	28	29	29	22	NT	NR
14B	<i>Citrobacter freundii</i> / <i>Enterobacter cloacae</i> / <i>Serratia</i> spp.	8	17	24	9	31	28	NT	25	8	25	30	28	23	18	NT	19	27	23	24	22	18	NT	NR
15A	<i>Citrobacter freundii</i> / <i>Enterobacter cloacae</i> / <i>Serratia</i> spp.	6	12	26	6	32	30	18	26	6	28	23	22	23	19	22	18	30	30	28	26	24	NT	NR
15B	<i>Citrobacter freundii</i> / <i>Enterobacter cloacae</i> / <i>Serratia</i> spp.	6	12	22	7	30	29	NT	28	6	23	27	28	23	18	NT	18	27	27	27	24	23	NT	NR
16A	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	26	21	26	24	32	33	NT	31	25	28	32	31	29	20	NT	22	28	26	25	24	22	NT	NR
16B	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NT	16	22	22	26	28	NT	24	20	18	25	31	26	23	NT	24	29	25	26	24	22	NT	NR
17	<i>Citrobacter freundii</i> / <i>Enterobacter cloacae</i> / <i>Serratia</i> spp.	8	16	22	8	30	26	NT	23	9	23	23	30	22	NT	NT	23	28	24	NT	27	19	NT	NR
18	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	23	18	25	22	32	31	NT	30	26	26	29	31	29	19	NT	20	28	27	26	24	23	NT	NR
19	<i>Citrobacter freundii</i> / <i>Enterobacter cloacae</i>	12	18	26	10	30	30	NT	26	12	25	30	30	26	19	NT	19	26	24	25	24	20	NT	NR
21	<i>Citrobacter freundii</i> / <i>Enterobacter cloacae</i> / <i>Serratia</i> spp.	10	19	24	6	24	28	NT	25	20	26	27	NT	28	20	NT	22	25	26	24	24	24	NT	NR
22	<i>Citrobacter freundii</i> / <i>Enterobacter cloacae</i>	12	18	22	12	27	26	NT	24	20	24	30	29	24	18	NT	20	24	24	24	22	22	NT	NR

* De acordo com CLSI (2008; 2011).

^a De acordo com EUCAST (2011).

^v Identificação realizada através do sistema Vitek 2 Compact

AK: amicacina; AMC: amoxicilina/ácido clavulânico; ATM: aztreonam; CAZ: ceftazidima; CN: gentamicina; CRO: ceftioxona; CTX: cefotaxima; EFT: ceftiofur; ENO: enrofloxacin; ETP: eropenem; FEP: cefepima; FOX: cefoxitina; IPM: imipenem; KF: cefalotina; LEV: levofloxacin; MXF: moxifloxacin; NA: ácido nalidíxico; OFX: ofloxacin; TOB: tobramicina; TZP: piperacilina/tazobactam; CIP: ciprofloxacina.

NR: teste não realizado ou gene não detectado. NT: antibiótico não testado. R: tamanho do halo que indica resistência ao antimicrobiano (números marcados em vermelho); S: tamanho do halo que indica sensibilidade ao antimicrobiano (números marcados em preto); valores intermediários a R e S indicam resistência intermediária ao antimicrobiano (números marcados em verde).

Tabela 1 (continuação). Suscetibilidade aos antimicrobianos e diversidade genotípica das cepas isoladas no estudo.

Cepa	Identidade	Suscetibilidade aos Antimicrobianos (mm)*																				Diversidade genética			
		AMC	SAM	TZP	KF	FEP	CTX	EFT	CRO	FOX	CAZ	ATM	ETP	IPM	CN	TOB	AK	LEV	ENO	OFX	MXF [®]	NA	CIP		
		R ≤ 13 S ≥ 18	R ≤ 11 S ≥ 15	R ≤ 17 S ≥ 21	R ≤ 14 S ≥ 18	R ≤ 14 S ≥ 18	R ≤ 22 S ≥ 26	R ≤ 19 S ≥ 23	R ≤ 19 S ≥ 23	R ≤ 17 S ≥ 21	R ≤ 17 S ≥ 21	R ≤ 19 S ≥ 23	R ≤ 19 S ≥ 23	R ≤ 12 S ≥ 15	R ≤ 12 S ≥ 15	R ≤ 14 S ≥ 17	R ≤ 13 S ≥ 17	R ≤ 15 S ≥ 21	R ≤ 12 S ≥ 16	R ≤ 16 S ≥ 20	R ≤ 13 S ≥ 19	R ≤ 15 S ≥ 21			
23	<i>Citrobacter freundii</i> / <i>Enterobacter cloacae</i> / <i>Serratia</i> spp.	16	19	26	6	28	26	23	25	15	24	30	30	24	16	NT	20	26	26	26	24	25	NT		
27	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	24	20	24	24	30	32	26	30	20	26	30	30	28	19	NT	21	26	28	24	25	22	NT		
28	<i>Enterobacter cloacae</i> ssp <i>dissolvens</i> [®]	10	18	22	10	28	24	24	24	22	24	24	28	24	18	NT	18	24	24	24	22	20	NT		
29A	<i>Enterobacter cloacae</i> complex [®]	13	17	24	6	30	24	20	24	14	24	28	30	25	18	NT	19	25	26	25	24	24	NT		
29B	<i>Citrobacter freundii</i> / <i>Enterobacter cloacae</i>	12	18	26	12	30	30	24	26	20	25	30	30	27	18	NT	20	24	26	25	24	22	NT		
33	<i>Klebsiella pneumoniae</i> [®]	20	18	18	19	29	29	18	26	20	22	30	26	24	18	NT	18	24	26	24	24	22	NT		
35	<i>Klebsiella oxytoca</i>	25	24	24	25	30	32	28	30	24	28	30	30	28	18	NT	18	32	30	30	24	24	NT		
36	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	25	18	24	23	31	32	26	30	24	28	32	32	27	18	21	23	28	28	24	25	24	30		
37A	<i>Citrobacter freundii</i>	11	22	26	8	31	28	28	29	6	28	31	30	24	18	20	20	28	29	28	28	25	30		
37B	<i>Klebsiella pneumoniae</i> [®]	23	18	23	20	30	29	20	26	23	26	30	29	27	18	20	19	26	26	24	23	19	26		
38	<i>Serratia marcescens</i>	22	17	22	20	28	29	23	30	24	27	30	29	26	18	18	18	24	24	23	22	20	26		
39	<i>Enterobacter cloacae</i> complex [®]	18	21	24	6	30	24	11	28	8	27	29	30	18	14	19	18	29	29	23	28	20	MIR-1 ACT-1		
40	<i>Escherichia coli</i> [®]	21	18	24	14	26	26	23	27	26	25	28	28	22	18	18	18	24	27	26	24	20	27		
41	<i>Serratia marcescens</i>	21	18	24	23	29	28	23	26	23	27	29	27	26	17	19	18	24	23	23	23	21	24		

* De acordo com CLSI (2008; 2011).

^a De acordo com EUCAST (2011).

^v Identificação realizada através do sistema Vitek 2 Compact

AK: amicacina; AMC: amoxicilina/ácido clavulânico; ATM: aztreonam; CAZ: ceftazidima; CN: gentamicina; CRO: ceftioxona; CTX: cefotaxima; EFT: ceftiofur; ENO: enrofloxacin; ETP: ertapenem; FEP: cefepima; FOX: cefoxitina; IPM: imipenem; KF: cefalotina; LEV: levofloxacin; MXF: moxifloxacin; NA: ácido nalidíxico; OFX: ofloxacin; TOB: tobramicina; TZP: piperacilina/tazobactam; CIP: ciprofloxacina.

NR: teste não realizado ou gene não detectado. NT: antibiótico não testado. R: tamanho do halo que indica resistência ao antimicrobiano (números marcados em vermelho); S: tamanho do halo que indica sensibilidade ao antimicrobiano (números marcados em preto); valores intermediários a R e S indicam resistência intermediária ao antimicrobiano (números marcados em verde).

Tabela 1 (continuação). Suscetibilidade aos antimicrobianos e diversidade genotípica das cepas isoladas no estudo.

Cepa	Identidade	Suscetibilidade aos Antimicrobianos (mm)*																						
		AMC	SAM	TZP	KF	FEP	CTX	EFT	CRO	FOX	CAZ	ATM	ETP	IPM	CN	TOB	AK	LEV	ENO	OFX	MXF ^m	NA	CIP	
		R ≤ 13 S ≥ 18	R ≤ 11 S ≥ 15	R ≤ 17 S ≥ 21	R ≤ 14 S ≥ 18	R ≤ 14 S ≥ 18	R ≤ 22 S ≥ 26	R ≤ 19 S ≥ 23	R ≤ 19 S ≥ 23	R ≤ 14 S ≥ 18	R ≤ 17 S ≥ 21	R ≤ 17 S ≥ 21	R ≤ 19 S ≥ 23	R ≤ 19 S ≥ 23	R ≤ 12 S ≥ 15	R ≤ 12 S ≥ 15	R ≤ 14 S ≥ 17	R ≤ 13 S ≥ 17	R ≤ 15 S ≥ 21	R ≤ 12 S ≥ 16	R ≤ 16 S ≥ 20	R ≤ 13 S ≥ 19	R ≤ 15 S ≥ 21	
42	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ^b	22	18	24	23	30	30	22	28	23	26	30	29	28	18	20	20	27	27	24	24	22	27	<i>bla</i> _{SHV} -like
43	<i>Escherichia coli</i>	24	24	29	24	35	30	30	32	27	29	34	29	26	18	18	20	28	28	27	25	24	30	NR
44	<i>Serratia marcescens</i>	26	21	29	27	36	34	28	33	29	33	37	34	30	18	23	22	29	30	28	25	24	30	NR
45	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ^b	24	20	20	19	29	27	19	30	24	27	31	30	30	18	21	21	28	28	24	24	21	29	<i>bla</i> _{SHV} -like
46	<i>Serratia marcescens</i>	22	20	22	NT	NT	31	24	28	23	24	30	NT	26	17	19	17	22	22	22	24	21	23	NR
47	<i>Serratia marcescens</i>	24	22	28	25	34	34	25	30	24	27	34	28	25	18	20	20	26	26	24	24	14	24	<i>qnrS</i>
48	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	24	20	24	NT	NT	30	24	29	24	29	32	NT	29	19	20	18	23	24	22	24	21	25	NR
49A	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ^b	26	19	28	25	32	18	28	34	27	34	36	NT	30	20	22	19	27	27	26	24	23	29	<i>bla</i> _{SHV} -like
49B	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ^b	24	22	26	6	17	31	24	30	26	30	32	NT	30	18	18	18	20	24	22	21	18	23	<i>bla</i> _{SHV} -like/ <i>qnrS</i>
50	<i>Escherichia coli</i>	25	24	30	18	32	31	28	32	26	32	35	NT	30	18	21	18	26	24	24	24	22	27	NR
53	<i>Escherichia coli</i>	22	18	26	18	30	30	26	32	24	31	32	NT	31	16	16	16	24	24	23	23	20	27	NR
54	<i>Citrobacter freundii</i>	8	12	30	12	35	30	24	30	6	30	32	NT	30	16	NT	20	26	24	24	22	21	29	NR
55	<i>Citrobacter freundii</i>	10	15	26	N	34	32	24	30	6	30	32	NT	30	20	23	20	25	26	26	21	23	28	NR
56	<i>Citrobacter freundii</i> / <i>Enterobacter cloacae</i>	8	14	26	NT	32	30	24	30	17	27	30	NT	26	18	20	17	24	26	24	21	20	28	NR

* De acordo com CLSI (2008; 2011).

^a De acordo com EUCAST (2011).

^v Identificação realizada através do sistema Vitek 2 Compact

AK: amikacina; AMC: amoxicilina/ácido clavulânico; ATM: aztreonam; CAZ: ceftazidima; CN: gentamicina; CRO: ceftioxona; CTX: cefotaxima; EFT: ceftiofur; ENO: enrofloxacin; ETP: ertapenem; FEP: cefepima; FOX: cefoxitina; IPM: imipenem; KF: cefalotina; LEV: levofloxacin; MXF: moxifloxacin; NA: ácido nalidíxico; OFX: ofloxacin; TOB: tobramicina; TZP: piperacilina/tazobactam; CIP: ciprofloxacina.

NR: teste não realizado ou gene não detectado. NT: antibiótico não testado. R: tamanho do halo que indica resistência ao antimicrobiano (números marcados em vermelho); S: tamanho do halo que indica sensibilidade ao antimicrobiano (números marcados em preto); valores intermediários a R e S indicam resistência intermediária ao antimicrobiano (números marcados em verde).

Tabela 1 (continuação). Suscetibilidade aos antimicrobianos e diversidade genotípica das cepas isoladas no estudo.

Cepa	Identidade	Suscetibilidade aos Antimicrobianos (mm)*																						
		AMC	SAM	TZP	KF	FEP	CTX	EFT	CRO	FOX	CAZ	ATM	ETP	IPM	CN	TOB	AK	LEV	ENO	OFX	MXF ^a	NA	CIP	
		R ≤ 13 S ≥ 18	R ≤ 11 S ≥ 15	R ≤ 17 S ≥ 21	R ≤ 14 S ≥ 18	R ≤ 14 S ≥ 18	R ≤ 22 S ≥ 26	R ≤ 19 S ≥ 23	R ≤ 19 S ≥ 23	R ≤ 14 S ≥ 18	R ≤ 17 S ≥ 21	R ≤ 17 S ≥ 21	R ≤ 19 S ≥ 23	R ≤ 19 S ≥ 23	R ≤ 12 S ≥ 15	R ≤ 12 S ≥ 15	R ≤ 14 S ≥ 17	R ≤ 13 S ≥ 17	R ≤ 15 S ≥ 21	R ≤ 12 S ≥ 16	R ≤ 16 S ≥ 20	R ≤ 13 S ≥ 19	R ≤ 15 S ≥ 21	
57A	<i>Enterobacter cloacae complex</i> ^b	12	18	26	6	28	26	26	24	10	26	30	34	26	22	24	22	28	30	28	24	26	32	<i>bla_{TEM-1}/MR-1</i> ACT-1
57B	<i>Citrobacter freundii/Enterobacter cloacae/ Serratia spp.</i>	10	14	27	12	33	32	26	29	12	29	32	NT	29	18	NT	18	24	27	24	22	21	26	NR
58	<i>Serratia marcescens</i>	24	21	27	NT	NT	35	26	30	26	31	35	NT	33	20	23	19	25	25	24	26	22	26	NR
59A	<i>Klebsiella oxytoca</i>	25	22	27	NT	NT	33	25	30	27	32	33	NT	30	18	22	22	30	29	26	8	24	30	NR
59B	<i>Serratia marcescens</i>	25	22	28	NT	33	34	26	31	25	31	37	NT	31	18	22	21	30	29	28	24	24	30	NR
60A	<i>Enterobacter aerogenes</i> ^b	11	18	24	NT	NT	30	22	28	6	27	30	NT	22	19	20	20	30	26	27	25	21	28	<i>bla_{TEM-1}</i>
60B	<i>Serratia marcescens</i>	25	24	22	NT	NT	34	26	32	25	33	36	NT	30	19	22	22	29	28	26	24	NT	28	NR
61	<i>Serratia marcescens</i>	23	20	26	NT	NT	33	26	32	25	30	34	NT	30	18	20	18	24	23	22	24	20	24	NR
62A	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ^b	21	20	17	NT	NT	31	22	28	22	28	32	NT	27	18	19	19	27	26	25	24	23	28	<i>bla_{SHV-1}-like</i>
62B	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ^b	23	22	26	NT	NT	16	26	32	25	30	36	NT	29	19	22	18	28	26	27	24	23	30	<i>bla_{SHV-1}-like</i>
63	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	23	20	26	24	32	34	24	31	25	29	31	NT	28	17	22	20	28	29	26	26	24	30	NR
64	<i>Serratia marcescens</i>	24	19	26	24	31	30	26	30	25	30	31	30	27	19	23	20	26	26	26	24	23	30	NR
65A	<i>Serratia marcescens</i>	21	18	24	19	30	28	23	29	23	26	29	31	30	11	22	21	25	22	24	24	18	29	<i>qnrS</i>
65B	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	24	19	24	22	30	30	24	29	24	26	30	30	27	18	20	18	23	24	22	21	20	25	NR

* De acordo com CLSI (2008; 2011).

^a De acordo com EUCAST (2011).

^v Identificação realizada através do sistema Vitek 2 Compact

AK: amicacina; AMC: amoxicilina/ácido clavulânico; ATM: aztreonam; CAZ: ceftazidima; CN: gentamicina; CRO: ceftriaxona; CTX: cefotaxima; EFT: ceftiofur; ENO: enrofloxacin; ETP: ertapenem; FEP: cefepima; FOX: cefoxitina; IPM: imipenem; KF: cefalotina; LEV: levofloxacin; MXF: moxifloxacin; NA: ácido nalidíxico; OFX: ofloxacin; SAM: ampicilina/sulbactam; TOB: tobramicina; TZP: piperacilina/tazobactam; CIP: ciprofloxacina.

NR: teste não realizado ou gene não detectado. NT: antibiótico não testado. R: tamanho do halo que indica resistência ao antimicrobiano (números marcados em vermelho); S: tamanho do halo que indica sensibilidade ao antimicrobiano (números marcados em preto); valores intermediários a R e S indicam resistência intermediária ao antimicrobiano (números marcados em verde).

Tabela 1 (continuação). Suscetibilidade aos antimicrobianos e diversidade genotípica das cepas isoladas no estudo.

Cepa	Identidade	Suscetibilidade aos Antimicrobianos (mm)*																			Diversidade genética		
		AMC	SAM	TZP	KF	FEP	CTX	EFT	CRO	FOX	CAZ	ATM	ETP	IPM	CN	TOB	AK	LEV	ENO	OFX	MXF ^a	NA	CIP
		R ≤ 13 S ≥ 18	R ≤ 11 S ≥ 15	R ≤ 17 S ≥ 21	R ≤ 14 S ≥ 18	R ≤ 22 S ≥ 26	R ≤ 19 S ≥ 23	R ≤ 19 S ≥ 23	R ≤ 14 S ≥ 18	R ≤ 17 S ≥ 21	R ≤ 17 S ≥ 21	R ≤ 19 S ≥ 23	R ≤ 19 S ≥ 23	R ≤ 12 S ≥ 15	R ≤ 12 S ≥ 15	R ≤ 14 S ≥ 17	R ≤ 13 S ≥ 17	R ≤ 15 S ≥ 21	R ≤ 12 S ≥ 16	R ≤ 16 S ≥ 20	R ≤ 13 S ≥ 19	R ≤ 15 S ≥ 21	
66	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ^b	22	16	24	22	30	30	6	NT	20	28	32	30	18	20	22	20	26	24	24	24	22	28
67	<i>Serratia marcescens</i>	20	20	24	22	28	30	24	30	24	28	32	30	28	8	23	19	23	28	28	24	24	30

* De acordo com CLSI (2008; 2011).

^a De acordo com EUCAST (2011).

^b Identificação realizada através do sistema Vitek 2 Compact

AK: amicacina; AMC: amoxicilina/ácido clavulânico; ATM: aztreonam; CAZ: ceftazidima; CN: gentamicina; CRO: ceftriaxona; CTX: cefotaxima; EFT: ceftiofur; ENO: enrofloxacina; ETP: ertapenem; FEP: cefepima; FOX: cefoxitina; IPM: imipenem; KF: cefalotina; LEV: levofloxacina; MXF: moxifloxacina; NA: ácido nalidíxico; OFX: ofloxacina; SAM: ampicilina/sulbactam; TOB: tobramicina; TZP: piperacilina/tazobactam; CIP: ciprofloxacina.

NR: teste não realizado ou inconclusivo. NT: antibiótico não testado. ND: gene não detectado/não amplificado.

R: tamanho do halo que indica resistência ao antimicrobiano (números marcados em vermelho); S: tamanho do halo que indica sensibilidade ao antimicrobiano (números marcados em preto); valores intermediários a R e S indicam resistência intermediária ao antimicrobiano (números marcados em verde).

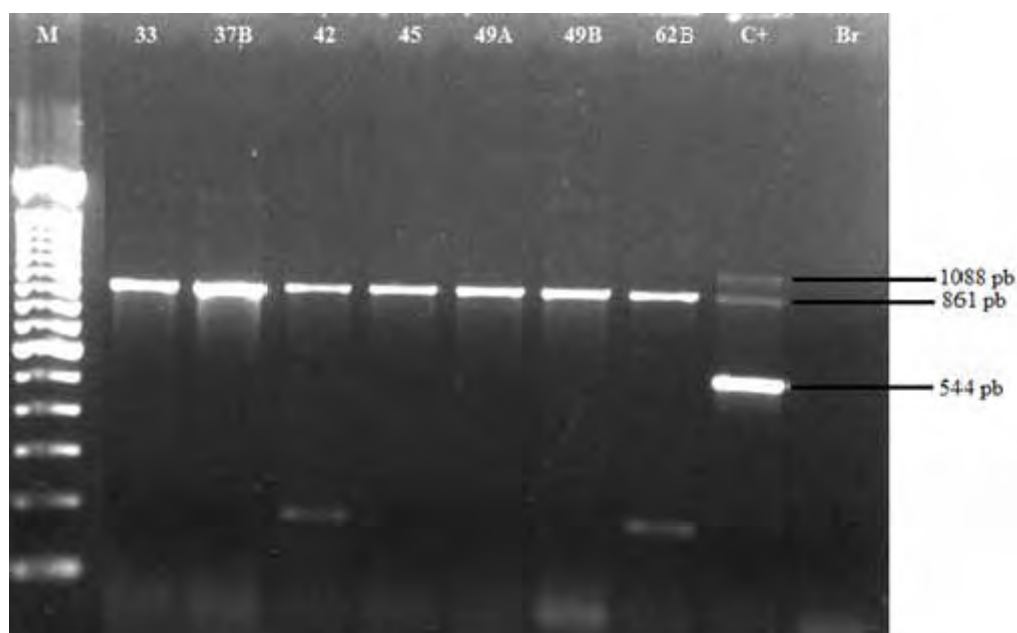
6.2 Resultados Moleculares

6.2.1 Detecção de genes de resistência às drogas β -lactâmicas

Após a análise dos perfis de susceptibilidade aos antimicrobianos apresentados pelos 72 isolados incluídos no estudo, 22 foram selecionados por terem apresentado resistência a cefotaxima, ceftiofur, ceftriaxona ou ceftazidima. Estes isolados foram identificados pelo sistema *Vitek 2 Compact* e submetidos aos ensaios para a detecção de genes de resistência às drogas β -lactâmicas (genes *bla*). Em 9 isolados (40,90%) foi detectado o gene *bla*_{SHV-like} (33, 37B, 42, 45, 49A, 49B, 62A, 62B e 66) e em 2 (9,09%) o gene *bla*_{TEM-like} (57A e 60A). O gene *bla*_{CTX-M} não foi detectado nas amostra testadas.

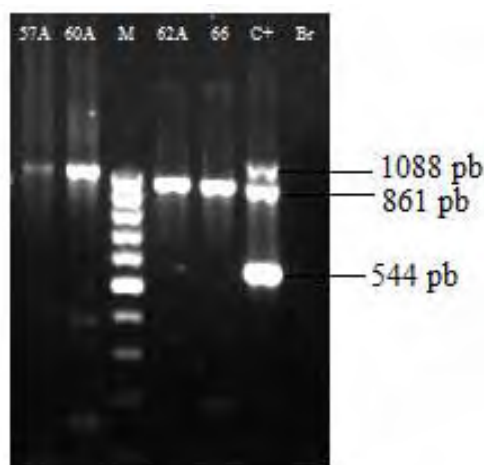
A cepa 49B foi submetida aos ensaios moleculares por ter apresentado resistência ao cefepime, uma cefalosporina de quarta geração e a cefalotina, uma cefalosporina de primeira geração.

Fotografia 2 – Gel de eletroforese da multiplex-PCR para detecção dos genes *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM} e *bla*_{CTX-M}.



[M: marcador de peso molecular de 100 pb. C+: controle positivo da reação. Br: controle negativo da reação. Cepas positivas para *bla*_{SHV-like}, com amplificação do fragmento de 861pb: 33, 37B, 42, 45, 49A, 49B e 62B].

Fotografia 3 – Gel de eletroforese da multiplex-PCR para detecção dos genes *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}* e *bla_{CTX-M}*.



[M: marcador de peso molecular de 100 pb. C+: controle positivo da reação. Br: controle negativo da reação. Cepas positivas para *bla_{SHV}-like*, com amplificação do fragmento de 861pb: 62A e 66. Cepas positivas para *bla_{TEM}-like*, com amplificação do fragmento 1088 pb: 57A, 60A].

O sequenciamento do gene *bla_{TEM}* detectado nas cepas 57A e 60A revelou tratar-se de *bla_{TEM-1}*. TEM-1 é uma β -lactamase de espectro restrito, frequentemente detectada em bactérias isoladas de amostras clínicas humanas. Embora esse gene não seja causador de um perfil de resistência às cefalosporinas de terceira geração, sua presença em cepas possivelmente patogênicas isoladas de água é preocupante pelo fato de este gene poder sofrer mutações que resultem na expressão de β -lactamases de espectro estendido (HERITAGE et al., 1999; HAEGGMAN et al., 2004; PATERSON & BONOMO, 2005; JACOBY & MUÑOZ-PRICE, 2005).

As cepas em que foi detectado o gene *bla_{SHV}-like*, foram identificadas como *Klebsiella pneumoniae*, reconhecida como um importante agente de infecções relacionadas à assistência à saúde e comunitárias, além de ser considerada o principal reservatório de genes de resistência dentre as Enterobacteriaceae. Esta bactéria coloniza os tratos respiratório e intestinal de humanos e causa pneumonia, bacteremia e meningite (LEVINSON & JAWETZ, 2005). Apesar de estas cepas terem apresentado resistência a alguma cefalosporina de terceira geração, elas apresentaram teste fenotípico negativo para produção de ESBL, sugerindo que o gene *bla_{SHV}* seja de espectro restrito. A resistência às cefalosporinas de terceira geração nestes isolados pode ser resultado de outros mecanismos comumente encontrados em Enterobacteriaceae, tais como a perda de porinas e expressão de bombas de efluxo (LI & NIKAIDO, 2009).

A presença de uma cópia cromossômica de SHV-1 é considerada comum em *Klebsiella pneumoniae* (BABINI & LIVERMORE, 2000). Para a identificação do gene *bla*_{SHV-like} detectado em 9 isolados o sequenciamento encontra-se em andamento.

Os Quadros 7 e 8 apresentam as características de suscetibilidade aos antimicrobianos em isolados com detecção do gene *bla*_{SHV-like} e *bla*_{TEM-1} respectivamente.

Quadro 7 – Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos nos isolados onde foi detectado o gene *bla*_{SHV-like}

Isolado	33	37B	42	45	49A	49B	62A	62B	66
Espécie	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i>
Antimicrobianos	AMC	S	S	S	S	S	S	S	S
	SAM	S	S	S	S	S	S	S	S
	TZP	I	S	S	I	S	R	S	S
	KF	S	S	S	S	S	NT	NT	S
	FEP	S	S	S	S	S	NT	NT	S
	CTX	S	S	S	S	R	R	S	R
	EFT	R	I	I	R	S	S	I	S
	CRO	S	S	S	S	S	S	S	NT
	FOX	S	S	S	S	S	S	S	S
	CAZ	S	S	S	S	S	S	S	S
	ATM	S	S	S	S	S	S	S	S
	ETP	S	S	S	S	NT	NT	NT	S
	IPM	S	S	S	S	S	S	S	R

AMC: amoxicilina/ácido clavulânico; SAM: ampicilina/sulbactam; TZP: peracilina/tazobactam; KF: cefalotina; FEP: cefepima; CTX: cefotaxima; EFT: ceftiofur; CRO: ceftriaxona; FOX: ceftazidima; ATM: aztreonam; ETP: ertapenem; IPM: imipenem. NT: antimicrobiano não testado. R: indica resistência ao antimicrobiano testado. S: indica sensibilidade ao antimicrobiano testado. I: resistência intermediária ao antimicrobiano testado.

Quadro 8 – Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos nos isolados onde foi detectado o gene *bla*_{TEM-1}

Isolado		57A	60A
Espécie		<i>E. cloacae</i>	<i>E. aerogenes</i>
Antimicrobianos	AMC	R	R
	SAM	S	S
	TZP	S	S
	KF	R	NT
	FEP	S	NT
	CTX	S	S
	EFT	I	I
	CRO	S	S
	FOX	R	R
	CAZ	S	S
	ATM	S	S
	ETP	S	NT
	IPM	S	I

AMC: amoxicilina/ácido clavulânico; SAM: ampicilina/sulbactam; TZP: peracilina/tazobactam; KF: cefalotina; FEP: cefepima; CTX: cefotaxima; EFT: ceftiofur; CRO: ceftriaxona; FOX: cefoxitina; CAZ: ceftazidima; ATM: aztreonam; ETP: ertapenem; IPM: imipenem. NT: antimicrobiano não testado. R: indica resistência ao antimicrobiano testado. S: indica sensibilidade ao antimicrobiano testado. I: resistência intermediária ao antimicrobiano testado.

Durante a avaliação dos resultados apresentados nos Quadros 7 e 8, observamos que entre os 11 isolados nos quais houve detecção dos genes *bla*_{SHV-like} e *bla*_{TEM-1}, 8 (72,72%) apresentaram resistência ao ceftiofur, uma cefalosporina de terceira geração, aprovada para uso em bovinos, principalmente para as doenças respiratórias e osteoarticulares (HORNISH & KOTARSKI, 2002). O ceftiofur foi incluído neste estudo porque o uso intensivo de antimicrobianos na medicina veterinária também é associado à seleção de bactérias patogênicas resistentes, que disseminam pelo ambiente, inclusive no ambiente aquático (WHO, 2001).

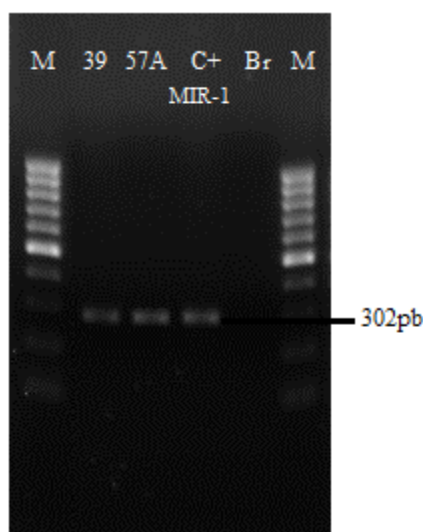
A ocorrência de Enterobacteriaceae resistentes ao ceftiofur nas amostras de água estudadas chamou atenção, pois é um análogo da ceftriaxona, uma cefalosporina de terceira geração amplamente usada para o tratamento de infecções graves por bactérias Gram-negativas em humanos (MEDEIROS, 1997; POIREL et al., 2001).

A resistência ao ceftiofur em Enterobacteriaceae tem sido relacionada à produção de β -lactamases da classe C de Ambler, principalmente a CMY (LI et al., 2007; DONALDSON et al., 2006; MEUNIER et al., 2010). Assim, todos os isolados resistentes ao ceftiofur

observados neste estudo (1, 3, 15A, 29A, 33, 37B, 39, 42, 45, 57A, 60A, 62A e 66) foram submetidos a PCR para detecção de genes de β -lactamases do tipo AmpC. Nas cepas 39 e 57A observou-se a formação de uma banda de 302pb correspondente aos genes de AmpC *bla*_{MIR-1}/*bla*_{ACT-1} (Fotografia 4), porém o gene *bla*_{CMY} não foi detectado.

É importante ressaltar que entre os isolados resistentes ao ceftiofur, os genes *bla*_{MIR-1}/*bla*_{ACT-1} foram identificados em *E. cloacae*. Esta espécie apresenta genes cromossômicos que codificam β -lactamases tipo AmpC, incluindo *bla*_{MIR-1}/*bla*_{ACT-1} (JACOBY & TRAN, 1999; SHIMIZU-IBUKA, 2008). Mutações nestes genes podem causar a hiperprodução de AmpC, que leva à resistência ao ceftiofur (SU et al., 2003). Por outro lado, a resistência ao ceftiofur também foi detectada em *K. pneumoniae*. Nesta bactéria, AmpC cromossômicas não são descritas, sendo necessário investigar os possíveis mecanismos responsáveis por tal resistência.

Fotografia 4 – Gel de eletroforese da PCR para detecção dos genes *bla*_{MIR-1}/*bla*_{ACT-1}.



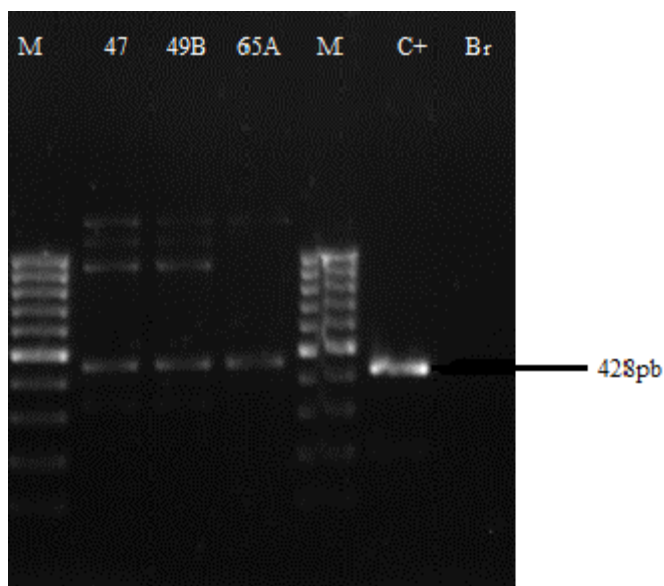
[M: marcador de peso molecular de 100 pb. C+: controle positivo da reação para *bla*_{MIR-1}. Br: controle negativo da reação. Cepas positivas para *bla*_{MIR-1}/*bla*_{ACT-1}, com amplificação do fragmento de 302 pb: 39 e 57A].

6.2.2 Detecção de genes de resistência às quinolonas

Os 5 isolados que apresentaram resistência à quinolonas foram submetidos aos ensaios para a detecção de genes *qnr*. Foram pesquisados o genes *qnrA*, *qnrB* e *qnrS*. Em 3 (60%) destes isolados foi detectado o gene *qnrS* (Fotografia 5) sendo que os isolados 47 e 65A foram identificados como *Serratia marcescens* e 49B como *Klebsiella pneumoniae*. No teste de suscetibilidade aos antimicrobianos, estes isolados apresentaram resistência ao ácido nalidíxico e não apresentaram resistência às cefalosporinas de terceira geração.

Estudiosos encontraram o gene *qnrS2* em microrganismos presentes em uma estação de tratamento águas residuais na Alemanha e enfatizaram a possível disseminação de determinantes de resistência do tipo Qnr no ambiente (BONEMANN et al., 2006). Esta afirmativa sobre o papel da água como veículo de disseminação de determinantes de resistência foi referida em um estudo realizado recentemente, que reporta a presença não esperada de determinantes QnrS2 em *Aeromonas* spp. isoladas em diversas partes do Rio Sena, em Paris (CATTOIR et al., 2008).

Fotografia 5 – Gel de eletroforese da PCR para detecção do gene *qnrS*.



[M: marcador de peso molecular de 100 pb. C+: controle positivo da reação para *qnrS*. Br: controle negativo da reação. Cepas positivas para *qnrS*, com amplificação do fragmento de 428 pb: 47, 49B e 65A].

7 CONCLUSÕES

- a) Entre os coliformes estudados, as taxas de resistência aos β -lactâmicos e quinolonas são baixos, sendo que não foram detectados coliformes produtores de ESBLs.
- b) A presença de coliformes resistentes ao ceftiofur pode indicar a ocorrência de uma fonte de contaminação específica, relacionada a atividades agroindustriais onde este antimicrobiano seja utilizado. Serão necessários estudos para elucidar a origem destas bactérias bem como o mecanismo de resistência.
- c) A presença de *Serratia marcescens* e *Klebsiella pneumoniae* carreadoras do gene *qnrS* reflete a ampla disseminação deste mecanismo de resistência às quinolonas na comunidade, principalmente quando considera-se a baixa frequência de detecção de coliformes nas amostras estudadas.
- d) A água distribuída pelo SeMAE no município de São José do Rio Preto apresenta baixos índices de contaminação por coliformes, mas entre os coliformes isolados, observam-se cepas resistentes a antimicrobianos de importância em medicina humana e veterinária.
- e) Em razão dos dados obtidos e por ser o ambiente aquático um importante veículo na disseminação de determinantes de resistência, estudos de vigilância devem ser continuamente realizados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRIOUEL, H. et al. Comparative analysis of genetic diversity and incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococcal populations from raw fruit and vegetable foods, water and soil, and clinical samples. **Int J Food Microbiol**, v.123, n.1-2, Mar 31, p.38-49, 2008.

ALEKSHUM, M. N.; LEVY, S. B. The *Escherichia coli* *mar* locus – antibiotic resistance and more. **ASM News**, v.70, n.10, p.451-456, 2004.

AMBLER, R. P. The structure of β -lactamases. **Phil Trans R Soc Lond Biol**, v.289, p.321-331, 1980.

AMBLER, R. P. et al. A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases. **Biochem J**, v.276, p.269-270, 1991.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION - **Standard Methods for Examination of Water and Wastewater**. 21. ed. Washington: APHA, 2005.

ASHBOLT, N.J. Microbial contamination of drinking water and disease outcomes in developing regions. **Toxicology**, 198: 229-238, 2004.

AZEVEDO, J. S. N. et al. Analysis of antibiotic resistance in bacteria isolated from the surface microlayer and underlying water of a estuarine environment. **Microbial Drug Resistance**, v. 0, n. 0, p. 1-8, 2012.

BABIC, M.; HUJER, A. M.; BONOMO, R. A. What's new in antibiotic resistance? Focus on beta-lactamases. **Drug Resist Updat**, v. 9, n. 3, p. 142-56, 2006.

BABINI, G. S., LIVERMORE, D. M. Are SHV β -lactamases universal in *Klebsiella pneumoniae*? **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, p. 2230.

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

BAUERNFEIND, A. et al. Antibacterial activity and beta-lactamase stability of eleven oral cephalosporins. **Infection**, v. 18, suppl. 3, p. 155-161, 1990.

BLONDEAU, J. M. Fluoroquinolones: mechanism of action, classification, and development of resistance. **Survey of Ophthalmology**, v. 49, p. 73-78, 2004.

BOECK, H. et al. ESBL-positive enterobacteria isolates in drinking water. **Emerg Infect Dis**, v. 18, p. 1019-1020, 2012.

BONEMANN, G. et al. Mobilizable IncQ related plasmid carrying a new quinolone resistance gene, *qnrS2*, isolated from the bacterial community of a waste water treatment plant. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, p. 3075-3080, 2006.

BONNET, R. et al. Novel cefotaximase (CTX-M-16) with increased catalytic efficiency due to substitution Asp-240→Gly. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 8, p. 2269–2275, 2001.

BONNET, R. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. **Antimicrob Agents Chemother**, v.48, n.1, Jan, p.1-14, 2004.

BOU G. et al. Identification and broad dissemination of the CTX-M-14 beta-lactamase in different *Escherichia coli* strains in the northwest area of Spain. **Clin Microbiol**. v. 40, n. 11, p. 4030-4036, 2002.

BRADFORD, P. A. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. **Clin Microbiol Rev**, v.14, n.4, Oct, p.933-51, 2001.

BRASIL. Portaria nº 518 de 25 de março de 2004 do Ministério da Saúde. **Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, v. 1, p. 266-9, 2004.

BRASIL. Portaria nº 2914 de 12 de dezembro de 2011 do Ministério da Saúde. **Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, Seção1, p. 39-46, 2011.

BRASME, L. et al. Incidence of class A extended spectrum β -lactamase in Champagne-Ardenne (France): a 1 year prospective study, **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 60, p. 956-964, 2007.

BUSH, K. et al. Kinetic interactions of tazobactam with beta-lactamases from all major structural classes. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 37, n. 4, p. 851-8, 1993.

BUSH, K.; JACOBY, G. A.; MEDEIROS, A. A. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrob Agents Chemother**, v.39, n.6, Jun, p.1211-33, 1995.

BUSH, K. New beta-lactamases in gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. **Clin Infect Dis**, v.32, n.7, p.1085-1089, 2001.

BUSH, K. Proliferation and significance of clinically relevant β -lactamases. **Ann N Y Acad Sci**, p. 84-90, 2013.

CAMBAU, E. et al. Occurrence of *qnrA*- positive clinical isolates in French teaching hospitals during 2002-2005. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 12, p. 1013-1020, 2006.

CANTON R., COQUE T. M, BAQUERO F. Multi-resistant Gram-negative bacilli: from epidemics to endemics. **Curr Opin Infect Dis**, v.16, p. 315-325, 2003.

CANTON, R.; COQUE. T. M. The CTX-M β -lactamase pandemic. **Curr Opin Microbiol**, v. 9, p. 466–75, 2006.

CAPOZZI, V.; SPANO, G. Horizontal gene transfer in the gut: Is it a risk? **Food Resear Intern**, v.42, p.1501-1502, 2009.

CARATTOLI, A. Animal reservoirs for extended spectrum β -lactamase producers. **Clin Microbiol Infect**, v.14, suppl.1, p.117-123, 2008.

CATTOIR, V. et al. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance *qnr* genes in ESBL producing enterobacterial isolates. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 60, p. 394-397, 2007.

CATTOIR, V. et al. Unexpected occurrence of plasmid mediated quinolone resistance determinants in environmental *Aeromonas* spp. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, p. 231-237, 2008.

CHERCHI, C.; GU, A. Z. Effect of bacterial growth stage on resistance to chlorine disinfection. **Water Sci Technol**, v. 64, p. 7-13, 2011.

COQUE, T. M.; BAQUERO, F.; CANTON, R. Increasing prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in Europe. **Euro Surveill**, v.13, n.47, Nov 20, 2008.

CORKILL, J. E. et al. A novel cefotaxime-hydrolysing beta-lactamase, identified in *Klebsiella pneumoniae* isolates from a Brazilian hospital. **J Antimicrob Chemothe.** v. 47, n. 4, p. 463-465, 2001.

Clinical Laboratory Standards Institute – CLSI (Wayne, PA, USA). **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing** – Twenty-First Informational Supplement M100-S21. Clinical Laboratory Standards Institute, v. 31, n. 1, 2011.

DOLEJSKA, M. et al. CTX-M-15- producing *Escherichia coli* clone B2-O25b-ST131 and *Klebsiella* spp. isolates in municipal wastewater treatment plant effluents. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, p. 2784-2790, 2011.

DONALDSON, S. C. et al. Molecular epidemiology of ceftiofur-resistant *Escherichia coli* isolates from dairy calves. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, p. 3940-3948, 2006.

EISEL, W. G.; LINTON, R. H.; MURIANA, P. M. A survey of microbial levels for incoming raw beef, environmental sources, and ground beef in a red meat processing plant. **Food Microbiol**, v.14, p.273-282, 1997.

ELLINGTON, M. J. et al. Detection of *qnrA* among Enterobacteriaceae from South East England with extended spectrum and high level AmpC β -lactamases. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 60, p. 1178, 2007.

ENSOR, V. M. et al. occurrence, prevalence and genetic environment of CTX-M beta-lactamases in Enterobacteriaceae from Indian hospitals. **J. Antimicrob Chemother.** v. 58, n. 6, p. 1260-3, 2006.

EUCAST - The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (Basel, Suíça). **Breakpoints tables for interpretation of MICs and zone diameters**. EUCAST, v. 2, 2011. Disponível em: <http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/>. Acesso em: 29 mai. 2012.

FONZÉ, E. et al. TEM1 beta-lactamase structure solved by molecular replacement and refined structure of the S235A mutant. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v.51, n.Pt 5, Sep 1, p.682-94. 1995.

FLECKENSTEIN, J. M. et al. Infectious agents of food and water borne illnesses. **The American Journal of the Medical Sciences**, v. 340, n. 3, p. 238-246, 2010.

FLUIT, A. C.; SCHMITZ, F. J. Resistance integrons and super-integrons. **Clin Microbiol Infect**, v.10, n.4, p.272-288, 2004.

GARCIA, D. O. et al. Multiclonal outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-2 and novel variant CTX-M-59 in a neonatal intensive care unit in Brazil. **Antimicrob Agents Chemother**. v. 52, n. 5, p. 1790-3, 2008.

GILL, C. O.; BADONI, M.; JONES, T. Hygienic effects of trimming and washing operations in a beef-carcass-dressing process. **J Food Protect**, v.59, v.6, p.666-669, 1996.

GISKE, C.G. et al. Redefining extended-spectrum β -lactamases: balancing science and clinical need. **J Antimicrob Chemother**, v.63, p.1-4, 2009.

GUPTA, S. K. et al. Outbreak of *Salmonella* Braenderup infections associated with Roma tomatoes, northeastern United States, 2004: a useful method for subtyping exposures in field investigations. **Epidemiology and Infection**, v. 135, n. 7, p. 1165-1173, 2007.

HAEGGMAN, S. et al. Diversity and evolution of the class A chromosomal beta-lactamase gene in *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 7, p. 2400-2408, 2004.

HATA, M. et al. Cloning of a novel gene for quinolone resistance from transferable plasmid in *Shigella flexneri* 2b. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, p. 801-803, 2005.

HERITAGE, J. et al. Evolution and spread of SHV expended-spectrum β -lactamase in Gram-negative bacteria. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 44, p. 309-318, 1999.

HERNÁNDEZ, J. et al. Human associated extended spectrum β -lactamase in the Antarctic. **Appl Environ Microbiol**, 2012.

HO, P. L. et al. Community emergence of CTX-M type extended spectrum β -lactamase among urinary *Escherichia coli* from women. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 60, p. 140-144, 2007.

HORNISH, R.E.; KOTARSKY, S.F. Cephalosporins in veterinary medicine ceftiofur use in food animals. **Current Topicals Medical Chemistry**. v2, p.1558 – 1564, 2002.

HULETSKY, A.; KNOX, J.R.; LEVESQUE, R. C. Role of Ser-238 and Lys-240 in the hydrolysis of third-generation cephalosporins by SHV-type beta-lactamases probed by site-directed mutagenesis and three-dimensional modeling. **J Biol Chem**, v.268, n.5, Feb 15, p.3690-7, 1993.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm?1>>. Acesso em: 11 mai. 2013.

ITO, K. et al. In vitro antibacterial activity of AM-715, a new nalidixic acid analog. **Antimicrobial Agent and Chemotherapy**, v. 17, p. 103-108, 1980.

JACOBY, G. A. AmpC β -lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, n. 1, p. 161-182, 2009.

JACOBY, G. A; BUSH K. β -Lactamase Nomenclature. **J Clin Microbiol**. v.43, n.12, p.6220, 2005.

JACOBY G. A.; MUÑOZ-PRICE, L. S. The new β -lactamases. **New England Journal of Medicine**, v. 352, p. 380-391, 2005.

JACOBY, G. A.; TRAN, J. Sequence of the MIR-1 β -lactamase gene. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, p. 1759-1760, 1999.

JARLIER, V. et al. Beta-lactamase producers and other bacteria: which ones to take into consideration and when? The concept of beta-lactamase inhibitor. **Presse Med**, v.27 Suppl 4, Sep, p.17-8. 1998.

JAY, J. M. (Ed.). Modern Food Microbiology. 6th ed. **Aspen Publishers**, USA, pp.1-53, 170 e 363-420, 2000.

KNOTHE, H. et al. Transferable resistance to cefotaxime, ceftazidime, cefamandole and cefturoxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. **Infection**, v. 11, n. 6, p. 315-317, 1983.

KRUSE, H.; SORUM, H. Transfer of multiple drug resistance plasmids between bacteria of diverse origins in natural microenvironments. **Appl Environ Microbiol**, v.60, n.11, p. 4015-4021, 1994.

LAVILLA, S. et al. Prevalence of *qnr* genes among extended spectrum β -lactamase producing enterobacterial isolates in Barcelona, Spain. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 61, p. 291-295, 2008.

LESCHER, G. Y. et al. 1,8 Naphthyridine derivatives: a new class of chemotherapy agents. **Journal of Medicinal and Pharmaceutical Chemistry**, v.5, p. 1063-1068, 1962.

LEVINSON, W.; JAWETZ, E. Microbiologia Médica e Imunologia, 7th ed. Editora Artmed, Porto Alegre. p. 140. 2005.

LI, X. Z. et al. β -Lactam resistance and β -lactamases in bacteria of animal origin. **Vet Microbio**, 121, p. 197–214, 2007.

Li, X. Z.; Nikaido, H. Efflux-mediated drug resistance in bacteria: an update. **Drugs**, v. 69, p. 1555-1623, 2009.

LINDQUIST, S. et al. Signalling proteins in enterobacterial Amp C β -lactamase regulation. **Molecular Microbiology**, v. 3, n. 8, p. 1091-1102, 1989.

LIVERMORE, D. M. Beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. **Clin Microbiol Rev**, v.8, n.4, Oct, p.557-84, 1995.

LIVERMORE, D. M.; WOODFORD, N. The beta-lactamase threat in Enterobacteriaceae, Pseudomonas and Acinetobacter. **Trends Microbiol**, v.14, n.9, Sep, p.413-20, 2006.

LUPO, A.; COYNE, S.; BERENDONK, T. U.; Origin and evolution of antibiotic resistance: the common mechanisms of emergence and spread in water bodies. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, p. 1-13, 2012.

MADIGAN, M. T. et al. **Brock: biologia de micro-organismos**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

MARTINEZ-MARTINEZ, L.; PASCUAL, A.; JACOBY, G. A. Quinolone resistance from a transferable plasmid. **Lancet**, v. 351, p. 797-799, 1998.

MARTÍNEZ, J. L.; BAQUERO, F.; ANDERSSON, D. I. Predicting antibiotic resistance. **Nat Rev Microbiol**, v.5, n.12, Dec, p.958-65, 2007.

MEDEIROS, A. A.; CRELLIN, J. Comparative susceptibility of clinical isolates producing extended-spectrum beta-lactamases to ceftibuten: effect of a large inoculum. **Pediatr Infect Dis J**, v.16, p.S49-S55, 1997.

MENDES, C. et al. *Klebsiella pneumoniae* with multiple antimicrobial resistance. **Braz J Infect Dis**. v. 8, n. 1, p. 109-111, 2004.

MEUNIER, D. et al. Plasmid-borne florfenicol and ceftiofur resistance encoded by the floR and bla_{CMY-2} genes in *Escherichia coli* isolates from diseased cattle in France. **Journal of Medical Microbiology**, 59, p. 467- 471, 2010.

MINARINI, L. A. R.; GALES, A. C.; DARINI, A. L. C. First report of a plasmid-mediated resistance to quinolone and cefotaxime in *Enterobacter cloacae* isolated from an outpatient in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, p. -402, 2007.

MINARINI, L. A. et al. Clonal transmission of ESBL- producing *Klebsiella* spp. at a university hospital in Brazil. **Curr Microbiol**, v. 56, n. 6, p. 587-91, 2008.

MURRAY, P. R. et al. **Microbiologia Médica**. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

NAAS, T.; POIREL, L.; NORDMANN, P. Minor extended-spectrum β -lactamases. **Clinical Microbiology and Infections**, v. 14, suppl. 1, p. 42-52, 2008.

NCBI (National Center for Biotechnology Information). **Basic Local Alignment Search Tool**. Bethesda, 2012. Disponível em: <<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>. Acesso em: 18 fev. 2013.

NETO, M. L. F.; FERREIRA, A. P. Perspectivas da sustentabilidade ambiental diante da contaminação química da água: desafios normativos. **Rev. Gestão Integr. Saúde Trab. Meio Ambiente**, v.2, n.4, p.1-15, 2007.

PATERSON, D. L.; BONOMMO, R. A. **Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update.** Clin Microbiol Rev, v.18, n.4, Oct, p.657-86, 2005.

PATERSON, D. L. et al. Epidemiology of ciprofloxacin resistance and its relationship to extended spectrum β -lactamase production in *Klebsiella pneumoniae* isolates causing bacteremia. **Clinical Infectious Diseases**, v. 30, p. 473-478, 2000.

PEREIRA, A. S. et al. Evaluation of the susceptibility profiles, genetic similarity and presence of *qnr* gene in *Escherichia coli* resistant to ciprofloxacin isolated in Brazilian hospitals. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 11, p. 40-43, 2007.

PÉREZ-PÉREZ, F. J.; HANSON, N. D. Detection of plasmid-mediated Amp C β -lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 6, p. 2153-2162, 2002.

PITOUT, J. D. D.; HOSSAIN, A.; HANSON, N. D. Phenotypic and molecular detection of CTX-M- β -lactamases produced by *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 12, p. 5715-5721, 2004.

PITOUT, J. D.; LAUPLAND, K. B. Extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. **Lancet Infect Dis**, v. 8, p. 159–66, 2008.

POIREL, L. et al. CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamase that hydrolyzes ceftazidime through a single amino acid substitution in the omega loop. **Antimicrob Agents Chemother**, v.45, n.12, p. 3355-3361, 2001.

PREFEITURA DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO. Secretaria Municipal de Planejamento Estratégico, Ciência, Tecnologia e Inovação. **Conjuntura Econômica 2012**. Indicadores de Infra-estrutura. 27. ed. São José do Rio Preto, 2012. Disponível em: <http://www.riopreto.sp.gov.br/PortalGOV/do/subportais_Show?c=60202>. Acesso em: 02 nov. 2012.

PRUDEN, A. et al. Antibiotic resistance genes as emerging contaminants: studies in northern Colorado. **Environ Sci Technol**, v.40, n.23, Dec 1, p.7445-50, 2006.

PRUDEN, A.; ARABI, M.; STORTEBOOM, H. N.; Correlation between upstream human activities and riverine antibiotic resistance genes. **Environmental Science & Technology**, p. A-I, 2012.

RASHEED, J. K. et al. Evolution of extend-spectrum β -lactam resistance (SHV-8) in a strain of *Escherichia coli* during multiple episodes of bacteremia. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 41, n. 3, p. 647-653, 1997.

ROBICSEK, A. et al. *qnr* prevalence in ceftazidime resistant *Enterobacteriaceae* isolates from the United States. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, p. 2872-2874, 2006.

RODRIGUEZ-MARTINES, J. M. et al. Detection of plasmid mediated quinolone resistance determinant *qnr* among clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* producing AmpC type β -lactamase. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, p. 703-706, 2003.

ROMERO, L. et al. Long-term study of the frequency of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates producing extended-spectrum β -lactamases. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 11, n. 8, p. 625-631, 2005.

RUIZ, J. Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, p. 1109-1117, 2003.

RYSZ, M.; ALVAREZ, P. J. Amplification and attenuation of tetracycline resistance in soil bacteria: aquifer column experiments. **Water Res**, v.38, n.17, Oct, p.3705-12, 2004.

SABY, S.; LEROY, P.; BLOCK, J. C. *Escherichia coli* resistance to chlorine and glutathione synthesis in response to oxygenation and starvation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 5600-5603, 1999.

SÁNCHEZ-VARGAS, F. M.; ABU-EL-HAJJA, M. A.; GÓMEZ-DUARTE, O. G. *Salmonella* infections: an update on epidemiology, management, and prevention. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 9, p. 263-277, 2011.

SANTANA, A. S. et al. Qualidade microbiológica de águas minerais. **Cienc Tecnol Aliment**, 23 (supl), p. 190- 194, 2003.

SETTI, A. A. et al. **Introdução ao gerenciamento de recursos hídricos**. 2. ed. Brasília: Agência Nacional de Energia Elétrica, Superintendência de Estudos e Informações Hidrológicas, 2000.

SHAKOOR, S.; ZAIDI, A. K. M.; HASAN, R. Tropical bacterial gastrointestinal infections. **Infect Dis Clin N Am**, v. 26, p. 437-453, 2012.

SHIMIZU-IBUKA, A. et al. Structure of the plasmid mediated class C β -lactamase ACT-1. **Acta Crystallographica**, p. 334-337, 2008.

SMET, A. et al. Broad-spectrum β -lactamases among *Enterobacteriaceae* of animal origin: molecular aspects, mobility and impact on public health. **FEMS Microbiology Reviews**, [Epub ahead of print], p. 1-22, 2009.

SILVA, N. et al. **Manual de métodos de análise microbiológica da água**. 1. ed. São Paulo: Varela, 2005.

SILVA, N. et al. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. 4. ed. São Paulo: Varela, 2010.

SIROT, J.; LABIA, R.; THABAUT, A. Klebsiella pneumoniae strains more resistant to ceftazidime than to other third-generation cephalosporins. **J Antimicrob Chemother**, v. 20, n.4, Oct, p.611-2, 1987.

SISTEMA AUTÔNOMO DE ÁGUA ESGOTO (SEMAE). Prefeitura de São José do Rio Preto. **Regulamento dos Serviços Prestados**. São José do Rio Preto, 2006. Disponível em: <http://www.riopreto.sp.gov.br/PortalGOV/do/subportais_Show?c=3927>. Acesso em: 29 set. 2012.

SOSTARICH, A. M. et al. Impact of multiresistance of Gram-negative bacteria in bloodstream infection on mortality rates and length of stay. **Infect**, v.36, n.1, p.31-35, 2008.

SPANGLER, S. K.; JACOBS, M. R.; APPELBAUM, P. C. Susceptibility of anaerobic bacteria to trovafloxacin : comparison with other quinolones and non-quinolone antibiotics. **Infectious Diseases in Clinical Practice**, v. 5, p. 101-109, 1996.

STURENBURG, E.; MACK, D.; Extended-spectrum beta-lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory, therapy, and infection control. **J Infect**, Nov; 47(4): 273-95, 2003.

SU, L. et al. *In vivo* acquisition of ceftriaxone resistance in *Salmonella enterica* serotype Anatum. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, p. 563-567, 2003.

TALBOT, G. H. et al. Bad bugs need drugs: an update on the development pipeline from the Antimicrobial Availability Task Force of the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 42, p. 657-668, 2006.

TOLLENTINO, F. M. et al. High prevalence of *bla*_{CTX-M} extended spectrum beta-lactamase genes in *Klebsiella pneumoniae* isolates from a tertiary care hospital: first report of *bla*_{SHV-12}, *bla*_{SHV-31}, *bla*_{SHV-38}, and *bla*_{CTX-M-15} in Brazil. **Microbial Drug Resistance**, v. 17, n. 1, p. 7-16, 2011.

VILA, J. et al. Association between double mutation in *gyrA* of ciprofloxacin resistant clinical isolates of *Escherichia coli* and minimal inhibitory concentration. **Antimicrobial agents and Chemotherapy**, v. 38, p. 2477-2479, 1994.

World Health Organization – WHO (Genebra, Suíça). **WHO Policy Perspectives on Medicine: Containing antimicrobial resistance**. Genebra, 2001. 6p. Disponível em: <<http://apps.who.int/medicinedocs/en/d/Js7920e/>>. Acesso em: 26 set. 2012.

World Health Organization – WHO (Genebra, Suíça). **The evolving threat of antimicrobial resistance: options for action**, 2012. 120p. Disponível em: <<http://www.who.int/patientsafety/implementation/amr/publication/en/>>. Acesso em: 26 out. 2012.

WU, J. J. et al. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants QnrA, QnrB and QnrS among clinical isolates of *Enterobacter cloacae* in a Taiwanese Hospital. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, p. 1123-1127, 2007.

Autorizo a reprodução xerográfica para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, 10/06/2013

Luciângela de Oliveira Pereira