

João Fernando Gonçalves Ferreira

RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS E GENOTIPAGEM DE
AMOSTRAS DE *Escherichia coli* ISOLADAS DE ÁGUA PARA
CONSUMO DA MESORREGIÃO DE BELO HORIZONTE E DETECÇÃO
DIRETA DE *INTEGRONS* NAS ÁGUAS

Belo Horizonte

2018

João Fernando Gonçalves Ferreira

RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS E GENOTIPAGEM DE
AMOSTRAS DE *Escherichia coli* ISOLADAS DE ÁGUA PARA
CONSUMO DA MESORREGIÃO DE BELO HORIZONTE E DETECÇÃO
DIRETA DE *INTEGRONS* NAS ÁGUAS

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais para a obtenção do título de Doutor.

Área de concentração: Ciências Biológicas

Orientadora: Paula Prazeres Magalhães - Universidade Federal de Minas Gerais

Coorientadores: Luiz de Macêdo Farias - Universidade Federal de Minas Gerais

Maria Célia da Silva Lanna - Universidade Federal de Ouro Preto

Belo Horizonte

Instituto de Ciências Biológicas da UFMG

2018

APOIO FINANCEIRO

CNPq

FAPEMIG

CAPES

PRPq/UFMG

AGRADECIMENTOS

- A Deus, em primeiro lugar, por ter me permitido chegar até aqui sem perder as esperanças, mesmo nos momentos mais difíceis.
- 5 - Aos meus pais, Míriam e Maurício, e ao meu irmão Leandro, por todo o apoio que me dão e, principalmente, por me compreenderem durante as fases complicadas que tive ao longo destes quatro anos.
- À profa. Paula, minha orientadora, que certamente teve papel fundamental para que estes meus quatro anos de Doutorado fossem agradáveis e para que hoje eu possa dizer que sim,
10 valeu a pena ter vivido esta experiência profissional e de vida. Quero agradecer por toda a paciência, respeito e, principalmente, dedicação que teve comigo durante a realização deste nosso projeto e também por todo apoio e dedicação que está tendo agora com o seguimento da minha vida profissional.
- Ao prof. Luiz, meu coorientador no mestrado e agora no doutorado, que me recebeu de
15 braços abertos no laboratório, ainda como aluno de Iniciação Científica. Sinta-se parte deste e de todos os trabalhos realizados no laboratório, o qual você conduz com tanta dedicação e afincos. Saiba que o seu empenho em sempre manter o laboratório funcionando da melhor maneira possível é essencial para que nós alunos possamos desenvolver nossos projetos.
- 20 - À profa. Maria Célia, minha coorientadora, e à Mariana por toda a ajuda e colaboração prestadas, sem vocês esta tese não existiria, e por terem me recebido e acolhido em Ouro Preto.
- À minha “filha” Deborah que me ajudou na realização deste trabalho como aluna de Iniciação Científica. Muito obrigado pela ajuda, paciência e bons momentos que passamos
25 juntos no laboratório.
- Ao Leandro, à Marcela Menezes e à Débora que me ajudaram na realização dos testes de antibiograma. Muito obrigado pelas horas de fluxo e pela companhia.
- À Anna Gabi pela ajuda na realização da PCR em Tempo Real, pela paciência em me ensinar e pela agradável companhia durante as coletas de água em Ouro Preto.

- À Carol pela ajuda durante as coletas de água em Ouro Preto e por ter feito daqueles, momentos muito mais divertidos e agradáveis.

- À Nati que me ajudou com a confirmação da identificação de algumas amostras bacterianas, durante um momento em que eu não o poderia fazer.

5 - À Pati Oliveira por todo o auxílio com protocolos, dúvidas nas reações de PCR e por ser sempre tão disponível em ajudar.

- À Jaque, ao Jamil e à Mari Vaz pelos ótimos momentos de descontração que foram essenciais para manter o equilíbrio. Obrigado meus companheiros de final de semana.

10 - À toda família MOA por terem proporcionado quatros anos de muito respeito, colaboração, e claro, muitos bons momentos dentro e fora do Laboratório. Desejo aos atuais alunos que tenham, e espero que aqueles que já se despediram tenham tido, uma experiência no MOA tão boa quanto a minha. Um grande abraço a todos.

15

20

25

30

RESUMO

A baixa qualidade microbiológica da água destinada ao consumo humano está associada a uma taxa de mortalidade de 2,9 milhões de pessoas por ano. Um importante agente de doença diarreica de veiculação hídrica é a espécie *Escherichia coli*, a qual pode apresentar um amplo e diversificado perfil de suscetibilidade a antimicrobianos. Assim, o ambiente aquático pode atuar como uma via de disseminação de microrganismos resistentes entre populações humanas. Considerando a relevância do tema, o presente estudo teve como objetivo investigar aspectos relacionados à resistência a antimicrobianos e genotipar amostras de *E. coli* recuperadas de água para consumo da mesorregião de Belo Horizonte, além de pesquisar *integrons* diretamente em fontes de água do município de Ouro Preto. Um total de 423 amostras de *E. coli* foram submetidas à avaliação do perfil de suscetibilidade a antimicrobianos, pelo método de disco difusão. Os dados demonstraram que 146 amostras apresentaram resistência a pelo menos um antimicrobiano, sendo 37 delas multirresistentes. A detecção de *integrons* e cassetes gênicos foi realizada por reação de polimerização em cadeia e 10 amostras apresentaram resultados positivos para a presença de *integrons* de classe 1 e *integrons* de classe 1 clínicos, sendo que duas possuíam cassetes gênicos associados. *Integrons* de classe 2 não foram detectados. A genotipagem foi realizada por meio de sequenciamento e análise da região hipervariável do gene *rpoB*. As 45 amostras avaliadas foram divididas em três grupamentos genéticos. A pesquisa de *integrons* de classe 1 diretamente em águas para consumo por PCR em tempo real mostrou que três das 14 amostras apresentaram quantificação do gene *intI1* acima do limite mínimo de detecção. Assim, pode-se concluir que parte destas águas utilizadas para o consumo humano está atuando na veiculação de diferentes variantes de *E. coli*, assim como na disseminação de genes de resistência e elementos genéticos associados à expressão de resistência a antimicrobianos. Deste modo, a população a qual se destina estas águas está exposta os potenciais riscos associados ao consumo de águas não potáveis.

Palavras-chave: *Escherichia coli*, resistência a antimicrobianos, *integrons*, cassetes gênicos, água para consumo.

ABSTRACT

The low microbiological quality of water is associated with a mortality rate of 2,9 million people per year. Among the agents of water-borne diarrheal disease *Escherichia coli* should be highlighted. The organism presents a heterogeneous drug resistance profile. Thus, aquatic environments may act as a route for dissemination of antimicrobial resistant microorganisms between human populations. This study targeted the genotyping and the investigation of aspects related to antimicrobial drug resistance in *E. coli* samples obtained from drinking water from the mesoregion of Belo Horizonte and also aimed to search for integrons directly from water sources in the municipality of Ouro Preto. A total of 423 *E. coli* isolates were used in this study. Evaluation of the antimicrobial susceptibility profile was performed by disk diffusion method and indicated that 146 samples showed resistance to at least one antimicrobial and 37 showed to be multiresistant. PCR was performed to search for integrons and gene cassettes and 10 isolates presented positive results for the presence of class 1 integrons and clinical class 1 integrons, two of which have associated gene cassettes. Integrons class 2 were not observed. Sequencing of the hypervariable region of the *rpoB* gene allowed the genotyping of samples and three genetic groups were differentiated. Real-time PCR was employed in order to investigate the occurrence of class 1 *integrons* in drinking water. Fourteen samples were tested and three presented *intI1* quantification results above the minimum detection limit. Thus, it can be concluded that some of these waters used for human consumption are acting in the transmission of different variants of *E. coli*, as well as in the dissemination of resistance genes and genetic elements associated with the expression of antimicrobial resistance. Consequently people that drink these waters are exposed to the potential risks associated with the consumption of non-potable water.

Keywords: *Escherichia coli*, antimicrobial resistance, integrons, gene cassettes, drinking water.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

QUADRO 1	Padrão microbiológico da água para consumo humano	14
QUADRO 2	Principais doenças bacterianas adquiridas por ingestão de água contaminada	15
QUADRO 3	Principais características dos patótipos diarréiogênicos de <i>Escherichia coli</i>	20
QUADRO 4	Mecanismos de resistência a antimicrobianos presentes em <i>Escherichia coli</i> e suas caracterizações	22
QUADRO 5	Principais características dos <i>integrons</i> das classes 1 e 2.	28
QUADRO 6	Antimicrobianos utilizados na avaliação do perfil de suscetibilidade de <i>Escherichia coli</i>	37
QUADRO 7	Iniciadores para pesquisa de <i>integrons</i> e cassetes gênicos nas amostras de <i>Escherichia coli</i>	40
QUADRO 8	Condições de amplificação para pesquisa de <i>integrons</i> e cassetes gênicos nas amostras de <i>Escherichia coli</i> .	41
QUADRO 9	Localização das fontes de água coletadas e suas características	44
QUADRO 10	Iniciadores para pesquisa de <i>integrons</i> nas amostras de água do município de Ouro Preto	46
QUADRO 11	Local e data da coleta das amostras de água contaminada com <i>Escherichia coli</i> em Ouro Preto	50
QUADRO 12	Local e data da coleta das amostras de água contaminada com <i>Escherichia coli</i> em Itabirito	51
QUADRO 13	Local e data da coleta das amostras de água contaminada com <i>Escherichia coli</i> em Mariana	52
QUADRO 14	Perfil de suscetibilidade das amostras de <i>Escherichia coli</i> multirresistentes a antimicrobianos	60
QUADRO 15	Amostras de <i>Escherichia coli</i> portadoras de <i>integron</i> de classe 1 e de sua variante clínica	63
FIGURA 1	Organização geral do <i>integron</i> e mecanismo de recombinação de cassetes gênicos.	25
FIGURA 2	A recente origem evolucionária do <i>integron</i> clínico de classe 1	27
FIGURA 3	Esquema de nomeação das amostras bacterianas identificadas	

	como <i>E. coli</i>	35
FIGURA 4	Eletroforese dos <i>amplicons</i> correspondentes a <i>integron</i> de classe 1, <i>integron</i> clínico de classe 1 e cassetes gênicos de amostras de <i>Escherichia coli</i>	64
FIGURA 5	Distribuição das 29 amostras de <i>Escherichia coli</i> no município de Ouro Preto.	71
FIGURA 6	Distribuição das 13 amostras de <i>Escherichia coli</i> no município de Itabirito	72
GRÁFICO 1	Frequência de amostras bacterianas sensíveis, intermediárias e resistentes considerando todos os antimicrobianos testados	55
GRÁFICO 2	Perfil de suscetibilidade a antimicrobianos das amostras de <i>Escherichia coli</i> recuperadas das águas para consumo	57
GRÁFICO 3	Log do número de cópias do gene <i>intI1</i> por litro de água filtrado	74

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Detecção de <i>Escherichia coli</i> nas amostras de água para consumo dos municípios de Ouro Preto, Itabirito e Mariana.	48
TABELA 2	Comparação dos perfis de suscetibilidade a antimicrobianos das amostras de <i>Escherichia coli</i> por município.	58

5

10

15

20

25

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	Padrões microbiológicos de potabilidade de água para consumo (Portaria Nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011)	12
1.2	Contaminação microbiológica e química de água para consumo e os riscos potenciais à saúde humana	14
1.3	Captação e fornecimento de água para consumo humano na mesorregião de Belo Horizonte: municípios de Ouro Preto, Mariana e Itabirito	16
1.4	Localização geográfica da mesorregião de Belo Horizonte: municípios de Ouro Preto, Mariana e Itabirito	17
1.5	<i>Escherichia coli</i>	18
1.6	<i>E. coli</i> e resistência a antimicrobianos	20
1.7	<i>Integrans</i>	24
1.8	Gene <i>rpoB</i> e suas aplicações filogenéticas	28
2	JUSTIFICATIVA	31
3	OBJETIVOS	32
3.1	Objetivo geral	32
3.2	Objetivos específicos	32
4	MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1	Avaliação do perfil de suscetibilidade a antimicrobianos e detecção da produção de β -lactamase de espectro estendido (ESBLs)	36
4.2	Extração de DNA das amostras de <i>E. coli</i>	38
4.2.1	Pesquisa de <i>integrans</i> e cassetes gênicos nas amostras de <i>E. coli</i>	39
4.3	Genotipagem de amostras de <i>E. coli</i>	42
4.4	Pesquisa de <i>integrans</i> diretamente das amostras de águas para consumo de Ouro Preto	43
4.4.1	Pontos de coleta e filtração das amostras de água	43
4.4.2	Extração de DNA total das amostras de água	44
4.4.3	Quantificação de <i>integrans</i> e rDNA 16S das amostras de água	45
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47

5.1	Avaliação do perfil de suscetibilidade a antimicrobianos e detecção da produção de β -lactamases de espectro estendido (ESBLs)	54
5.2	Pesquisa de <i>integrons</i> e cassetes gênicos	62
5.3	Genotipagem de amostras de <i>E. coli</i>	67
5.4	Pesquisa de <i>integrons</i> em amostras de água para consumo	73
6	SÍNTESE DOS RESULTADOS E CONCLUSÕES	78
	REFERÊNCIAS	80
	APÊNDICES	90
	ANEXOS	103

1 INTRODUÇÃO

1.1 PADRÕES MICROBIOLÓGICOS DE POTABILIDADE DE ÁGUA PARA CONSUMO (PORTARIA Nº 2.914, DE 12 DE DEZEMBRO DE 2011)

5 É considerada como água para consumo toda água potável destinada à ingestão, preparação e produção de alimentos e à higiene pessoal, independentemente da sua origem. Um conjunto de valores definidos como parâmetro de qualidade da água para consumo deve ser atingido para que a água seja qualificada como potável, incluindo a qualidade microbiológica (PORTARIA Nº 2.914, DE 12 DE DEZEMBRO DE 2011).

10 Para garantir que a água esteja apropriada ao consumo humano um conjunto de atividades é adotado de forma contínua, a fim de garantir a qualidade e a segurança da água caracterizando, assim, o controle de qualidade da água para o consumo, o qual é de responsabilidade das empresas de serviço de abastecimento, produtoras de água potável. Já a vigilância da qualidade da água para consumo compreende um conjunto de atividades
15 investigativas, que tem por objetivo identificar e avaliar o risco potencial à saúde associado ao uso desta água (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011). Esta, por sua vez, é de responsabilidade das Secretarias Municipais de Saúde, que a faz em quantidade e periodicidade orientadas pela Diretriz Nacional do Plano de Amostragem da Vigilância da Qualidade da Água para Consumo Humano (RAMOS, 2013).

20 Os métodos utilizados para o monitoramento da qualidade microbiológica da água para consumo humano visam à detecção e à enumeração dos indicadores fecais. O termo “indicador fecal” se refere a um determinado microrganismo ou grupo de microrganismos que evidencia a contaminação da água com matéria orgânica de origem fecal humana ou de outros animais (SAXENA *et al.*, 2015). A presença dos
25 enteropatógenos geralmente ocorre em concentrações muito baixas em águas ambientais, quando comparada à diversificada microbiota existente nesses ambientes. Além disso, estes microrganismos usualmente são observados de forma intermitente, de modo que outros grupos microbianos que também estão presentes nas fezes são empregados como indicadores da presença de microrganismos patogênicos (ROCHELLE-NEWALL *et al.*,
30 2015).

Os microrganismos tipicamente utilizados como indicadores são aqueles encontrados em concentrações elevadas nas fezes humanas, resistentes ao ambiente extraintestinal, encontrados em grandes quantidades e com chances mais elevadas de sobrevivência que os patógenos, além de serem detectados por técnicas rápidas, simples e baratas (ALLEN *et al.*, 2015). A legislação vigente no Brasil preconiza a pesquisa de coliformes totais e de *E. coli* para avaliar a qualidade microbiológica da água, sendo esta a única análise obrigatória de rotina, de modo que *E. coli* atua como o principal microrganismo indicador de contaminação fecal. Entretanto, a legislação recomenda a inclusão de monitoramento de vírus entéricos no ponto de captação de água proveniente de manancial superficial de abastecimento, com o objetivo de subsidiar estudos de avaliação de risco microbiológico (PORTARIA Nº 2.914, DE 12 DE DEZEMBRO DE 2011).

Segundo a legislação, a ausência de *E. coli*, em um volume de 100 mL de água, é exigida para que a mesma seja considerada potável (PORTARIA Nº 2.914, DE 12 DE DEZEMBRO DE 2011), uma vez que a presença de *E. coli* na água está associada à presença de microrganismos clinicamente relevantes e, conseqüentemente, a um risco aumentado de se contrair doenças diarréicas em geral (NAVAB-DANESHMAND *et al.*, 2018). Já os coliformes totais são utilizados como indicadores de eficiência do processo de tratamento da água e da integridade do sistema de distribuição (reservatório e rede), sendo tolerada a sua presença, em situações específicas, apenas nas águas que já passaram pelo sistema de distribuição (PORTARIA Nº 2.914, DE 12 DE DEZEMBRO DE 2011), como descrito no Quadro 1.

QUADRO 1 - Padrão microbiológico da água para consumo humano.

Tipo de água	Parâmetro	VMP⁽¹⁾
Água para consumo	<i>Escherichia coli</i> ⁽²⁾	Ausência em 100 mL
Água tratada: saída do tratamento	Coliformes totais ⁽³⁾	Ausência em 100 mL
Água tratada: sistema de distribuição	<i>Escherichia coli</i>	Ausência em 100 mL
	Coliformes totais ⁽⁴⁾ : Abastecimento < 20.000 habitantes	Presença em apenas uma amostra do mês
	Coliformes totais ⁽⁴⁾ : Abastecimento ≥ 20.000 habitantes	Ausência em 100 mL em 95% das amostras do mês

LEGENDA: ¹: Valor máximo permitido. ²: Indicador de contaminação fecal. ³: Indicador de eficiência de tratamento. ⁴: Indicador de integridade do sistema de distribuição (reservatório e rede).

FONTE: PORTARIA Nº 2.914, DE 12 DE DEZEMBRO DE 2011.

5

1.2 CONTAMINAÇÃO MICROBIOLÓGICA E QUÍMICA DE ÁGUA PARA CONSUMO E OS RISCOS POTENCIAIS À SAÚDE HUMANA

A água é essencial à vida, sendo o saneamento e a água potável reconhecidos universalmente como necessários à dignidade e ao desenvolvimento humano (MALHOTRA; SIDHU; DEVI, 2015). Sendo assim, o fornecimento seguro e acessível deste bem deve estar disponível a todos. Entretanto, o acesso à água potável, assim como ao saneamento básico, não é regra, principalmente nos países em desenvolvimento (CABRAL, 2010; GUZMÁN; NAVA; DÍAZ, 2015). No ano de 2015, foi estimado que, globalmente, 663 milhões de pessoas ainda usavam água de fontes não seguras e que 2,4 bilhões de pessoas ainda careciam de instalações sanitárias (BHAR *et al.*, 2017). Assim, a qualidade microbiológica da água para consumo constitui um importante problema mundial (RATAJCZAK *et al.*, 2010), sendo o acesso à água potável um dos objetivos de

desenvolvimento do milênio estabelecido pela Organização das Nações Unidas (ONU) (GUZMÁN; NAVA; DÍAZ, 2015).

5 A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que 2,9 milhões de pessoas morrem a cada ano por falta de acesso à água potável e ao saneamento básico, sendo que cerca de 90% das mortes ocorrem entre crianças menores de cinco anos. Entretanto, estima-se que 94 % dos casos de diarreia poderiam ser evitados pelo aumento da disponibilidade destes recursos, assim como pela promoção de ações de educação em saúde (GUZMÁN; NAVA; DÍAZ, 2015). As principais doenças bacterianas adquiridas pela ingestão de água contaminada estão listadas no Quadro 2.

10

QUADRO 2 - Principais doenças bacterianas adquiridas por ingestão de água contaminada.

Doença	Agente causador
Cólera	<i>Vibrio cholerae</i> sorotipos O1 e O139
Enterites causadas por vîbrios	Principalmente <i>Vibrio parahaemolyticus</i>
Febre tifoide e outras salmoneloses	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> sorovares Paratyphi, Typhi e Typhimurium
Doença bacilar ou shigelose	<i>Shigella sonnei</i> , <i>Shigella dysenteriae</i> , <i>Shigella flexneri</i> e <i>Shigella boydii</i>
Doença diarreica aguda	Patotipos diarreiogênicos de <i>Escherichia coli</i>

FONTE: CABRAL, 2010. (com modificações).

15

Em termos gerais, os maiores riscos à saúde humana estão associados com a ingestão de água contaminada com fezes humanas e/ou de outros animais. Descarga de águas residuais em águas doces é a principal fonte de microrganismos fecais, incluindo aqueles considerados patógenos. A contaminação de cursos d'água pode ocorrer, ainda, por

depósito direto de fezes e por escoamento superficial de água de terras agrícolas e de pastagens. Nas áreas urbanas, dominadas por cobertura impermeável, as águas das chuvas fluem por estas superfícies, mobilizando contaminantes até os cursos d'água (CABRAL, 2010).

5 Outro importante problema relacionado ao ambiente aquático é a contaminação por fármacos. Muitas destas substâncias são encontradas em estações de tratamento de esgoto e podem atingir os corpos d'água receptores (BILA; DEZOTTI, 2003). A presença de antimicrobianos no ambiente aquático ocorre através da deposição direta destes no esgoto, assim como pela excreção dos fármacos nas fezes e urina de seres humanos e
10 demais animais (KUMMERER, 2004). Os antimicrobianos usados como promotores de crescimento na produção de gado, na produção avícola, na aquicultura e na criação de porcos podem também contaminar águas subterrâneas e superficiais (BILA; DEZOTTI, 2003).

Os rios, os quais estão sujeitos a receber efluentes urbanos, estão entre as
15 principais fontes de água, direta ou indiretamente, para o consumo humano e animal, de modo que sua poluição, além de causar graves doenças, pode contribuir para a seleção de microrganismos resistentes a antimicrobianos (GOÑI-URRIZA *et al.*, 2000). A água não constitui só uma forma de disseminação destes organismos entre populações de seres humanos e outros animais, mas, também, a via pela qual genes de resistência são
20 introduzidos em ecossistemas naturais (BAQUERO; MARTINEZ; CANTON, 2008).

1.3 CAPTAÇÃO E FORNECIMENTO DE ÁGUA PARA CONSUMO HUMANO NA MESORREGIÃO DE BELO HORIZONTE: MUNICÍPIOS DE OURO PRETO, MARIANA E ITABIRITO

25 As principais fontes de captação de água para o abastecimento público nos municípios da mesorregião de Belo Horizonte, localizada no Quadrilátero Ferrífero (QF), são proveniente das bacias hidrográficas do alto rio das Velhas e do rio Doce. Nos municípios de Ouro Preto e Mariana, o abastecimento público também apresenta outras formas de captação de água superficial a partir das nascentes, muito comuns no relevo
30 montanhoso. As populações dessas localidades também coletam água de pequenas

nascentes nas encostas de morros, utilizando sistema particular de distribuição alternativa, principalmente nos distritos distantes da sede dos municípios (NEVES *et al.*, 2002).

No município de Ouro Preto, o Serviço Municipal de Água e Esgoto (SEMAE) conta com seis Estações de Tratamento de Água (ETAs) em operação - duas na sede municipal (Jardim Botânico e Itacolomi), duas no distrito de Cachoeira do Campo (Funil e Vila Alegre), uma no distrito de Amarantina e uma no distrito de Antônio Pereira. O SEMAE possui, ainda, 89 reservatórios dispersos pelo município, sendo 35 na área urbana e 54 nos distritos (<http://semaeop.mg.gov.br>).

No município de Mariana, o Serviço Autônomo de Água e Esgoto (SAAE) foi criado no ano de 2005. O sistema de abastecimento conta com nove pontos de captação de água (adutoras de água bruta), quatro estações de tratamento e 24 reservatórios de distribuição. Possui, ainda, 10 estações elevatórias, quatro poços artesianos e uma vasta rede de distribuição. O tratamento convencional da água é feito em quatro Estações de Tratamento de Água (Sul, Santa Rita de Cássia, Mata do Seminário e Matadouro). Em outros pontos de captação, a água passa apenas pelo processo de cloração. Atualmente, o abastecimento de água atende a 98% da população (<http://www.saaemariana.mg.gov.br>).

No município de Itabirito, o Sistema de Abastecimento conta com três pontos de captação de água (Córrego Seco, Bação e Barraginha) e todo o tratamento da água se dá na Estação de Tratamento de Água (ETA), que realiza o tratamento convencional das águas. Fora da sede do município, outras fontes são utilizadas, como o Córrego do Tijuco, além de poços artesianos. Estas águas chegam através de tubulações aos reservatórios, onde passam pelo processo de cloração. O SAAE também conta com o fornecimento de água para o Distrito Industrial, feita pela Unidade de Tratamento de Água (UTA), que foi inaugurada em 2015. Atualmente, toda a água que abastece a UTA é captada em um único poço tubular profundo (www.saaeita.mg.gov.br).

1.4 LOCALIZAÇÃO GEOGRÁFICA DA MESORREGIÃO DE BELO HORIZONTE: MUNICÍPIOS DE OURO PRETO, MARIANA E ITABIRITO

Os municípios de Ouro Preto, Mariana e Itabirito encontram-se na porção sudeste do Quadrilátero Ferrífero, em Minas Gerais. Ouro Preto está situado a 1.061 m de altitude, tem sua localização determinada pelas coordenadas geográficas 20°23'13'' S e

43°30'25'' W e apresenta área de 1.247 km². Mariana localiza-se a 20°22'40'' S e 43°24'58'' W, a 712 m de altitude e apresenta área de 1.196,7 km². Itabirito localiza-se a 20°15'12'' S e 43°48'05'' W, a uma altitude de 901 m e possui área de 546,6 km²(www.geografos.com.br).

5

1.5 *Escherichia coli*

A espécie *E. coli* foi descoberta em 1885, pelo pediatra alemão Theodor Escherich. O microrganismo foi inicialmente denominado *Bacillus coli communis*, considerado uma variante não patogênica do bacilo da febre tifoide. O nome *E. coli* foi
10 proposto em 1919 e aceito pelo Comitê Internacional de Microbiologia apenas em 1953 (SPECIAL FEATURE: *Escherichia coli*, 1985).

E. coli é um bastonete Gram negativo, anaeróbio facultativo, componente da família *Enterobacteriaceae*, que coloniza a mucosa intestinal de seres humanos e outros animais horas depois do nascimento (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). É a espécie
15 anaeróbia facultativa mais comumente encontrada no intestino do ser humano (BLEIBTREU *et al.*, 2013; DALLAGASSA *et al.*, 2014), com uma abundância de 10⁸ a 10⁹ UFC por grama de fezes (BLEIBTREU *et al.*, 2013).

A maioria das linhagens de *E. coli* reside inofensivamente no lúmen do intestino humano e, como apresenta habilidades de patogenicidade limitadas, a princípio,
20 não estão envolvidas na etiopatogenia de doenças em indivíduos previamente saudáveis. Entretanto, existem vários patotipos associados, com frequência, ao desenvolvimento de doenças em seres humanos (DALLAGASSA *et al.*, 2014). Segundo CROXEN e FINLAY (2010), é necessário à bactéria adquirir uma combinação de elementos genéticos móveis para se tornar um agente patogênico altamente adaptado, capaz de causar uma variedade de
25 doenças, tais como enterite e infecções extraintestinais, entre elas, infecção do trato urinário, do sangue e do sistema nervoso central.

E. coli apresenta um grau significativo de heterogeneidade intraespecífica e uma substancial diversidade genética e metabólica (TOUCHON *et al.*, 2009; DALLAGASSA *et al.*, 2014). O genoma da bactéria exhibe nível elevado de plasticidade, ou
30 seja, contém diversos segmentos que foram adquiridos de diferentes espécies. Esta conclusão é baseada na comparação de linhagem de *E. coli* “não patogênica” (K12) com

amostras de diferentes laboratórios (LIMA; FONTELES, 2014). Com base nos segmentos genéticos que codificam diferentes fatores de patogenicidade e nos mecanismos pelos quais causam doença, *E. coli* apresenta diversas variantes patogênicas que podem ser associadas com doenças que acometem seres humanos (LIMA; FONTELES, 2014; 5 FRATAMICO *et al.*, 2016).

Os patotipos de *E. coli* são classificados como diarreio gênicos (DEC) e extraintestinais (ExPEC). *E. coli* causadora de meningite neonatal (NMEC) e *E. coli* uropatogênica (UPEC), a principal causa de infecção urinária em seres humanos, são os patotipos causadores de doenças infecciosas extraintestinais mais bem estudados 10 (CROXEN; FINLAY, 2010; DALLAGASSA *et al.*, 2014; FRATAMICO *et al.*, 2016).

Sete patotipos diarreio gênicos de *E. coli* estão bem definidos: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), subdividida em amostras típicas e atípicas, *E. coli* produtora de toxina shiga/*E. coli* enterohemorrágica (STEC/EHEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* difusamente aderente 15 (DAEC) (CROXEN; FINLAY, 2010; DALLAGASSA *et al.*, 2014; FRATAMICO *et al.*, 2016) e *E. coli* invasiva aderente (AIEC). Além destes patotipos já bem caracterizados, há também um patotipo híbrido, mais recentemente descrito, *E. coli* enteroagregativa hemorrágica (EAHEC), que carrega genes de virulência associados a STEC e EAEC (FRATAMICO *et al.*, 2016). As principais habilidades de patogenicidade do grupo 20 diarreio gênico de *E. coli* são mostradas no Quadro 3.

QUADRO 3 - Principais características dos patotipos diarreio gênicos de *Escherichia coli*.

Patotipo	Principais fatores de virulência	Doença
EPEC	Intimina, <i>Bundle forming pili</i> (BFP), Proteínas efetoras e Sistema secretor do tipo 3 (SST3)	Diarreia aquosa (Diarreia infantil)
STEC¹ EHEC²	Intimina ^{1,2} , Toxina shiga (Stx) ^{1,2} , Proteínas efetoras ² e Sistema secretor do tipo 3 (SST3) ²	Diarreia inflamatória e Síndrome Hemolítico-Urêmica
DAEC	Adesinas fimbriais (Dr), Adesinas afimbriais (Afa) e <i>Secreted autotransporter toxin</i> (Sat)	Diarreia aguda
EIEC	Enterotoxinas de <i>Shigella</i> (ShET 1 e 2) e Sistema secretor do tipo 3 (SST3)	Diarreia inflamatória (shigelose)
EAEC	Fimbria de aderência agregativa (AAF), Enterotoxina termoestável 1 (EAST1) e Enterotoxina de <i>Shigella</i> (ShET 1)	Diarreia mucoide (Diarreia do viajante e Diarreia infantil)
ETEC	Fatores de colonização (CF), Enterotoxina termolábil (LT), Enterotoxina termoestável (ST) e Citolisina A	Diarreia aquosa (Diarreia do viajante)
AIEC	<i>Pili</i> tipo 1 e Outras proteínas de membrana (OMPs)	Doença de Crohn

FONTE: CLEMENTS *et al.*, 2012; CONTE *et al.*, 2014; VERSTRAETE *et al.*, 2014. (com modificações).

1.6 *E. coli* E RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS

5 A resistência antimicrobiana tem sido reconhecida como um dos maiores problemas de saúde pública no mundo (DA SILVA; MENDONÇA, 2012), causando uma crise global com profundas consequências econômicas e na saúde (FLEECE *et al.*, 2018). As últimas décadas têm testemunhado o surgimento cada vez maior de resistência

antimicrobiana. O uso intensivo e, principalmente, indevido de antimicrobianos possui papel importante neste processo (DA SILVA; MENDONÇA, 2012).

As bactérias podem apresentar resistência inata ou adquirida a diversos antimicrobianos. A resistência se dá por vários mecanismos, como a presença de enzimas que inativam o antimicrobiano, a síntese de enzimas alternativas que não são inibidas pelo antimicrobiano, mutações no alvo do antimicrobiano que reduz a afinidade pelo mesmo, modificações pós-transcricionais ou pós-traducionais do alvo do antimicrobiano, redução da permeabilidade ao antimicrobiano ou efluxo ativo do mesmo (GIEDRAITIENÉ *et al.*, 2011, FLEECE *et al.*, 2018). Além desses, outros mecanismos ainda desconhecidos podem contribuir para esta resistência (GIEDRAITIENÉ *et al.*, 2011). Os mecanismos de resistência a antimicrobianos presentes em *E. coli* e suas caracterizações são apresentados no Quadro 4.

A resistência antimicrobiana entre *Enterobacteriaceae* é bastante comum e se tornou um importante problema de saúde pública (ZEIGHAMI *et al.*, 2014). As bactérias Gram negativas resistentes aos antimicrobianos são particularmente preocupantes em todo o mundo, devido às taxas elevadas de morbidade e mortalidade causadas pelas doenças às quais estão associadas. Dentre estes microrganismos, *E. coli* apresenta uma importância central, devido à alta frequência com a qual é recuperada como amostra clínica, a presença generalizada no intestino de seres humanos e outros animais e, ainda, pela complexidade dos mecanismos de resistência que apresenta (FLEECE *et al.*, 2018).

Uma proporção substancial de genes de resistência está localizada em plasmídeos conjugativos, transpósons, sequências de inserção e *integrans*. A aquisição de genes de resistência por transferência horizontal representa, atualmente, a causa principal de surgimento e disseminação de linhagens resistentes a múltiplos antimicrobianos (ZEIGHAMI *et al.*, 2014).

Linhagens indígenas de *E. coli* são residentes versáteis do trato intestinal e são desafiadas constantemente por pressões antimicrobianas durante o tempo de vida de seu hospedeiro. Como consequência, genes de resistência, originados de processos de recombinação ou mutação, têm sido incorporados ao genoma da bactéria. Assim, estas amostras residentes podem ser consideradas fonte importante destes marcadores, contribuindo para a emergência e propagação de resistência antimicrobiana (SZMOLKA; NAGY, 2013).

QUADRO 4 – Mecanismos de resistência a antimicrobianos presentes em *Escherichia coli* e suas caracterizações

Classe de antimicrobiano (Mecanismo de ação)	Mecanismo de resistência	Enzimas	Localização do gene envolvido
Aminoglicosídeos (Inibição da síntese proteica)	Modificação do alvo	16S metilase	Plasmídeo
	Modificação do ATM	Acetiltransferase, fosfotransferase e Nucleotidiltransferase	Plasmídeo
	Bomba de efluxo	-	Cromossomo
β-lactâmicos (Inibição da síntese da parede celular)	Diminuição de porinas	-	Cromossomo
	Modificação do ATM	β-lactamases classes A, B e D e Amp C	Plasmídeo
Quinolonas (Inibição da replicação de DNA)	Modificação do alvo	-	Cromossomo
	Modificação do ATM	Acetiltransferase	Plasmídeo
	Restrição ao alvo e bomba de efluxo	-	Plasmídeo
Inibidores da via do folato (Inibição da síntese de ácido fólico)	Modificação do alvo	Diidropteroato sintetase	Cromossomo
	Modificação do alvo	Diidrofolato redutase	Plasmídeo
Polimixinas (Ruptura da membrana celular)	Bomba de efluxo	-	Cromossomo
	Modificação do alvo	Fosfoetanolamina transferase	Plasmídeo
Macrolídeos (Inibição da síntese proteica)	Modificação do alvo	rRNA metilase	Plasmídeo
	Modificação do ATM	Esterases e fosforilases	Plasmídeo
	Bomba de efluxo	-	Plasmídeo

LEGENDA: ATM: Antimicrobiano.

FONTE: FLEECE *et al.*, 2018.

Muitos genes que codificam resistência antimicrobiana estão inseridos em plasmídeos conjugativos e em outros elementos genéticos móveis, que também podem carrear determinantes de patogenicidade, e podem ser selecionados por pressão seletiva, devido ao uso de antimicrobianos (DA SILVA; MENDONÇA, 2012). Deste modo, embora a associação genética entre as características de resistência e de patogenicidade seja pouco entendida, o uso inadequado de antimicrobianos pode estar selecionando não só microrganismos com diversificados perfis de suscetibilidade a antimicrobianos, como também microrganismos com conjuntos de fatores de patogenicidade diferenciados, como os patótipos de *E. coli* (SZMOLKA; NAGY, 2013)

Segundo revisão realizada por Fleece e colaboradores (2018), a resistência antimicrobiana entre amostras de *E. coli* recuperadas de ambientes clínicos aumentou significativamente em todo o mundo nas últimas décadas, observando-se taxas de resistência que variam por país e região do mundo. Em um estudo sobre sepse neonatal realizado em Delhi, na Índia, em 2016, a prevalência de amostras clínicas de *E. coli* produtoras de β -lactamase de espectro estendido (ESBL) foi de 47%. Dados do Estudo de Monitoramento de Tendências de Resistência Antimicrobiana (SMART) da região Ásia-Pacífico, de 2007, relatou taxas de 79% na Índia e 55% na China de infecção intra-abdominal com presença de *E. coli* produtora de β -lactamase. Taxas significativamente mais baixas na Austrália (8%) e nas Filipinas (17%) foram detectadas. Nos Estados Unidos, a prevalência de pielonefrite por *E. coli* produtora de β -lactamase variou de 3% a 12% de 2013 a 2014. Uma considerável variação regional também foi observada nas taxas de resistência às fluoroquinolonas de amostras de UPEC, variando de 2% na Grécia a quase 70% na Índia. A prevalência de resistência a outros antimicrobianos, como ampicilina e cotrimoxazol (trimetoprim e sulfametoxazol), também variou de acordo com a região.

A resistência antimicrobiana entre amostras de *E. coli* recuperadas de ambientes não clínicos é também um fator preocupante. Estudos têm apontado para o perfil de suscetibilidade diversificado destas amostras que são recuperadas de diversos ambientes, inclusive o aquático, apresentando taxas consideráveis de resistência a antimicrobianos de diversas classes (PEREIRA *et al.*, 2013; VARELA *et al.*, 2015; VAZ-MOREIRA *et al.*, 2015; SHARMA *et al.*, 2017; CHO *et al.*, 2018), assim como a presença de elementos genéticos relacionados à transferência horizontal de genes em amostras de

enterobactérias, especialmente *E. coli*, recuperadas de ambientes aquáticos distintos (VARELA *et al.*, 2015; VAZ-MOREIRA *et al.*, 2015).

Além disso, a recente descoberta de um gene localizado em plasmídeo que confere resistência à colistina (*mcr-1*), considerada como último recurso no tratamento de indivíduos com doenças associadas a enterobactérias resistentes a carbapenêmicos anuncia, segundo McGann e colaboradores (2016), o aparecimento de *E. coli* verdadeiramente panresistente a antimicrobianos. Este achado eleva o patamar da espécie em questão, enquanto causadora de infecções nos diversos sítios aos quais tem sido associada, podendo representar a causa de processos infecciosos que apresentam alto grau de dificuldade no tratamento.

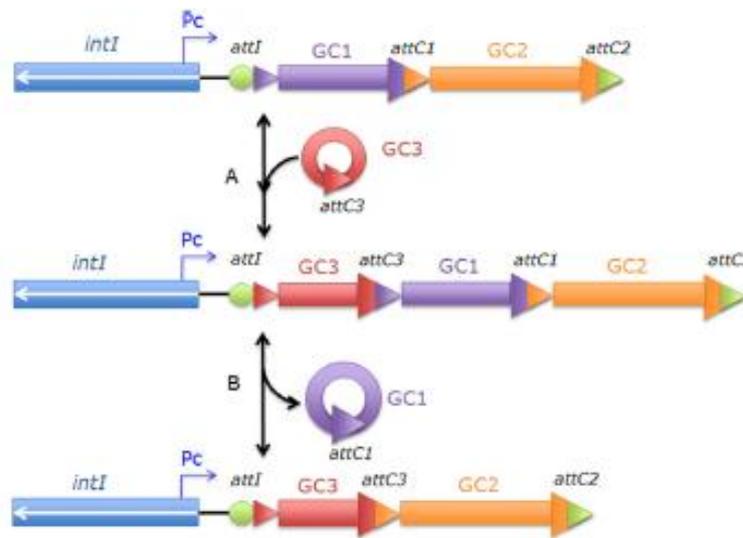
1.7 INTEGRONS

Os *integrons* foram descritos no final da década de 1980. Análises baseadas em bioinformática de genomas bacterianos parcialmente ou completamente sequenciados mostraram que genes característicos de *integrons* estavam presentes em aproximadamente 10% das sequências (DOMINGUES; SILVA; NIELSEN, 2012; GILLINGS 2014). A maioria das descrições de *integrons* concentrou-se em sua presença em amostras clínicas isoladas de seres humanos, mas eles também são encontrados em muitos ambientes não clínicos, tais como ambientes aquáticos e solo (DOMINGUES; SILVA; NIELSEN, 2012). Por estarem ocasionalmente associados a elementos genéticos móveis que possuem marcadores de resistência a metais pesados, desinfetantes e também a antimicrobianos, sua detecção em ambientes naturais pode ser indicativa de poluição ambiental, já que podem ser cosseleccionados por diversos poluentes resultantes da ação humana (GILLINGS *et al.*, 2015).

Os *integrons* são elementos genéticos capazes de promover aquisição e expressão de genes que codificam determinantes de resistência antimicrobiana e outras funções, os quais compõem os cassetes gênicos. Os *integrons* são compostos por três elementos que são necessários à inserção e expressão de genes exógenos: um fragmento que codifica a integrase sítio específica (*intI*), pertencente à família tirosina recombinase, que catalisa a excisão e a integração específica dos cassetes gênicos; uma sequência de recombinação, na qual se une o cassete gênico (*attI*), os quais codificam diferentes mecanismos de resistência; e, na extremidade 3' da *intII*, uma sequência promotora (Pc) a

partir da qual se transcrevem os cassetes de resistência integrados (FIGURA 1) (MOSQUITO *et al.*, 2011; STALDER *et al.*, 2012; GILLINGS, 2014; GILLINGS *et al.*, 2015; POEY; LAVIÑA, 2018).

5 **FIGURA 1** - Organização geral do *integron* e mecanismo de recombinação de cassetes gênicos.



10 **LEGENDA:** *intI*) gene que codifica a enzima integrase. **GC)** cassete gênico. *attI*) sítio de recombinação do *integron*. *attC*) sítio de recombinação do cassete gênico. **Pc)** região promotora. **A)** mecanismo de inserção de cassete gênico. **B)** mecanismo de excisão de cassete gênico.

FONTE: STALDER *et al.*, 2012.

15 Os cassetes gênicos são pequenos elementos móveis normalmente constituídos por apenas um gene ou *open reading frame* (ORF) e um sítio de recombinação (*attC*) que apresenta, geralmente, 59 bases (FIGURA 1). Esses locais de recombinação diferem em tamanho e sequência, mas compartilham regiões conservadas em suas extremidades, na forma de repetições invertidas imperfeitas. O *attC* atua como local de reconhecimento das integrases. Vários cassetes podem ser inseridos em um mesmo *integron*, formando um arranjo *in tandem* (PARTRIDGE *et al.*, 2009). Entretanto, o número de cassetes por
20 *integron* é limitado (STALDER *et al.*, 2012), sendo encontrados, usualmente, em *integrans*

de amostras bacterianas de origem clínica, menos de cinco cassetes gênicos (DOMINGUES; SILVA; NIELSEN, 2012).

Cinco classes de *integrons* podem ser diferenciadas com base na sequência das integrases codificadas. Embora apenas as três primeiras classes tenham sido historicamente relacionadas com a disseminação de fenótipos de multirresistência, todas as cinco classes estão associadas com determinantes de resistência a antimicrobianos (CAMBRAY; GUEROUT; MAZEL, 2010; STALDER *et al.*, 2012). No entanto, centenas de classes de integrons estão sendo descritas com base na homologia relativa de *intI* (GILLINGS *et al.*, 2015), o que vai de encontro ao esquema de classificação atual.

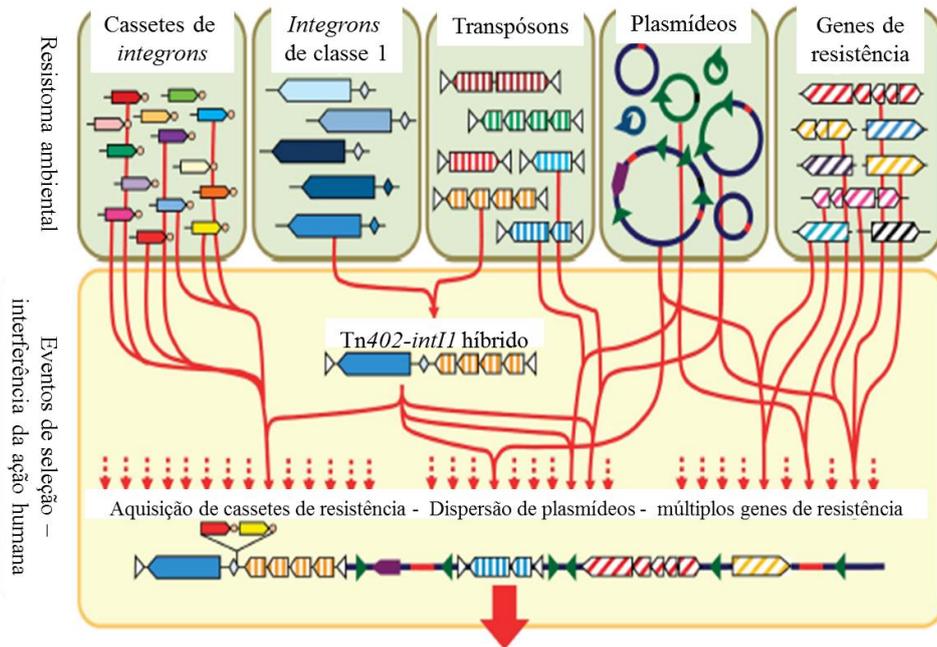
A classe 1 de *integrons* é a mais amplamente disseminada e a clinicamente mais importante, sendo detectada, principalmente, em bactérias Gram negativas, sendo identificada, ocasionalmente, em organismos Gram positivos. Esta classe está associada a transpósons funcionais ou não funcionais derivados de Th402, que podem, ainda, ser incorporados em transpósons maiores, como o Tn21 (CAMBRAY; GUEROUT; MAZEL, 2010), e também em plasmídeos. A maioria dos *integrons* de classe 1 apresenta um segmento conservado denominado 3' (3'-SC), que codifica o gene *qacEΔ1*, que confere resistência a compostos quaternários de amônia, usados como desinfetantes, e o gene *sulI*, que confere resistência a sulfonamidas (STALDER *et al.*, 2012; AMOS *et al.*, 2018).

A abordagem metagenômica empregada em estudos de amostras de origem ambiental mostra uma diversidade de genes *intII* circulantes no ambiente. Em contraste, todos os exemplares de *intII* detectados em ambientes clínicos apresentam sequências de DNA essencialmente idênticas, mostrando que há um único ancestral comum para estes, que são denominados *integrons* clínicos de classe 1. Esta variante do *integron* de classe 1 é, agora, encontrada em uma gama de elementos genéticos móveis que são livremente transmitidos entre bactérias da microbiota indígena e patogênicas associadas a seres humanos e animais domésticos. Consequentemente, está também presente em ambientes com impactos antropogênicos (GILLINGS *et al.*, 2015). A origem do *integron* clínico de classe 1 é descrita na Figura 2.

A classe 2 de *integrons* é o segundo grupo mais frequentemente descrito. Esta classe está associada à família de transpósons Tn7. A maioria dos *integrons* desta classe possui uma interrupção no gene *intII*, devido à presença de um *stop codon*, resultando em uma proteína truncada e não funcional (CAMBRAY; GUEROUT; MAZEL, 2010; STALDER *et al.*, 2012). Isso resulta em uma composição estável do cassete gênico,

composto, principalmente, pelos genes *dfrA1*, envolvido na resistência ao trimetoprim; *sat2*, envolvido na resistência à estreptotricina; *aadA1*, envolvido na resistência à estreptomicina; e *orfX*, o qual não possui função conhecida (STALDER *et al.*, 2012).

5 **FIGURA 2** - A recente origem evolucionária do *integron* clínico de classe 1.



associação de uma única variante da sequência de DNA do *int1* com elementos xenogênicos, cada um composto por um mosaico de plasmídeos, transpósons e determinantes de resistência .

FONTE: GILLINGS *et al.*, 2015. (com modificações).

10 A classe 3 de *integrons* está também localizada em transpósons e apenas poucos *integrons* foram descritos, sendo menos prevalente que a classe 2 (CAMBRAY; GUEROUT; MAZEL, 2010; STALDER *et al.*, 2012). Embora seu papel na resistência antimicrobiana clínica seja menos importante, ecossistemas ambientais podem atuar como um reservatório importante desses elementos (STALDER *et al.*, 2012).

15 Os *integrons* das classes 4 e 5 foram identificados devido a seu papel no desenvolvimento de resistência a trimetoprim em espécies de *Vibrio*. A classe 4 é

componente de um subconjunto de elementos SXT, elementos genéticos móveis relacionados à resistência a antimicrobianos presentes em *Vibrio cholerae*, e a classe 5 está localizada em um transpóson composto, presente no plasmídeo pRSV1 de *Aliivibrio salmonicida* (CAMBRAY; GUEROUT; MAZEL, 2010). As características dos *integrans* das classes 1 e 2 estão apresentadas no Quadro 5. Os demais não foram citados por escassez de dados e/ou por não apresentarem relação com o microrganismo de estudo.

QUADRO 5 - Principais características dos *integrans* das classes 1 e 2.

Características	Classe 1	Classe 2
Disseminação	Alta	Média
Impacto clínico	Alto	Baixo
Integrase	Funcional	Não funcional
Composição do cassete	Instável (grande variabilidade)	Estável

FONTE: CAMBRAY; GUEROUT; MAZEL, 2010; STALDER *et al.*, 2012.

10

1.8 GENE *rpoB* E SUAS APLICAÇÕES FILOGENÉTICAS

O gene *rpoB* é o responsável por codificar a subunidade β da RNA polimerase (ADÉKAMBI; DRANCOURT; RAOULT, 2009; LINDSEY *et al.*, 2015), região esta que desempenha a maior parte das funções catalíticas realizadas pela enzima. A RNA polimerase é crucial no processo de transcrição e é o alvo final das vias regulatórias de controle de expressão gênica (ADÉKAMBI; DRANCOURT; RAOULT, 2009), sendo a responsável por sintetizar o mRNA, o rRNA e o tRNA (ADÉKAMBI; DRANCOURT; RAOULT, 2009; LINDSEY *et al.*, 2015).

A origem antiga do gene *rpoB* indica que ele tem potencial para ser usado como um bom cronômetro molecular. Vários estudos indicaram que a região hipervariável do gene *rpoB*, localizada entre as posições 2300 e 3300, é adequada para identificação e

discriminação filogenética nos níveis de espécie e subespécie (LA SCOLA *et al.*, 2006; VOLOKHOV *et al.*, 2006; ADÉKAMBI; DRANCOURT; RAOULT, 2009; LINDSEY *et al.*, 2015). Junto com o rDNA 16S, o gene *rpoB* tem ajudado a delinear novas espécies bacterianas e a refinar a análise de comunidades bacterianas, bem como a permitir o
5 monitoramento da resistência à rifampicina (ADÉKAMBI; DRANCOURT; RAOULT, 2009).

Uma importante diferença entre o *rpoB* e o rDNA 16S é o número de cópias presentes no genoma. Enquanto o rDNA 16S pode apresentar múltiplas cópias, o gene *rpoB* apresenta-se como cópia única. Esta é uma importante característica que o torna mais
10 apropriado para análises filogenéticas mais refinadas, pois retira da análise o viés da heterogeneidade intragenômica possivelmente presente quando marcadores com múltiplas cópias são utilizados, fornecendo assim melhor resolução filogenética (ADÉKAMBI; DRANCOURT; RAOULT, 2009; DEVANGA RAGUPATHI *et al.*, 2018).

Outras características importantes do gene *rpoB* que favorecem sua aplicação
15 como marcador evolutivo são: (1) sua presença universal entre os procariotos; (2) ter uma função *housekeeping*, o que o torna menos suscetível a transferência gênica horizontal (CASE *et al.*, 2007; DEVANGA RAGUPATHI *et al.*, 2018); (3) a presença de regiões de evolução lenta e rápida, as quais são úteis no desenvolvimento de sondas e iniciadores de especificidades diferentes; (4) ter tamanho suficiente para conter informação filogenética,
20 mesmo depois da remoção das regiões de difícil alinhamento; (5) ser um gene codificador de proteínas, o que permite que seja analisado tanto pela sequência nucleotídica como pela sequência de aminoácidos (CASE *et al.*, 2007).

O gene *rpoB* e outros genes *housekeeping* têm sido incorporados em *multi locus sequence typing* (MLST) (ADÉKAMBI; DRANCOURT; RAOULT, 2009; DAN *et al.*, 2014; DAN *et al.*, 2015). Embora se saiba que o MLST permita uma análise mais
25 precisa, fornecendo informações confiáveis no nível de subespécie, a análise do sequenciamento do gene *rpoB* tem sido suficiente para inferir relações filogenéticas e identificação entre grupos bacterianos intimamente relacionados. Estudos indicam que a análise da sequência do gene *rpoB* gera resultados compatíveis com aqueles obtidos pelo
30 MLST (ADÉKAMBI; DRANCOURT; RAOULT, 2009).

Sendo assim, o sequenciamento do gene *rpoB* possibilita uma identificação bacteriana robusta, precisa e reprodutível (ADÉKAMBI; DRANCOURT; RAOULT, 2009; LINDSEY *et al.*, 2015; DEVANGA RAGUPATHI *et al.*, 2018), o que pode, ainda,

permitir a reclassificação de espécies e a detecção de novos organismos, incluindo aqueles ainda não cultivados, presentes em comunidades bacterianas, além de possibilitar, também, análises filogenéticas mais refinadas no nível de subespécie (ADÉKAMBI; DRANCOURT; RAOULT, 2009).

2 JUSTIFICATIVA

A resistência a antimicrobianos é considerada um dos principais problemas de saúde pública em todo o mundo. Os elementos genéticos móveis estão diretamente relacionados com a presença e disseminação intra e interespecífica de genes que codificam resistência a antimicrobianos. Os *integrans*, que são elementos genéticos capazes de promover a aquisição e expressão de genes que codificam determinantes de resistência antimicrobiana, e que podem, via plasmídeos e transpósons, dentre outros elementos, ser horizontalmente transferidos a outras bactérias, podem estar associados com o fenótipo da resistência. A doença diarreica, que apresenta altas taxas de morbimortalidade, principalmente, nos países em desenvolvimento, possui como um dos principais agentes causadores a enterobactéria *E. coli*, a qual é utilizada como indicadora de contaminação das águas com matéria orgânica de origem fecal. A rota de transmissão fecal-oral de *E. coli* e de outros enteropatógenos se dá, principalmente, pela contaminação de cursos d'água com fezes de seres humanos e de outros animais e posterior ingestão da água, ambiente no qual a presença de *integrans* vem sendo constantemente detectada. A deposição de antimicrobianos em ambientes aquáticos contribui para a seleção de fatores de resistência antimicrobiana nesses locais, de modo que o meio aquático atua como reservatório e via de disseminação de microrganismos potencialmente patogênicos para seres humanos e de genes de resistência a antimicrobianos, incluindo os cassetes gênicos expressos por *integrans*. Desse modo, este estudo se propôs a estudar o perfil de suscetibilidade a antimicrobianos e a pesquisa de *integrans* e cassetes gênicos em amostras de *E. coli* recuperadas de água destinada ao consumo humano, assim como genotipar o microrganismo em questão. Nossa proposta resultou da parceria estabelecida com a Prof.^a Maria Célia da Silva Lanna, do Laboratório de Biologia e Tecnologia de Microrganismos, Departamento de Ciências Biológicas, Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto (LBTM, DCBI, ICEB, UFOP), que possui convênio firmado com os serviços da Vigilância Ambiental das Secretarias de Saúde dos Municípios da mesorregião de Belo Horizonte (Ouro Preto, Mariana e Itabirito), com vistas à realização de análises de monitoramento de águas para consumo.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

5 Avaliar a resistência a antimicrobianos e realizar a genotipagem de amostras de *E. coli* recuperadas de água para consumo dos municípios da mesorregião de Belo Horizonte - Ouro Preto, Mariana e Itabirito e pesquisar *integrons* diretamente nas amostras de águas para consumo de Ouro Preto.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 10 - Isolar e identificar amostras de *E. coli* recuperadas das amostras de água para consumo.
- Avaliar o perfil de suscetibilidade a antimicrobianos das amostras de *E. coli* isoladas de águas para consumo da mesorregião de Belo Horizonte.
- Avaliar a produção de β -lactamases de espectro estendido (ESBLs) pelas amostras
15 de *E. coli*.
- Pesquisar a presença de *integrons* e cassetes gênicos associados à resistência a antimicrobianos.
- Verificar a possível associação entre a presença de cassetes gênicos e a expressão de resistência a antimicrobianos.
- 20 - Genotipar as amostras de *E. coli* portadoras de *integrons* e ou multirresistentes a antimicrobianos.
- Pesquisar a presença de *integrons* diretamente nas amostras de água para consumo no município de Ouro Preto.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Nosso grupo de pesquisa, em parceria com a equipe liderada pela Profa. Maria Célia da Silva Lanna [Laboratório de Biologia e Tecnologia de Micro-organismos (LBTM), Instituto de Ciências Exatas e Biológicas (ICEB), Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP)], vem desenvolvendo um estudo que visa avaliar, do ponto de vista microbiológico, a água para consumo dos municípios de Ouro Preto, Mariana e Itabirito. Dois projetos foram inicialmente propostos. Um deles, recentemente concluído, teve, como objetivo geral, investigar a presença de patótipos diarreio gênicos de *E. coli* nas amostras de água. O segundo constitui parte da presente investigação. Desta forma, as amostras de água obtidas foram empregadas em ambos os projetos e a parte inicial, que envolveu o isolamento e identificação das amostras isoladas foi compartilhada pelos doutorandos responsáveis pela condução das investigações.

As amostras de água foram coletadas nos municípios de Ouro Preto, Mariana e Itabirito, durante um período de 17 meses (agosto de 2014 a dezembro de 2015). Os pontos de coleta foram selecionados pela Vigilância Ambiental de cada Município, em conformidade com a Portaria 2.914/2011 do Ministério da Saúde, a qual foi responsável pela realização das coletas. Um volume correspondente a 100 mL de água foi coletado, em recipiente esterilizado, e transportado, sob refrigeração, para o LBTM, onde foi imediatamente processado. O Laboratório em questão faz parte da rede de laboratórios supervisionados pela Fundação Ezequiel Dias (FUNED) do Estado de Minas Gerais, como previsto no convênio UFOP-Vigiágua/Prefeituras de Ouro Preto, Mariana e Itabirito-FUNED.

A amostragem obedeceu aos seguintes requisitos de representatividade dos pontos de coleta no sistema de distribuição (reservatórios e rede), combinando critérios de abrangência espacial e pontos estratégicos, entendidos como: a) aqueles próximos a grande circulação de pessoas, como terminais rodoviários e terminais ferroviários, entre outros; b) edifícios que albergam grupos populacionais de risco, tais como hospitais, creches e asilos; c) aqueles localizados em trechos vulneráveis do sistema de distribuição, como pontas de rede, pontos de queda de pressão, locais afetados por manobras, sujeitos à intermitência de abastecimento e reservatórios, entre outros; e d) locais com notificações sistemáticas de

agravos à saúde, tendo como possíveis causas os agentes de veiculação hídrica (Portaria 2.914/2011, Ministério da Saúde).

A análise microbiológica da água foi realizada utilizando-se o reagente enzimático Colilert¹, técnica recomendada pela legislação do Ministério da Saúde e indicada pelo padrão de análise americano, *Standard Methods for Examination of Water and Waste Water* (APHA, 2012). A metodologia é mundialmente aceita para a avaliação qualitativa de coliformes totais e coliformes termotolerantes (coliformes fecais, representados pela espécie *E. coli*), indicadores de contaminação microbiana de origem fecal. Os dados são parâmetros para a avaliação da potabilidade de água para consumo e sua investigação mensal em águas para consumo é recomendada pelo Ministério da Saúde.

As amostras de água que apresentaram resultados positivos para coliformes totais e *E. coli* foram inoculadas em MacConkey Agar² e Salmonella-Shigella Agar³. Após incubação 24 h, a 37 °C, as culturas foram enviadas ao Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios (ICB/UFMG), para identificação.

As colônias foram analisadas quanto a características macroscópicas, dentre elas tamanho, coloração, textura e borda, além da capacidade de fermentação de lactose. Para cada variação macroscópica observada foi designada uma identificação de morfotipo e até cinco colônias de cada morfotipo foram escolhidas aleatoriamente e isoladas em meio *Tryptic Soy Agar*⁴ (TSA), para obtenção da cultura pura. A nomeação dos morfotipos foi realizada levando-se em consideração a amostra de água da qual a amostra bacteriana foi recuperada, o morfotipo, o número da repetição do mesmo e o meio de cultura no qual a amostra de água foi semeada (FIGURA 3).

25

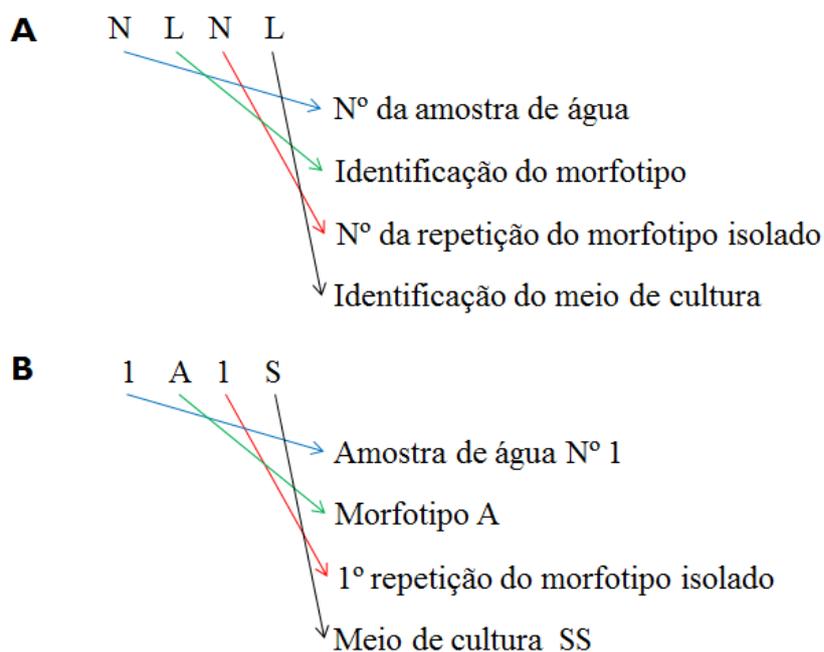
¹Idexx, Westbrook, ME, EUA

²HiMedia, Mumbai, MA, Índia

³HiMedia,

⁴Difco, Sparks, MD, EUA

FIGURA 3 - Esquema de nomeação das amostras bacterianas identificadas como *E. coli*.



LEGENDA: **A:** esquema de nomeação das amostras bacterianas. **B:** exemplo de nomeação: nome dado à primeira amostra identificada no estudo como *E. coli*.

5

Para a identificação fenotípica dos morfotipos, foi utilizado o meio de identificação IAL/Rugai⁵, visando-se a detecção de *E. coli*, de modo que as amostras que apresentaram perfil fenotípico incompatível com *E. coli* foram descartadas. Para isso, uma colônia da cultura pura foi coletada e transferida para o meio de IAL/Rugai que foi, então, incubado por 24 h a 37 °C. Este meio foi elaborado para triagem de enterobactérias e consiste de nove provas em apenas um tubo de ensaio: produção de indol (tampa), fermentação de sacarose, fermentação de glicose, produção de gás, desaminação de L-triptofano, hidrólise de ureia, produção de H₂S, descarboxilação de lisina e motilidade. A leitura dos resultados foi realizada de acordo com instruções do fabricante.

15

⁵Imunodiagnóstica, Belo Horizonte, MG, Brasil

A partir deste ponto, quando foi concluída a identificação fenotípica de *E. coli*, as amostras foram empregadas em ambos os projetos de maneira independente. Assim, a metodologia descrita a partir deste momento foi executada exclusivamente para o desenvolvimento da presente investigação.

5

4.1 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE SUSCETIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS E DETECÇÃO DA PRODUÇÃO DE β -LACTAMASES DE ESPECTRO ESTENDIDO (ESBLs)

10 Para a realização de ambos os testes, a suspensão bacteriana foi preparada em solução salina 0,9% com a adição de colônias isoladas oriundas de cultura em meio TSA até que se obteve turbidez correspondente à escala McFarland 0,5. Em seguida, a suspensão foi semeada com *swab* estéril na superfície de Muller Hinton Agar⁶.

15 A suscetibilidade a agentes antimicrobianos foi avaliada pelo método de disco difusão. Os antimicrobianos⁷ (QUADRO 6) e o método utilizado foram aqueles preconizados pelo CLSI 2018, para a avaliação do perfil de suscetibilidade de *E. coli* a agentes antimicrobianos. A leitura do experimento foi realizada por meio da medição dos diâmetros dos halos de inibição da multiplicação das amostras bacterianas e comparação com a tabela de interpretação do CLSI 2018 (ANEXO A - Parâmetros de interpretação do perfil de suscetibilidade a antimicrobianos da família *Enterobacteriaceae*), após 16 a 18 h
20 de incubação, a 37 °C. Como controle foi utilizada a amostra de referência *E. coli* ATCC 25922.

Foram consideradas multirresistentes as amostras bacterianas que apresentaram resistência a pelo menos um antimicrobiano de, no mínimo, três classes (JOCKENHÖFER *et al.* 2014).

25

⁶Difco

⁷Cecon, São Paulo, SP, Brasil

QUADRO 6 - Antimicrobianos utilizados na avaliação do perfil de suscetibilidade de *Escherichia coli*.

Antimicrobiano	Sigla	Concen- tração (µg)	Classe
Ampicilina	AMP	10	Penicilina
Amoxicilina-clavulanato	AMC	20-10	β-lactâmico/inibidor de β-lactamase
Ampicilina-sulbactam	SBA	10-10	β-lactâmico/inibidor de β-lactamase
Piperacilina-tazobactam	PPT	100-10	β-lactâmico/inibidor de β-lactamase
Ticarcilina-clavulanato	TIC	75-10	β-lactâmico/inibidor de β-lactamase
Cefazolina	CFZ	30	Cefalosporina
Cefepime	COM	30	Cefalosporina
Cefotaxima	CTX	30	Cefalosporina
Ceftriaxona	CRO	30	Cefalosporina
Cefoxitina	CFO	30	Cefalosporina
Cefuroxima	CRX	30	Cefalosporina
Ceftazidima	CAZ	30	Cefalosporina
Aztreonam	ATM	30	Monobactâmico
Imipenem	IPM	10	Carbapenêmico
Meropenem	MER	10	Carbapenêmico
Gentamicina	GEN	10	Aminoglicosídeo
Tobramicina	TOB	10	Aminoglicosídeo
Amicacina	AMI	30	Aminoglicosídeo
Ciprofloxacino	CIP	5	Fluoroquinolona
Levofloxacino	LVX	5	Fluoroquinolona
Ácido nalidíxico	NAL	30	Quinolona
Sulfametoxazol-trimetoprim	SUT	1,25- 23,75	Inibidor da via do folato

FONTE: Clinical & Laboratory Standards Institute, 2016.

A produção de ESBLs foi avaliada pelo método de disco aproximação. Este consiste em posicionar discos de ceftazidima, cefotaxima, ceftriaxona e aztreonam a três centímetros de distância de um disco de amoxicilina-ácido clavulânico. A deformação do halo de inibição ou o aparecimento de uma zona fantasma entre as três cefalosporinas utilizadas e o antimicrobiano combinado com o inibidor de β -lactamase, o ácido clavulânico, caracteriza fenotipicamente o microrganismo como produtor de ESBL. Como controle foi empregada a amostra de referência *E. coli* ATCC 35218.

4.2 EXTRAÇÃO DE DNA DAS AMOSTRAS DE *E. coli*

O DNA das amostras de *E. coli* estudadas e das amostras de referência empregadas como controle foi extraído pelo método do fenol-clorofórmio, como descrito por FOX *et al.* (1994), com algumas modificações. Ao sedimento do material obtido, foi adicionado tampão STET (sacarose⁸ 8%, Tris-HCl⁹ 50 mM, EDTA¹⁰ 50 mM, Triton X-100¹¹ 0,1 %; pH 8,0), SDS¹² (1,5 %) e RNase A¹³ (0,02 μ g/ μ L). Após incubação por uma hora, a 37°C, foi adicionada proteinase K¹⁴ (0,7 μ g/ μ L) e a suspensão foi homogeneizada e incubada a 37 °C, por 24 h. Em seguida, foram adicionados NaCl¹⁵ (0,7 μ mol/ μ L) e uma solução contendo partes iguais de CTAB¹⁶ 5% e NaCl 0,7 M e a suspensão foi agitada e incubada por 10 min, a 56 °C. O DNA foi extraído em igual volume de fenol¹⁷ e clorofórmio¹⁸ (1:1) e precipitado com acetato de sódio¹⁹ 0,3 M (2,6 μ mol/ μ L) e 750 μ L de etanol absoluto²⁰. A amostra foi incubada a -20 °C, por 24 h. A suspensão foi então centrifugada a 12.000 g, por 75 min, o sobrenadante foi descartado e 750 μ L de etanol 70% foram adicionados. O material foi, novamente, centrifugado e o sedimento de DNA obtido

⁸Inlab, São Paulo, SP, Brasil

⁹Promega, Madison, WI, EUA

¹⁰Life, Gairhesburg, MD, EUA

¹¹Calbiochem, La Jolla, CA, EUA

¹²Calbiochem

¹³Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA

¹⁴Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA

¹⁵Sigma-Aldrich

¹⁶Sigma-Aldrich

¹⁷Invitrogen

¹⁸Merck, Darmstadt, Alemanha

¹⁹Sigma-Aldrich

²⁰Merck

foi diluído em 50 µL de água Milli-Q²¹ estéril e estocado a -20 °C. A concentração de DNA de cada amostra foi medida em espectrofotômetro Nanodrop ND-1000²², empregando-se comprimento de onda de 260 nm.

5 4.2.1 PESQUISA DE *INTEGRONS* E CASSETES GÊNICOS NAS AMOSTRAS DE *E. coli*

A pesquisa de *integrans* e cassetes gênicos foi realizada utilizando-se os iniciadores e protocolos especificados nos Quadros 7 e 8, respectivamente. Como molde, foram utilizados 20 ng de DNA. Os produtos de PCR (4 µL) acrescidos de solução de corante Gel Red²³ (0,001%) foram submetidos a eletroforese em gel de agarose²⁴ 1,2%. Como controle positivo foram empregadas as amostras *Klebsiella pneumoniae* 24/*intI1* e *Pseudomonas aeruginosa* 123/*intI2*, cedidas pela Profa. Ana Lúcia da Costa Darini da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto e a amostra *E. coli* BH100/cassete gênico *aad*, cedida pela Profa Andréa Maria Amaral Nascimento do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. Como controle negativo, foi utilizado o *mix* da PCR sem adição da amostra de DNA. Como padrão, foi utilizado o marcador de massa molecular *Ladder* 100 pb²⁵. O gel foi examinado sob luz ultravioleta e o resultado foi fotodocumentado.

²¹Direct-Q 3; Millipore, Molsheim, França

²²Thermo Fischer Scientific, Wilmington, DE, EUA

²³Biotium, Hayward, CA, EUA

²⁴Invitrogen

²⁵Ludwig, Bela Vista - Alvorada, RS, Brasil

QUADRO 7 - Iniciadores para pesquisa de *integrons* e cassetes gênicos nas amostras de *Escherichia coli*.

Iniciadores (5'-3')	Fragmento amplificado	Marcador para	Tamanho do amplicon (pb)	Referência
Int1 F Int1 R	<i>intI1</i>	<i>Integron</i> classe 1	565	SU <i>et al.</i> , 2006
Int2 F Int2 R	<i>intI2</i>	<i>Integron</i> classe 2	403	SU <i>et al.</i> , 2006
IntI 1 - 165 F IntI 1 - 476 R	<i>intI1</i> clínico	<i>Integron</i> clínico	311	GILLINGS <i>et al.</i> , 2015
5'CS F 3'CS R	Cassete gênico	Cassete gênico	Variável	LÉVESQUE <i>et al.</i> , 1995

5 **Nota.** A sequência de cada par de iniciadores pode ser vista a seguir:

- **Int1 F:** ACGAGCGCAAGGTTTCGGTGAA

- **Int1 R:** AGGTCTGGTCATACATG

- **Int2 F:** GTGCAACGCATTTTGCAGGCAA

10 - **Int2 R:** CGGAGTCATGCAGATG

- **IntI 1 - 165 F:** CGAACGAGTGGCGGAGGG

- **IntI 1 - 476 R:** TGTACCCGAGAGCTTGGCACCCA

- **5'CS F:** GGCATCCAAGCAGCAAG

- **3'CS R:** AAGCAGACTTGACCTGA

15

QUADRO 8 - Condições de amplificação para pesquisa de *integrons* e cassetes gênicos nas amostras de *Escherichia coli*.

Alvo	Mix	Condições da reação	Referência
Integrases 1 e 2	1,0 mM de MgCl ₂ , 0,2 mM de cada dNTP, 0,4 µM de cada iniciador (int1 R, int1 F, int2 R e int2 F) e 0,1 U/µL de <i>Taq</i> polimerase	5 min a 94 °C; 30 s a 94 °C, 30 s a 52 °C, 2 min a 72 °C - 30 x; 7 min a 72 °C	SU <i>et al.</i> , 2006
Integrase1 (<i>integron</i> clínico)	2,0 mM de MgCl ₂ , 0,2 mM de cada dNTP, 0,3 µM de cada iniciador (IntI1 - 165 F e IntI1 - 476 R) e 0,05 U/µL de <i>Taq</i> polimerase	2 min a 95 °C; 30 s a 95 °C, 30 s a 59 °C, 45 s a 72 °C - 30 x; 3 min a 72 °C	GILLINGS <i>et al.</i> , 2015
Cassetes gênicos de <i>integrons</i> classe 1	1,5 mM de MgCl ₂ , 0,2 mM de cada dNTP, 0,25µM de cada iniciador (5'CS F e 3'CS R) e 0,03 U/µL de <i>Taq</i> polimerase	12 min a 94 °C; 1 min a 94 °C, 1 min a 55 °C, 5 min a 72°C - 35 x; 5 min a 72 °C	LÉVESQUE <i>et al.</i> , 1995

4.3 GENOTIPAGEM DE AMOSTRAS DE *E. coli*

As amostras de *E. coli* multirresistentes a antimicrobianos e/ou portadoras de *integrans* foram avaliadas quanto a possíveis variações genéticas existentes entre elas. Para isso, a região hipervariável do gene constitutivo *rpoB* (localizada entre os pares de bases
5 2.546-2.924) foi sequenciada e analisada para discriminar geneticamente as amostras, já que, segundo Lindsey e colaboradores (2015) esta região pode ser usada para diferenciação bacteriana a nível subespecífico.

As amostras bacterianas foram descongeladas, semeadas em meio TSA e incubadas a 37°C por 24 h. Posteriormente, com o auxílio de uma alça bacteriológica, uma
10 massa de células de cada amostra bacteriana foi transferida para uma solução de lise celular e enviada, à temperatura ambiente, para a empresa Neopropecta Pesquisa e Consultoria, responsável pela execução do serviço.

O protocolo utilizado foi descrito por Christoff e colaboradores (2017), com modificações. A metodologia em questão foi desenvolvida para pesquisa voltada para o
15 sequenciamento e análise do rDNA 16S. Sendo assim, as alterações realizadas foram aquelas necessárias ao estudo do gene *rpoB*, como por exemplo, o emprego de iniciadores específicos para a região hipervariável do gene.

Após o sequenciamento dos *amplicons*, realizado na plataforma Illumina, as *reads* geradas foram submetidas à análise de bioinformática básica para a classificação
20 taxonômica das amostras de acordo com o banco de dados próprio da Empresa. Os resultados das análises foram disponibilizados na plataforma Neobiome, desenvolvida pela própria Empresa, a qual possibilidade analisar os resultados com o auxílio de duas ferramentas de visualização chamadas “perfil microbiológico” e “perfil genético” (<https://neopropecta.com/plataforma-neobiome>). Posteriormente, as sequências obtidas
25 foram comparadas com banco de dados disponível empregando-se a ferramenta de pesquisa BLASTn²⁶.

²⁶NCBI, Bethesda, MD, EUA

4.4 PESQUISA DE *INTEGRONS* DIRETAMENTE DAS AMOSTRAS DE ÁGUA PARA CONSUMO DE OURO PRETO

5 As diversas águas destinadas ao consumo humano no município de Ouro Preto foram avaliadas quanto à presença de *integrans* de classe 1. As amostras de água foram coletadas em dois momentos distintos, um deles na estação chuvosa (02/02/2016) e outro na estação seca (17/08/2016), visando avaliar a existência de influência sazonal na presença de *integrans*.

4.4.1 PONTOS DE COLETA E FILTRAÇÃO DAS AMOSTRAS DE ÁGUA

10 As amostras de água foram coletadas em diversos pontos do município com o intuito de abranger as diversas fontes de água utilizadas para consumo no município de Ouro Preto. Amostras de água foram obtidas do sistema de abastecimento público, tendo sido estabelecidos como pontos de coleta a ETA Itacolomi e o Reservatório 2. A ETA Itacolomi é a captação principal, operada pelo Serviço Municipal de Água e Esgoto
15 (SEMAE) de Ouro Preto, que capta água do manancial da nascente do Itacolomi e realiza tratamento do tipo convencional. O Reservatório 2 (Bairro Água Limpa) capta água acumulada em uma antiga mina de ouro (Mina da Rainha) e o tratamento utilizado é apenas a cloração (tricloro em pastilha). Além dos pontos mencionados, amostras de “águas alternativas”, utilizadas para consumo pela população urbana, incluindo águas
20 subterrâneas e superficiais, também foram coletadas. Os pontos de coleta do sistema de abastecimento público foram dois: fonte de captação da água bruta e pós-tratamento. Nas amostras de “águas alternativas”, a coleta ocorreu na fonte de captação da água. A localização dos pontos de coleta de água e suas características estão sumarizadas no Quadro 9.

25 As amostras (20 L) foram coletadas em recipientes estéreis e levadas ao Laboratório de Biologia e Tecnologia de Microrganismos da UFOP, onde foram filtradas, com o auxílio de uma bomba de vácuo, em suporte que possibilita a utilização simultânea de até três filtros. Deste modo, cada amostra de água foi filtrada em três membranas

filtrantes Millipore²⁷ de 47 mm de diâmetro com porosidade de 0,22 µm, as quais foram armazenadas sob refrigeração até o momento da extração do DNA total. O volume de água filtrado variou entre cada amostra, uma vez que o processo de filtração foi interrompido no momento em que as membranas filtrantes atingiram seu ponto de saturação.

5

QUADRO 9 - Localização das fontes de água coletadas e suas características.

Amostra	Localidade	Fonte	Sistema de captação	Tratamento
1 e 2	Estação de Tratamento do Itacolomi	Água superficial	Público	Convencional
3 e 4	Reservatório 2	Água subterrânea	Público	Cloração
5	Buraco Quente	Água superficial	Alternativo	Não tratada
6	Novo Horizonte	Água superficial	Alternativo	Não tratada
7	UFOP	Água subterrânea	Alternativo	Não tratada

4.4.2 EXTRAÇÃO DE DNA TOTAL DAS AMOSTRAS DE ÁGUA

O DNA total foi extraído diretamente das membranas filtrantes, empregando-se o *E.Z.N.A. Soil DNA Kit*²⁸, segundo instruções do fabricante. Embora o *kit* seja indicado para a obtenção de DNA de amostras de solo, ele apresenta resultados satisfatórios também

²⁷Merck

²⁸Omega Bio-tek, Norcross, GA, EUA

na obtenção de DNA de amostras de água. Após a extração do DNA, o mesmo foi quantificado pelo *Qubit Assay Kit*²⁹, o qual, através da fluorescência emitida como consequência da ligação específica ao DNA, indica a concentração da macromolécula, minimizando os efeitos de possíveis contaminantes e de DNA degradado.

5

4.4.3 QUANTIFICAÇÃO DE *INTEGRONS* E rDNA 16S DAS AMOSTRAS DE ÁGUA

A avaliação quantitativa de *integrans* classe 1 e Bacteria em amostras de água para consumo foi realizada por meio de qPCR (Quantitative polymerase chain reaction/Reação de polimerização em cadeia quantitativa). As reações foram conduzidas em termociclador *StepOne Real Time PCR System*³⁰ e analisadas com o auxílio do software *Fast SYBR® Green 48 well Template for StepOne™ Systems*³¹. As reações foram realizadas empregando-se 1 µL de DNA alvo, 5 µL de *SYBR Green PCR Master Mix*³² iniciadores (QUADRO 10) e água Milli-Q® estéril com o volume final da reação de 10 µL. O programa de amplificação consistiu em um ciclo de 10 min a 95 °C, seguido por 40 ciclos de 15 s a 95 °C e 60 s a 60 °C. A seguir, foi determinada a curva de *melting* com rampa entre 60 e 95°C. Todos os testes foram realizados em triplicada. A especificidade da amplificação das reações foi comprovada por meio de análise das curvas de *melting* do gene alvo em cada amostra.

Um *pool* de todas as amostras de DNA obtidas das águas foi usado como molde para a obtenção dos padrões para a curva de quantificação (CARDINALI-REZENDE *et al.*, 2012). Este *pool* de DNA foi amplificado por meio de PCR convencional, usando os iniciadores descritos para a qPCR (QUADRO 10). Os *amplicons* obtidos para cada par de iniciadores foram purificados usando uma solução de 20% de polietilenoglicol e NaCl 2,5 M (SAMBROOK *et al.*, 1989). A concentração de DNA do produto amplificado foi determinada por meio de espectrofotometria (absorbância a 260 nm). Obteve-se, assim, para cada gene alvo, uma amostra padrão. As curvas padrão foram

²⁹ Invitrogen

³⁰ Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA

³¹ Applied Biosystems

³² Applied Biosystems

geradas a partir de, pelo menos, cinco diluições (em triplicata) dos padrões. O limite de detecção de cada par de iniciadores foi determinado usando nove diluições de cada padrão. O número de cópias de cada gene alvo por litro de água foi calculado segundo proposto por Kim e colaboradores (2013).

5

QUADRO 10 - Iniciadores para pesquisa de *integrons* nas amostras de água do município de Ouro Preto.

Iniciadores	Fragmento amplificado	Marcador para	Tamanho do amplicon (pb)	Concentração do iniciador (µM)	Referência
338 F 528 R	rDNA 16s	Bacteria	180	0,20	MUYZER <i>et al.</i> , 1993
245 F 345 R	<i>int1</i>	<i>Integron</i> classe 1	101	0,25	SKURNIK <i>et al.</i> , 2005

10 **Nota.** A sequência de cada par de iniciadores pode ser vista a seguir:

- **338 F:** TACGGGAGGCAGCAG

- **528 R:** ATTACCGCGGCTGCTGG

- **245 F:** TGAAAGGTCTGGTCATACATGTGA

15 - **345 R:** CATTCTGGCCGTGGTTCT

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como mencionado no início da sessão Material e Métodos, a parte inicial deste estudo foi compartilhada com outro projeto desenvolvido pelo nosso grupo, executada, em parceria, pelos dois doutorandos responsáveis pela condução das investigações. Assim, os resultados serão apresentados e comentados, para subsidiar o entendimento dos dados gerados especificamente pelo presente projeto.

Durante os primeiros 17 meses de desenvolvimento deste estudo, foram coletadas 1185 amostras de água, nos municípios de Ouro Preto, Mariana e Itabirito. Entre elas, 92 (7,8%) apresentaram resultados positivos para a presença de coliformes totais. No entanto, cinco destas amostras não puderam ser processadas devido a questões técnicas, de modo que as demais (n= 87) foram utilizadas para dar prosseguimento ao estudo. A quantidade de morfotipos detectados por placa variou de um até seis. Foram identificados como *E. coli*, em cada um dos dois meios de cultura utilizados, de um a cinco morfotipos distintos, o que demonstra a heterogeneidade intraespecífica deste microrganismo. Além disso, colônias consideradas como pertencentes a um mesmo morfotipo foram identificadas como sendo de espécies diferentes. Isso demonstra a necessidade de se isolar e identificar mais de uma colônia por morfotipo, uma vez que se trata de um método com as limitações inerentes a uma análise baseada em características fenotípicas macroscópicas.

Foram isoladas e submetidas à identificação fenotípica 907 amostras bacterianas, das quais 423 (46,6%) foram identificadas como *E. coli*. Estas amostras foram cultivadas a partir de 49 das 87 (56,3%) amostras de água positivas pelo Colilert. Considerando-se todas as amostras de água analisadas, 4,1% estavam contaminadas com *E. coli*. Uma média de 8,6 amostras de *E. coli* foram isoladas das amostras de água contaminadas com a bactéria. A Tabela 1 apresenta a distribuição das águas coletadas e os respectivos resultados em relação à presença de coliformes totais e *E. coli* em cada um dos três municípios.

TABELA 1 - Detecção de *Escherichia coli* nas amostras de água para consumo dos municípios de Ouro Preto, Itabirito e Mariana.

Município	Amostras de água coletadas (n/%)	Amostras de água positivas para coliformes totais ^(A) (n/%)	Amostras de água positivas para <i>E. coli</i> ^(B) (n/%)	Amostras bacterianas identificadas como <i>E. coli</i>
Ouro Preto	512/43,2	54 ^(C) /10,5	27/5,3	218
Itabirito	353/29,8	30/8,5	17/4,8	173
Mariana	320/27,0	8/2,5	5/1,6	31
Total	1185	92 ^(D) /7,8	49/4,1	423

LEGENDA: **A:** Colilert. **B:** Rugai. **C:** apenas 49 das 54 amostras foram processadas. **D:** apenas 87 das 92 amostras foram processadas.

5

Em trabalho realizado por Razzolini e colaboradores (2011), 89 amostras de água de consumo foram coletadas em caixas d'água comunitárias do município de Suzano, na região metropolitana de São Paulo e a taxa de contaminação por *E. coli* foi de 5,6%, compatível com a do presente estudo. Já no trabalho realizado por Thani e colaboradores (2016), foram coletadas 157 amostras de água destinadas ao consumo humano em Mombasa County, no Kênia. Das 157 amostras, 131 (83,4%) apresentaram contaminação por coliformes totais, sendo detectada a presença de *E. coli* em 79 (60,3%) das amostras positivas para coliformes totais. Embora a proporção de amostras de água contaminada entre o presente estudo e o citado acima seja consideravelmente diferente, cerca de 8% e 83% para coliformes totais, respectivamente, é possível verificar que nos casos em que há contaminação das amostras de água para consumo humano, a causa principal é a deposição de fezes de seres humanos e outros animais nas fontes de água. Isto pode ser evidenciado pelas taxas de, aproximadamente, 56% e 60% de presença de *E. coli* nas águas contaminadas, uma vez que este microrganismo possui, como *habitat* primário, o trato intestinal de humanos e outros animais (BRIANCESCO, 2005; BARRERA *et al.*, 2018).

O município de Ouro Preto foi a que apresentou pior resultado em relação à contaminação microbiológica da água para consumo utilizada por sua população. Das 507 amostras que puderam ser processadas até o ponto de identificação bacteriana, 27 (5,3%) estavam contaminadas com *E. coli*. Já Mariana foi o município com menor índice, estando apenas 5 (1,6%) das 320 amostras de água testadas contaminadas com *E. coli*. O município de Itabirito apresentou resultado intermediário, sendo encontrada *E. coli* em 17 (4,8%) das 353 amostras de água analisadas.

Os sistemas de abastecimento de água nos municípios de Ouro Preto e Mariana apresentem aspectos semelhantes, já que ambos, além do sistema público, contam com sistemas particulares de captação e distribuição alternativa de água, como observado por Neves (2003). No entanto, as taxas de contaminação por coliformes totais e *E. coli* verificadas no presente estudo são maiores em Ouro Preto. Essa variação pode expressar não só uma possível diferença na qualidade microbiológica das fontes de água utilizadas nestes municípios, como também pode ser devida a questões relacionadas às redes de distribuição e ao armazenamento inadequado, o que pode contribuir para a redução significativa da qualidade da água.

É importante ressaltar que diversas águas contaminadas com coliformes totais e *E. coli* foram coletadas em Unidades de Pronto Atendimento de Saúde (UPAs), Unidades Básicas de Saúde (UBSs), escolas, creches e um lar de idosos. Estes locais apresentam grande fluxo de pessoas, o que aumenta a população exposta aos riscos de águas insatisfatórias para consumo humano. Além deste grande fluxo, outra questão preocupante, que agrava a situação, é a grande concentração dos dois grupos de risco para doenças diarreicas nestes locais, que são as crianças, em especial aquelas abaixo dos cinco anos de idade, e os idosos. Segundo Nontongana e colaboradores (2014), estes grupos, juntamente com indivíduos imunocomprometidos, são os mais afetados pelos efeitos destas doenças, podendo, inclusive, evoluir para o óbito. O local e a data da coleta das amostras de água contaminada com *E. coli* estão apresentados nos Quadros 11, 12 e 13 para os municípios de Ouro Preto, Itabirito e Mariana, respectivamente.

QUADRO 11 - Local e data da coleta das amostras de água contaminada com *Escherichia coli* em Ouro Preto.

Ouro Preto		
Amostra	Local	Data da coleta
1 e 22	Estação de Tratamento de Água	08/14 e 07/15
4 e 91	Residência no bairro Vila Aparecida	09/14 e 12/15
7	Escola Municipal Lavras Novas	10/14
9 e 91	Centro de Convergência/UFOP	11/14 e 12/15
10	Laboratório de Prática Cirúrgica/UFOP	11/14
11 e 65	Escola de Direito, Turismo e Museologia/UFOP	11/14 e 12/14
20	Lar São Vicente de Paulo	01/15
23	Escola Municipal Adhalmir Santos Maia	02/15
29	Creche Municipal Noemia Veloso	03/15
34	Escola Municipal Simão Lacerda	05/15
45 e 67	Escola de Farmácia/UFOP	08/15 e 11/15
58 e 86	Unidade de Pronto Atendimento de Ouro Preto	10/15 e 12/15
66 e 85	Escola de Minas/UFOP	11/15 e 12/15
73 e 89	Centro de Atendimento a Pessoas Especiais (Capes)	11/15 e 12/15
75	Fundação Projeto Sorria	12/15
81	Unidade Básica de Saúde Antônio Pereira	12/15
83	Escola de Nutrição/UFOP	12/15
87	Creche Municipal Criança Feliz	12/15
88	Escola Municipal Izaura Mendes	12/15

QUADRO 12 - Local e data da coleta das amostras de água contaminada com *Escherichia coli* em Itabirito.

Itabirito		
Amostra	Local	Data da coleta
6 e 21 e 77	Escola Municipal José Ferreira Bastos	09/14, 01/15e 12/15
13, 72 e 80	Residências no distrito Paina	11/14, 11/15 e 15/15
25	Escola Municipal Manoel Salvador de Oliveira	02/15
33	Unidade Básica de Saúde Central	05/15
60 e 74	Unidade Básica de Saúde Nossa Senhora de Fátima	10/15 e 12/15
61	Residência Ana Lúcia	10/15
62	Centro Municipal de Educação Infantil Pequeno Polegar	10/15
63	Parque Ecológico	10/15
71	Casa da Vigilância em Saúde	10/15
76	Terminal Rodoviário de Itabirito	12/15
78	Centro Municipal de Educação Infantil Aquarela	12/15
79	Centro de Recolhimento de Animais	12/15

QUADRO 13 - Local e data da coleta das amostras de água contaminada com *Escherichia coli* em Mariana.

Mariana		
Amostra	Local	Data da coleta
5	Centro de Referência de Assistência Social Colina	09/14
8 e 26	Biblioteca Instituto de Ciências Humanas e Sociais/UFOP	10/14 e 03/15
14	Instituto de Ciências Sociais Aplicadas/UFOP	12/14
24	Escola Estadual Coronel Benjamim Guimarães	02/15

A detecção de *E. coli* foi constatada em 11 instituições públicas de ensino (seis em Ouro Preto, quatro em Itabirito e uma em Mariana) das quais sete (cinco em Ouro Preto e duas em Itabirito) atendem crianças abaixo de cinco anos de idade. Este dado aponta para uma situação preocupante uma vez que evidencia a exposição desta população aos riscos potenciais associados à ingestão de águas contaminadas por agentes causadores destas doenças.

Em estudo realizado por Reis (2007), no município de Ouro Preto, as fezes de 50 crianças com quadro clínico de diarreia foram analisadas. A faixa etária estudada foi de zero a seis anos, com 86% dos casos concentrados entre crianças de 13 a 24 meses. Em 86% dos casos, algum patotipo diarreiogênico de *E. coli* foi detectado. Já rotavírus e parasitas estavam presentes em 16% e 24% dos casos, respectivamente. Trabalho anterior, que avaliou a qualidade da água distribuída nas mesmas localidades onde foram coletadas as amostras de fezes (NEVES, 2003), também revelou a presença dos mesmos patotipos de *E. coli*, indicando que a veiculação hídrica de enteropatógenos realizada por águas destinadas ao consumo pode ser a responsável pelos quadros de diarreia infantil ocorridos no município. A presente investigação demonstrou que a recuperação destes patógenos é recorrente nos estudos que avaliam a qualidade da água para consumo do município, já que, dentre as amostras bacterianas avaliadas, 12 foram identificadas como patotipos diarreiogênicos de *E. coli* (ANEXO B - Identificação dos patotipos diarreiogênicos de *E. coli*), de acordo com Moreira (2018).

Ouro Preto foi o município no qual um maior número de amostras contaminadas foi identificado em locais de concentração de grupos de risco. Além das sete instituições de ensino, foi também detectada a presença de *E. coli* em amostras de água coletadas na Unidade Básica de Saúde Antônio Pereira, na Unidade de Pronto Atendimento de Ouro Preto, onde cerca de 260 atendimentos diários são realizados sendo, aproximadamente, 70 pediátricos (<http://www.ouopreto.mg.gov.br/noticia/445>) e no Lar São Vicente de Paulo, no qual residem cerca de 60 idosos (<http://www.ouopreto.com.br/secao/artigo/lar-sao-vicente-de-paulo-entra-na-maior-crise-financeira-de-sua-historia-acorda-ouro-preto>),

Situação semelhante foi observada no município de Itabirito, onde, além das cinco instituições de ensino, a Unidade Básica de Saúde Nossa Senhora de Fátima e a Unidade Básica de Saúde Central também apresentaram amostras de água contaminadas com *E. coli*. No município de Mariana, o número de amostras contaminadas com *E. coli* foi o menor dentre os três municípios, cinco (1,6%) das 320. Embora nenhum destes pontos concentre os principais grupos de risco, já que a Escola Estadual Coronel Benjamim Guimarães atua apenas no ensino fundamental com crianças a partir de seis anos de idade e com educação de jovens e adultos, são locais que recebem diariamente um grande número de pessoas, o que faz deste um importante local de exposição a águas impróprias ao consumo e conseqüente aquisição de doenças diarreicas.

Um importante local amostrado, com diversos pontos de coleta, foi a Universidade Federal de Ouro Preto (campus Ouro Preto e Mariana). O grande número de pessoas que diariamente frequentam estes locais faz destes, importantes pontos de exposição da população a águas impróprias ao consumo. A UFOP possui mais de 11 mil alunos em cursos presenciais e mais de 1.500 funcionários (<http://www.ufop.br/ufop-em-numeros>). Deste modo, milhares de pessoas estão potencialmente expostas a águas contaminadas, já que oito pontos de coleta (seis no campus Ouro Preto e dois no campus Mariana) apresentaram contaminação por *E. coli*, totalizando 13 amostragens com resultados positivos.

Outro aspecto importante é que as 49 amostras de água contaminadas com *E. coli* foram obtidas de 35 pontos de coleta diferentes. Em 13 (37,1%) deles houve contaminação em mais de uma amostragem. Em 12 pontos, a contaminação foi detectada duas vezes e em outro ponto foi detectada três vezes. Este resultado indica que a fonte de contaminação pode estar perdurando ao longo do tempo, principalmente nos casos em que

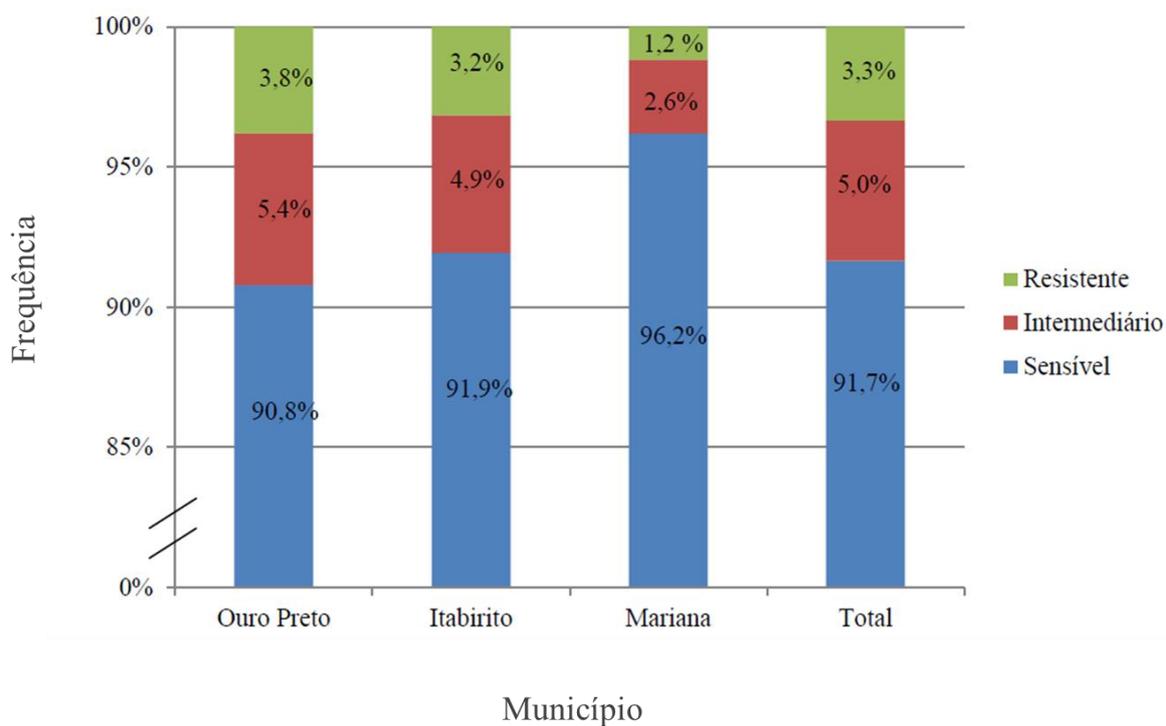
a contaminação foi detectada em amostragens consecutivas, ou pode estar se repetindo de modo pontual nestes locais amostrados, já que alguns pontos apresentaram o segundo caso de contaminação alguns meses após o primeiro.

5 5.1 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE SUSCETIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS E DETECÇÃO DA PRODUÇÃO DE β -LACTAMASES DE ESPECTRO ESTENDIDO

Para a caracterização do perfil de suscetibilidade a antimicrobianos das amostras de *E. coli* isoladas, foram realizados 9.306 testes de antibiograma e os resultados estão apresentados nos gráficos 1 e 2. No total, 311 casos de resistência e 466 intermediários foram detectados. O município de Ouro Preto apresentou o resultado mais preocupante dentre os três municípios, com 182 casos detectados. Em Itabirito, foram identificados 121 casos e, no município de Mariana, apenas oito casos foram observados.

Nenhum dos 22 antimicrobianos utilizados, representando oito classes e cinco subclasses de cefalosporinas e duas subclasses de quinolonas, foi eficaz contra todas as 423 amostras de *E. coli* (GRÁFICO 1). Entre elas, 146 (34,5%) foram resistentes a pelo menos um antimicrobiano. Baixas taxas de resistência foram observadas, sendo, com exceção da ampicilina (16,5%), inferiores a 10 %. Em seguida, as maiores taxas de resistência foram para ácido nalidíxico (7,6%), tobramicina (7,1%), cefuroxima (6,9%) e sulfametoxazol-trimetoprima (6,1%). Sendo assim, é possível verificar que as maiores taxas de resistência são, no geral, para antimicrobianos de longo uso na clínica (SAGA; YAMAGUCHI, 2009) e/ou mais frequentemente prescritos para tratamento de infecções ambulatoriais (LEVIN *et al.*, 2012), sendo que, para ampicilina, casos de resistência são relatados desde a década de 1980 (SAGA; YAMAGUCHI, 2009). Outro fato importante foi a detecção de 13 amostras resistentes e 16 intermediárias a meropenem, uma vez que este antimicrobiano possui utilização geralmente restrita a casos graves de infecções relacionadas à assistência à saúde, infecções por amostras multirresistentes ou infecções polimicrobianas (MARTÍNEZ *et al.*, 2010).

GRÁFICO 1 - Frequência de amostras bacterianas sensíveis, intermediárias e resistentes considerando todos os antimicrobianos testados.



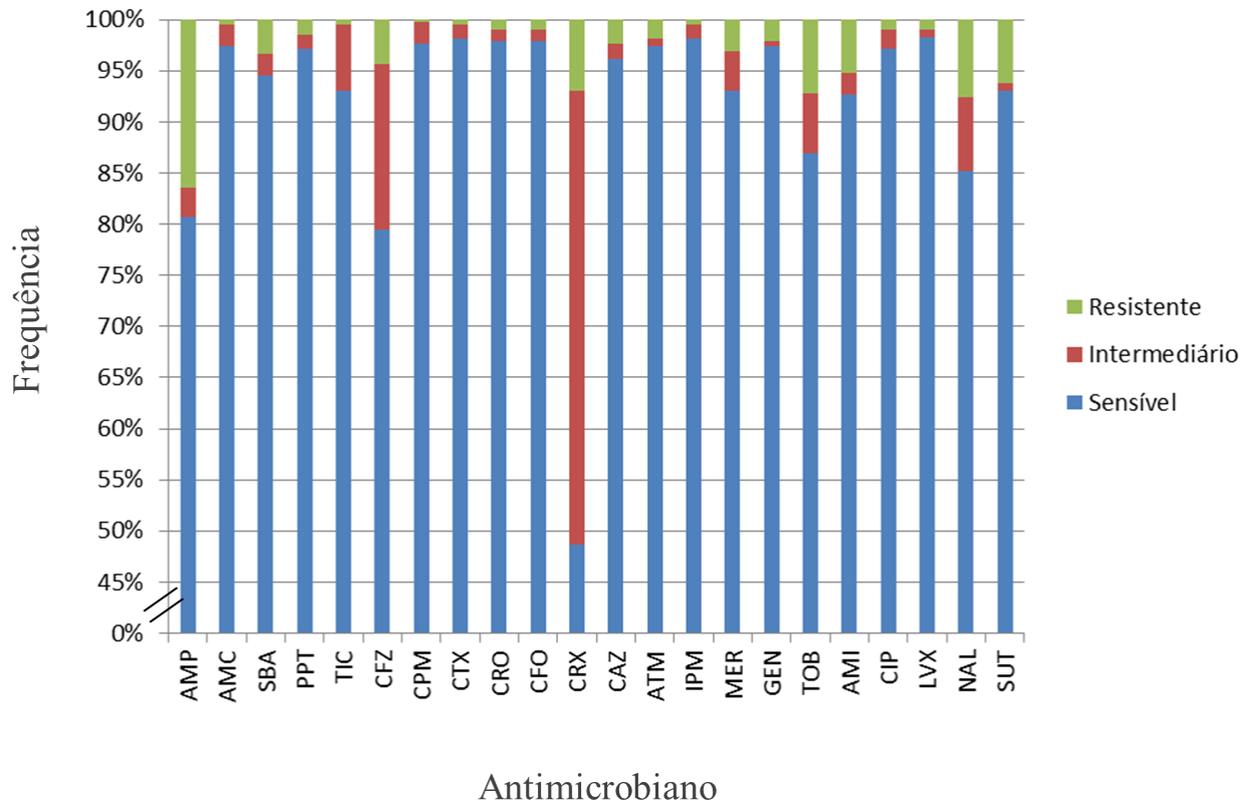
5 As taxas de resultados intermediários também foram baixas para a maioria dos antimicrobianos, com valores inferiores a 10%, sendo superiores apenas para cefazolina (16,2%) e cefuroxima (44,4%), cefalosporinas da primeira e segunda gerações, respectivamente. A cefuroxima teve, ainda, a pior atividade frente às amostras de *E. coli*, sendo menos da metade sensível ao antimicrobiano (48,7%). Mais uma vez, os piores resultados foram detectados para antimicrobianos com tempo prolongado de utilização, cefalosporinas de primeira e segunda gerações, desenvolvidas nas décadas de 1960 e 1970, respectivamente (SAGA; YAMAGUCHI, 2009).

15 Os melhores resultados foram obtidos para os antimicrobianos levofloxacin, imipenem, ceftiofina e ceftriaxona, aos quais 417 (98,6%), 415 (98,1%), 414 (97,9 %) e 414 (97,9%) das 423 amostras bacterianas foram sensíveis, respectivamente (GRÁFICO 2). Embora nove amostras tenham apresentando resultado intermediário a cefepime, cefalosporina de quarta geração, é importante ressaltar que apenas uma das 423 amostras apresentou resistência, sendo esta a menor taxa observada.

O perfil de suscetibilidade a antimicrobianos variou entre as amostras recuperadas das águas dos três municípios (TABELA 2). Ouro Preto, além de apresentar uma maior porcentagem de águas contaminadas com *E. coli*, foi o município onde o perfil de suscetibilidade foi mais heterogêneo, com taxas maiores de resistência sendo que, das 218 amostras de *E. coli* analisadas, 86 (39,4%) foram resistentes a pelo menos um antimicrobiano. O município de Itabirito também apresentou amostras bacterianas com perfis de resistência variados, sendo que, das 173 amostras de *E. coli* analisadas, 55 (31,8%) apresentaram resistência a pelo menos um antimicrobiano. Já no município de Mariana, o perfil foi mais homogêneo, sendo que, das 31 amostras de *E. coli* analisadas, apenas cinco (16,1%) apresentaram resistência a algum antimicrobiano. As amostras bacterianas que apresentaram resistência foram recuperadas de 23 (85,2%), 13 (76,5%) e quatro (80,0%) amostras de água coletadas nos municípios de Ouro Preto, Itabirito e Mariana, respectivamente.

Embora as taxas de resistência tenham sido baixas, 37 amostras de *E. coli* (8,8%), coletadas em 18 amostras de água, apresentaram perfil de multirresistência a antimicrobianos (TABELA 15). O resultado do perfil de suscetibilidade a antimicrobianos destas amostras pode ser visto, também, no manuscrito presente nos apêndices desta tese (APÊNDICE A - *Detection of multidrug resistant Escherichia coli isolates in drinking water from Minas Gerais, Brazil*).

GRÁFICO 2 - Perfil de suscetibilidade a antimicrobianos das amostras de *Escherichia coli* recuperadas das águas para consumo



LEGENDA: AMP: Ampicilina; AMC: Amoxicilina-clavulanato; SBA: Ampicilina-sulbactam; PPT: Piperacilina-tazobactam; TIC: Ticarcilina-clavulanato; CFZ: Cefazolina; CPM: Cefepime; CTX: Cefotaxima; CRO: Ceftriaxona; CFO: Cefoxitina; CRX: Cefuroxima; CAZ: Ceftazidima; ATM: Aztreonam; IPM: Imipenem; MER: Meropenem; GEN: Gentamicina; TOB: Tobramicina; AMI: Amicacina; CIP: Ciprofloxacina; LVX: Levofloxacina; NAL: Ácido Nalidíxico; SUT: Sulfametoxazol-trimetoprima.

10

15

TABELA 2 - Comparação dos perfis de suscetibilidade a antimicrobianos das amostras de *Escherichia coli* por município.

Amostras resistentes (Nº/%)							
	Ouro	Itabirito	Mariana		Ouro	Itabirito	Mariana
	Preto				Preto		
AMP	35/16,05	32/18,5	2/6,7	CAZ	7/3,2	3/1,75	0/0
AMC	1/0,5	1/0,6	0/0	ATM	6/2,75	2/1,2	0/0
SBA	8/3,7	6/3,5	0/0	IPM	1/0,5	1/0,6	0/0
PPT	4/1,8	2/1,2	0/0	MER	8/3,7	4/2,3	1/3,4
TIC	2/0,9	0/0	0/0	GEN	8/3,7	0/0	0/0
CFZ	7/3,2	8/4,7	3/10	TOB	16/7,3	13/7,6	1/3,4
CPM	1/0,5	0/0	0/0	AMI	14/6,4	8/4,7	0/0
CTX	2/0,9	1/0,6	0/0	CIP	3/1,4	2/1,2	0/0
CRO	0/0	2/1,2	0/0	LVX	2/0,9	1/0,6	0/0
CFO	1/0,5	3/1,75	0/0	NAL	19/8,7	13/7,6	0/0
CRX	15/6,7	14/8,2	1/3,4	SUT	22/10,1	5/2,9	0/0

Legenda: AMP: Ampicilina; AMC: Amoxicilina-clavulanato; SBA: Ampicilina-sulbactam; PPT: Piperacilina-tazobactam; TIC: Ticarcilina-clavulanato; CFZ: Cefazolina; CPM: Cefepime; CTX: Cefotaxima; CRO: Ceftriaxona; CFO: Cefoxitina; CRX: Cefuroxima; CAZ: Ceftazidima; ATM: Aztreonam; IPM: Imipenem; MER: Meropenem; GEN: Gentamicina; TOB: Tobramicina; AMI: Amicacina; CIP: Ciprofloxacina; LVX: Levofloxacina; NAL: Ácido nalidíxico; SUT: Sulfametoxazol-trimetoprima.

O número de antimicrobianos a que cada amostra multirresistente apresentou resistência variou de três a oito, englobando de três a cinco classes. Nas 37 amostras multirresistentes, foram observados 160 casos de resistência, de modo que a média de resistência por amostra bacteriana foi de 4,3 antimicrobianos (QUADRO 14).

5 Todos os 22 antimicrobianos testados estão envolvidos em casos de multirresistência. Dentre os 37 casos detectados, os antimicrobianos mais envolvidos foram ampicilina, ácido nalidíxico, cefuroxima, tobramicina, amicacina e ampicilina-sulbactam, relacionados a 22 (59,5%), 21 (56,8 %), 18 (48,6 %), 17 (45,9%), 14 (37,8%) e 11 (29,7%) casos, respectivamente. Assim, quatro das oito classes de antimicrobianos
10 utilizados estão representadas em mais de um quarto dos casos de multirresistência. As amostras multirresistentes apresentaram perfis de suscetibilidade amplamente diversificados entre elas, tendo sido detectada resistência a 32 combinações distintas de antimicrobianos, mostrando a ampla gama de genes de resistência para os quais estão expostos os consumidores destas águas.

15 A metade das amostras de água contaminadas com microrganismos multirresistentes (9/18) apresentou mais de uma amostra bacteriana multirresistente, sendo que, entre elas, o perfil de suscetibilidade foi distinto. Algumas amostras merecem destaque como, por exemplo, a amostra de água 86, com seis amostras bacterianas multirresistentes e cinco combinações distintas; a amostra 45, com quatro amostras
20 bacterianas multirresistentes e quatro combinações distintas; e a amostra de água quatro, com duas amostras bacterianas multirresistentes e duas combinações distintas, sendo que uma delas, a amostra 4A1M, é uma *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) resistente a seis antimicrobianos. Estas amostras de água foram coletadas, respectivamente, na Unidade de Pronto Atendimento, na Escola de Farmácia e em uma residência no bairro Vila Aparecida,
25 todas em Ouro Preto. O que torna estes resultados ainda mais preocupantes é o fato de que os dois primeiros locais citados apresentam uma grande circulação de pessoas, além do potencial risco de exposição dos principais grupos de risco para doença diarreioigênica que podem, eventualmente, buscar atendimento na unidade de saúde mencionada.

30

QUADRO 14 - Perfil de suscetibilidade das amostras de *Escherichia coli* multirresistentes a antimicrobianos.

Amostra	Antimicrobianos	Amostra	Antimicrobianos
4A1M	AMP, CFZ, GEN, TOB, NAL, SUT	67B3S	AMP, CRX, TOB, AMI, NAL
4A5M	AMP, GEN, TOB, NAL, SUT	67B4S	AMP, CRX, TOB, AMI, NAL
20A1M	CPM, CAZ, ATM, LVX	67B5S	AMP, SBA, CRX, CIP
21B2M	AMP, AMI, CIP, NAL	71A2M	IPM, AMI, NAL
45A1M	AMP, NAL, SUT	71B3S	AMP, TOB, NAL
45A2M	AMP, CAZ, ATM, CIP, LVX, NAL, SUT	74A5S	CFZ, TOB, NAL
45B1M	AMP, SBA, CFZ, CRX, TOB, SUT	78B3M	AMP, CRX, TOB
45A2S	ATM, TOB, AMI, NAL, SUT	83C1M	AMP, CRX, AMI
60B1M	AMP, AMC, SBA, CTX, CRO, CFO, ATM, SUT	85A3S	SBA, MER, AMI
60B5M	AMP, CFO, NAL	86A5S	SBA, MER, AMI
60E5M	SBA, CRX, TOB, AMI	86B2S	CAZ, ATM, MER, TOB, SUT
61A2M	AMP, TIC, CRX,	86B3S	AMP, CRX, TOB, AMI, SUT
61A3M	AMP, SBA, CRX, TOB	86B4S	CRX, NAL, SUT
61A4M	AMP, SBA, CFZ, CRX, TOB, AMI	86B5S	CRX, NAL, SUT
62A2S	CRX, AMI, MER, CIP, LVX, NAL	86C1S	CAZ, NAL, SUT
62A3S	CFZ, CRX, MER, TOB, AMI, NAL	88A4M	AMP, SBA, TIC, CRX, GEN, NAL
63A1M	AMP, SBA, CRX, NAL	89B3M	AMP, TOB, NAL
65A1M	PPT, CFZ, CTX, CAZ, IPM, AMI, CIP	89B5M	SBA, TOB, NAL
67A1M	AMP, CRX, AMI	-	-

Legenda: **AMP:** Ampicilina; **AMC:** Amoxicilina-clavulanato; **SBA:** Ampicilina-sulbactam; **PPT:** Piperacilina-tazobactam; **TIC:** Ticarcilina-clavulanato; **CFZ:** Cefazolina; **CPM:** Cefepime; **CTX:** Cefotaxima; **CRO:** Ceftriaxona; **CFO:** Cefoxitina; **CRX:** Cefuroxima; **CAZ:** Ceftazidima; **ATM:** Aztreonam; **IPM:** Imipenem; **MER:** Meropenem; **GEN:** Gentamicina; **TOB:** Tobramicina; **AMI:** Amicacina; **CIP:** Ciprofloxacina; **LVX:** Levofloxacina; **NAL:** Ácido Nalidíxico; **SUT:** Sulfametoxazol-trimetoprima.

5

Das 18 amostras de água contaminadas com bactérias multirresistentes, 10 (55,6%) são de Ouro Preto, englobando 23 (62,2%) das 37 amostras bacterianas multirresistentes identificadas. As outras oito (44,4%) amostras de água contaminada com microrganismos multirresistentes são do município de Itabirito, das quais 14 (37,8%) das 37 amostras bacterianas multirresistentes identificadas foram recuperadas. Como mencionado anteriormente, Mariana foi o município que apresentou microrganismos com perfil de suscetibilidade mais homogêneo, não tendo sido identificado casos de multirresistência.

Estes resultados demonstram que parte das águas utilizadas para consumo humano nos três municípios alvos do estudo pode estar atuando não só na disseminação de microrganismos considerados como contaminantes de origem fecal, evidenciado pela presença de *E. coli* em pouco mais de 4% do total de amostras de água testadas, como também na disseminação de marcadores de resistência entre populações humanas e de outros animais, fato já discutido por Coleman e colaboradores (2013). Em estudo conduzido pelo mesmo grupo a prevalência de pessoas portadoras de *E. coli* resistente a antimicrobianos foi 26% maior entre aquelas que consumiram água contaminada com amostras resistentes da bactéria, previamente à realização do estudo, do que entre aquelas que não a consumiram, mesmo depois de considerado o impacto de outros fatores de risco associados (Coleman *et al.*, 2011).

Corroborando os trabalhos mencionados acima, Pereira e colaboradores (2013) afirmam que a poluição fecal de águas superficiais é um problema mundial de saúde pública atual que pode contribuir para a disseminação de resistência a antimicrobianos. Deste modo, a população exposta a estas águas contaminadas estão sob o risco não só de contrair doenças diarreicas, como também de albergarem, em sua microbiota intestinal, bactérias que possuem genes de resistência, sendo em alguns casos múltiplos genes, o que acaba por lhes conferir um perfil de multirresistência a antimicrobianos. É importante ressaltar que uma das implicações possíveis desta situação é a disseminação, por transferência horizontal, destes genes a outros microrganismos da microbiota intestinal uma vez que, segundo Coleman e colaboradores (2013), *E. coli* é capaz de transferir estes genes para outras bactérias, inclusive de outras espécies, o que pode, eventualmente, causar alterações na microbiota indígena.

Outra implicação da contaminação das águas com microrganismos resistentes a antimicrobianos é a transferência horizontal de genes de resistência entre bactérias no

ambiente aquático (COLEMAN *et. al.*, 2013). Desta forma, as comunidades bacterianas estabelecidas neste ambiente poderiam receber e albergar genes de resistência a antimicrobianos oriundos dos microrganismos contaminantes, que se somariam aos genes de resistência naturalmente presentes nos microrganismos destas comunidades. Assim, a
5 utilização destas águas continuaria sendo preocupante, ainda que a fonte de contaminação fecal fosse interrompida, devido à disseminação de genes de resistência previamente inseridos na comunidade bacteriana e que poderiam alcançar populações humanas, de outros animais e a prática agrícola, dependendo da destinação dada à água em questão.

Em relação à pesquisa de produção de ESBLs, nenhuma das 423 amostras
10 apresentou resultado positivo. Em estudo realizado por Oliveira e colaboradores (2017), foram avaliadas 170 amostras de *E. coli*, sendo 98 (57 ETEC e 41 EPEC) recuperadas de espécimes fecais de crianças com doença diarreica aguda e 72 amostras não diarreio gênicas. O resultado foi o mesmo obtido na presente investigação, ou seja, ausência de amostras produtoras de ESBLs. Os dados sugerem que outros mecanismos de
15 resistência a β -lactâmicos estão presentes nas amostras que apresentaram resistência a estes antimicrobianos nas amostras estudadas.

5.2 PESQUISA DE INTEGRONS E CASSETES GÊNICOS

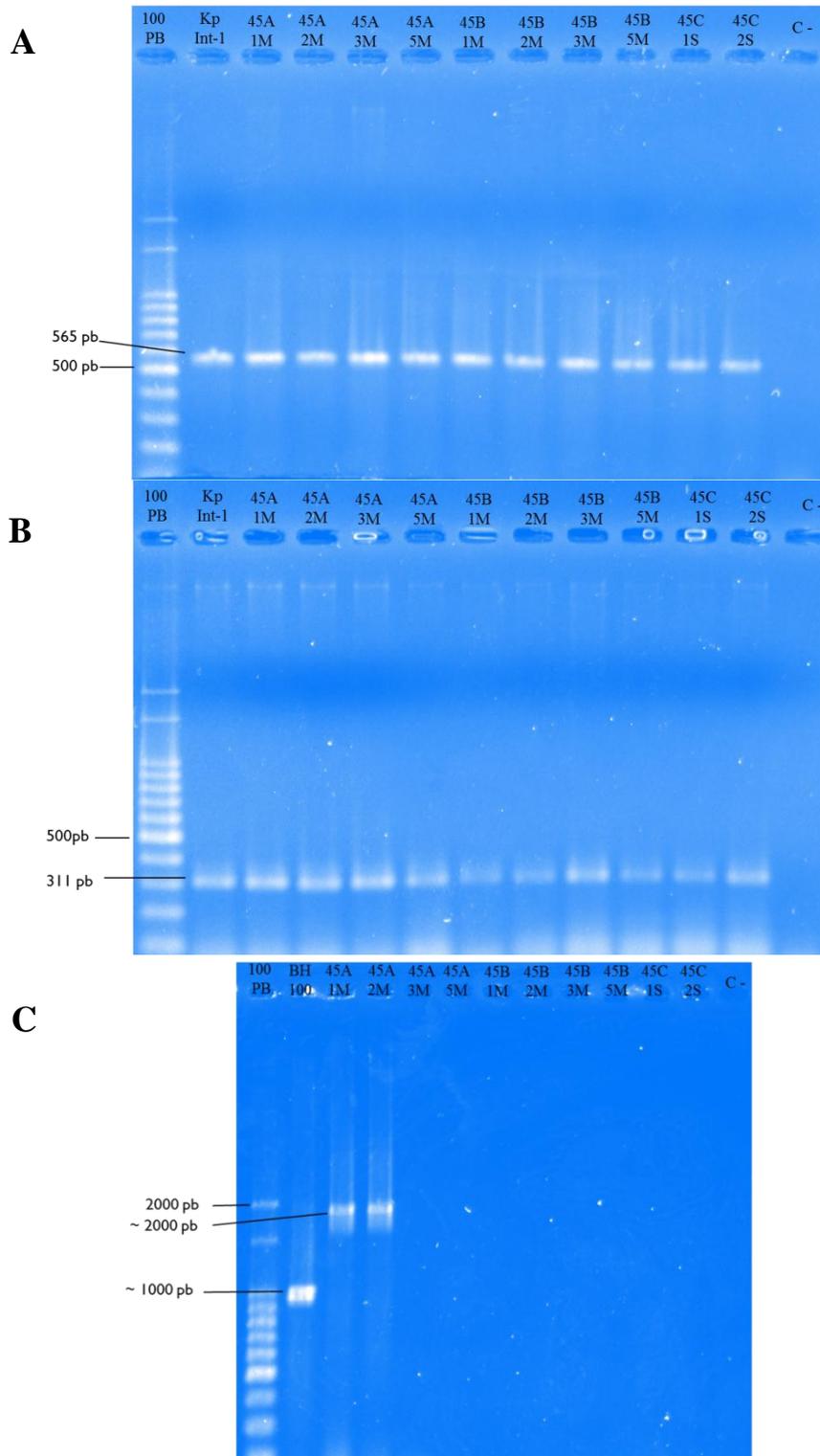
Os resultados da PCR indicaram que 10 (2,4%) das 423 amostras de *E. coli*,
20 todas recuperadas da mesma amostra de água coletada na Escola de Farmácia da UFOP, eram portadoras de *integron* de classe 1. Nenhuma amostra apresentou reação positiva indicativa da presença de *integron* de classe 2. Todas as 10 amostras bacterianas portadoras de *integron* de classe 1 apresentaram resultados positivos para pesquisa de *integron* clínico de classe 1 e duas delas (20,0%) carregavam cassetes gênicos. As informações relativas às
25 amostras portadoras de *integrans* estão apresentadas no Quadro 15 e os resultados positivos das reações de amplificação para pesquisa de *integron* de classe 1, *integron* de classe 1 clínico e cassetes gênicos estão ilustrados na Figura 4.

QUADRO 15 - Amostras de *Escherichia coli* portadoras de *integron* de classe 1 e de sua variante clínica.

Amostra	Cassete gênico	Resistência: Atm/Nº de classes
45A1M	+	AMP-NAL-SUT/3*
45A2M	+	AMP-CAZ-ATM-CIP-LVX-NAL-SUT /5*
45A3M	-	CRX-SUT /2
45A5M	-	SUT /1
45B1M	-	AMP-SBA-CFZ-CRX-TOB-SUT /5*
45B2M	-	SUT /1
45B3M	-	SUT /1
45B5M	-	SUT /1
45C1S	-	SUT /1
45C2S	-	SUT /1

LEGENDA: **AMP:** Ampicilina; **SBA:** Ampicilina-sulbactam; **CFZ:** Cefazolina; **CPM:** Cefepime; **CTX:** Cefotaxima; **CRX:** Cefuroxima; **CAZ:** Ceftazidima; **ATM:** Aztreonam; **TOB:** Tobramicina; **LVX:** Levofloxacina; **NAL:** Ácido Nalidíxico; **SUT:** Sulfametoxazol-trimetoprima; **Atm:** Antimicrobiano; *****: Amostra multirresistente.

FIGURA 4 - Eletroforese dos amplicons correspondentes a *integron* de classe 1, *integron* clínico de classe 1 e cassetes gênicos de amostras de *Escherichia coli*.



5

LEGENDA: **A:** PCR para detecção do gene *intI1*. **B:** PCR para detecção do gene *intI1* clínico. **C:** PCR para detecção de cassete gênico de *integron* classe 1. **Pb:** Pares de bases. **Kp *intI1*:** *Klebsiella pneumoniae* 24 (controle positivo para os genes *intI1* e *intI1* clínico). **BH 100:** *Escherichia coli* BH 100 (controle positivo para cassete gênico de *integron* classe 1). **C-:** Controle negativo.

Embora estudos mostrem que cerca de 10% dos genomas bacterianos sequenciados possuam *integrons* e que os mesmos possam ser encontrados em amostras de diversos ambientes (CAMBRAY; GUEROUT; MAZEL, 2010; GILLINGS, 2014), existe uma diferença considerável entre as taxas de detecção de *integrons* reportadas em estudos que avaliaram amostras recuperadas de ambientes clínicos (ZEIGHAMI *et al.*, 2014; ACOSTA-PÉREZ *et al.*, 2015; OLIVEIRA *et al.*, 2017; POEY; LAVIÑA, 2018) e não clínicos, em especial, de ambiente aquático (ROSSER; YOUNG, 1999; LAROCHE, 2009; GUO *et al.*, 2011; SINGH; SINGHAL; VIRDI, 2018).

No que se refere à pesquisa de *integrons* em amostras de *E. coli* recuperadas diretamente de torneiras que distribuem águas para consumo humano, apenas dois estudos foram encontrados na literatura disponível. Um deles avaliou apenas amostras multirresistentes de diversas espécies bacterianas, entre elas, um número muito reduzido (n = 2) de amostras de *E. coli*. Ambas apresentaram resultado negativo para a presença de *integrons* de classe 1 (ADESOJI; OGUNJOBI; OLATOYE, 2017). Na outra investigação, Ozgumus e colaboradores (2007) recuperaram 117 amostras de *E. coli* de águas coletadas de torneiras públicas e de nascentes de uma região costeira da Turquia e detectaram a presença de *integrons* de classe 1 em 2,5% das amostras. Este é, portanto, o único estudo com metodologia semelhante à presente investigação e os resultados são bastante similares.

Todas as dez amostras portadoras de *integrons* de classe 1 apresentaram resistência antimicrobiana, variando de um a sete antimicrobianos, o que destaca este grupo de amostras do total analisado, já que a ocorrência global de amostras resistentes a pelo menos um antimicrobiano foi de 34,5%. Outra implicação importante em relação a este dado é o fato de que o fenótipo de resistência antimicrobiana que cada uma das amostras apresentou pode ser ampliado e diversificado pela presença dos *integrons*, uma vez que estes elementos genéticos podem promover, de forma autônoma, a aquisição e expressão de genes que codificam determinantes de resistência antimicrobiana (MOSQUITO *et al.*, 2011; STALDER *et al.*, 2012; GILLINGS, 2014; GILLINGS *et al.*, 2015; POEY; LAVIÑA, 2018).

Como mencionado, nenhuma amostra possui *integron* de classe 2. Diversos trabalhos demonstram que a frequência desta classe de *integron* em amostras de *E. coli* é menor que a frequência de *integrons* de classe 1 (FIGUEIRA; SERRA; MANAIA, 2011; SU *et al.*, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2017; SIDHU *et al.*, 2017).

Todas as 10 amostras que albergavam *integrons* de classe 1 apresentaram resultados positivos na PCR específica para a detecção de *integron* clínico de classe 1. Este resultado não implica na ausência de *integrons* de origem ambiental, uma vez que mais de um *integron* pode estar presente em uma mesma amostra bacteriana, ou seja, *integrons* das
5 duas origens podem coexistir. Esta variante do *integron* de classe 1 está sendo encontrada em elementos genéticos móveis que são livremente transmitidos entre bactérias exógenas e aquelas consideradas membros da microbiota indígena de seres humanos, sendo sua presença associada a ambientes com ações antrópicas (GILLINGS *et al.*, 2015; GILLINGS, 2017).

10 Estes resultados indicam que estas amostras já colonizaram ambientes hospitalares e/ou receberam, por transferência horizontal, estes elementos genéticos em ambientes não clínicos, o que explicaria a presença dos mesmos em amostras bacterianas isoladas de água para consumo. Embora a pesquisa de *E. coli* uropatogênica não tenha sido realizada para que se pudesse excluir a presença deste patógeno, estas amostras,
15 provavelmente, são originadas da microbiota indígena de seres humanos e/ou outros animais que atingem os ambientes aquáticos via efluentes urbanos e rurais, já que, segundo Moreira (2018), estas amostras portadoras de *integrons* não pertencem aos principais patotipos dirreioigênicas de *E. coli*.

Das dez amostras bacterianas positivas para *intI1*, duas são portadoras de cassetes gênicos de *integrons* de classe 1. Estas duas amostras foram recuperadas de uma
20 amostra de água coletada na Escola de Farmácia da UFOP. Ambas possuem perfil de multirresistência, apresentando-se resistentes a um conjunto de antimicrobianos diferente, inclusive no número de casos de resistência que cada amostra apresenta. A amostra 45A1M apresentou resistência a três antimicrobianos de três classes, sendo estes
25 ampicilina, ácido nalidíxico e sulfametoxazol-trimetoprima. A amostra 45A2M apresentou resistência a sete antimicrobianos de cinco classes, sendo estes ceftazidima, aztreonam, ciprofloxacina e levofloxacina, além dos três presentes na primeira amostra. Embora o perfil de multirresistência tenha sido encontrado nas duas amostras portadoras de cassetes gênicos, é importante ressaltar que outras 35 amostras bacterianas que também
30 apresentaram perfil de multirresistência não possuem cassetes gênicos, sendo 34 destas negativas também para a presença de *integrons*. De modo geral, estes dados indicam que os fenótipos de multirresistência destas amostras estão sendo conferidos por genes que não se encontram associados a *integrons*, sugerindo o envolvimento de outros elementos

genéticos no carreamento e expressão dos genes responsáveis pelos distintos perfis de suscetibilidade apresentados pelas amostras multirresistentes.

Como citado, a amostra de água contaminada com *E. coli* portadora de *integron* de classe 1 foi coletada na Escola de Farmácia da UFOP. A água utilizada para o consumo no *campus* Morro do Cruzeiro é oriunda do poço artesiano do Centro de Convenções da UFOP, a qual é bombeada e enviada até o *campus* (<http://www.ufop.br/noticias/campi/ajude-economizar-agua>). Embora a utilização de águas subterrâneas para o consumo possa ser uma boa alternativa, uma vez que apresentam qualidade geralmente superior do ponto de vista microbiológico, quando comparada com águas superficiais (NEVES *et al.*, 2002), a única amostra de água, dentre todas as amostras coletadas nos três municípios estudadas, que apresentou contaminação por amostras bacterianas portadoras de *integrons* é oriunda deste poço. Além desta, outras oito amostras coletadas em distintas unidades do *campus* da UFOP e que também recebem água deste poço estavam contaminadas com amostras de *E. coli*. Estas amostras foram coletadas em diferentes meses, sendo a primeira contaminação detectada no mês de novembro de 2014 e a última no mês de dezembro de 2015, o que aponta que a contaminação da água utilizada no campus da UFOP ocorre de forma recorrente.

Entretanto, a coleta de amostras de água com resultados negativos para a presença de *E. coli*, assim como a presença de amostras bacterianas portadoras de *integrons* em apenas uma das amostras, pode ser um indício de que a contaminação destas amostras de água esteja ocorrendo durante o seu percurso no sistema de distribuição e não na fonte. Segundo Fonseca e Prado (2006), um dos problemas existentes no município de Ouro Preto é exatamente o mau estado de conservação de alguns trechos de tubulações do sistema de distribuição de água. Esta situação pode ser a responsável pela chegada de águas contaminadas no seu destino final, podendo, inclusive, tornar águas potáveis impróprias ao consumo humano.

5.3 GENOTIPAGEM DE AMOSTRAS DE *E. coli*

Nas 44 amostras submetidas ao sequenciamento da região hipervariável do gene *rpoB*, foram detectadas três diferentes sequências nucleotídicas, ou seja, três “sequências tipo” (APÊNDICE B - Sequências nucleotídicas das amostras de *Escherichia*

coli multirresistentes e ou portadoras de *integrons* de classe 1). Deste modo, infere-se que estas 45 amostras estão distribuídas em três grupos de *E. coli*. Todos os três grupos estão associadas aos variados perfis de multirresistência observados. Já em relação à presença de *integrons* de classe 1, há apenas um grupo associado, e a característica não é observada em todos os membros do grupo.

Para cada uma das três sequências nucleotídicas obtidas, foram detectadas diversas linhagens de *E. coli* que apresentavam 100% de similaridade. No entanto, o alinhamento de cada uma das sequências ocorreu com um grupo específico de linhagens, de modo que não houve alinhamento, com 100% de similaridade, de nenhuma linhagem com mais de uma das três sequências obtidas. Deste modo, embora não seja possível identificar quantas e quais linhagens compõem cada um dos três grupamentos, é mais provável que cada grupamento seja composto por linhagens diferentes. Assim, diferentes linhagens estariam envolvidas nos casos de multirresistência em cada um dos grupamentos formados.

Trinta (68,2%) amostras que apresentaram sequências idênticas foram reunidas, dando origem ao grupamento microbiológico denominado *E. coli* 1. Este foi o grupo mais representativo entre as amostras multirresistentes e foi o único no qual amostras bacterianas apresentaram *integrons* de classe 1. Além de ser o grupo mais prevalente entre as amostras bacterianas analisadas, foi, também, o mais disseminado, estando presente em 15 (83,3%) das 18 amostras de água das quais bactérias empregadas nesta análise foram recuperadas.

Outras nove (20,5%) amostras, que apresentaram sequências idênticas, originaram o grupamento microbiológico nomeado *E. coli* 3. Este foi o segundo grupo mais prevalente entre as amostras multirresistentes, estando presente em cinco (27,8%) das 18 amostras de água incluídas nesta análise. O terceiro e menor grupamento formado, denominado *E. coli* 5, foi composto por apenas três (6,8%) das 44 amostras bacterianas que foram coletadas de duas (10,5%) das 19 amostras de água.

Uma amostra bacteriana apresentou duas sequências distintas, compatíveis com aquelas que compõem os grupamentos *E. coli* 1 e *E. coli* 5. Estas sequências foram encontradas em uma proporção de 26,6% e 73,4%, respectivamente. Outras duas amostras não foram identificadas. De modo geral, resultados conclusivos foram obtidos para 42 (95,5%) das 44 amostras bacterianas analisadas.

Como dito anteriormente, as 44 amostras bacterianas empregadas nesta análise são oriundas de 18 amostras de água. Destas, 10 amostras foram coletadas no município de Ouro Preto e oito em Itabirito. Nenhuma amostra de água do município de Mariana estava envolvida nesta análise, visto que não foram recuperadas amostras bacterianas multirresistentes e ou portadoras de *integrons* nas mesmas.

Amostras bacterianas dos três grupos foram recuperadas em amostras de água coletadas nos dois municípios. As amostras bacterianas do grupamento *E. coli* 1 foram recuperadas de sete amostras de água coletadas no município de Ouro Preto e oito amostras de água coletadas no município de Itabirito. Estes resultados demonstram a importância das amostras deste grupo de *E. coli* no contexto do estudo de potabilidade de água para consumo destes municípios. Segundo Coleman e colaboradores (2013), a água constitui uma importante via de disseminação de genes de resistência entre populações humanas e, nos municípios de Ouro Preto e Itabirito, este grupo de microrganismos, amplamente distribuído entre as amostras de água representadas nesta análise, possui papel importante na disseminação e expressão de diversos marcadores de resistência a antimicrobianos. Os perfis distintos de multirresistência apresentado evidenciam o quão vasto é o arsenal de marcadores de resistência carregado por amostras deste grupo. É importante ressaltar que, além da presença destes marcadores, a presença dos *integrons* em algumas das amostras deste grupamento pode favorecer a expressão de marcadores de resistência, já presentes ou a serem adquiridos, uma vez que, segundo Poey e Laviña (2018), os *integrons* possuem promotores que podem, de maneira autônoma, fazer a transcrição de genes envolvidos com a resistência a antimicrobianos.

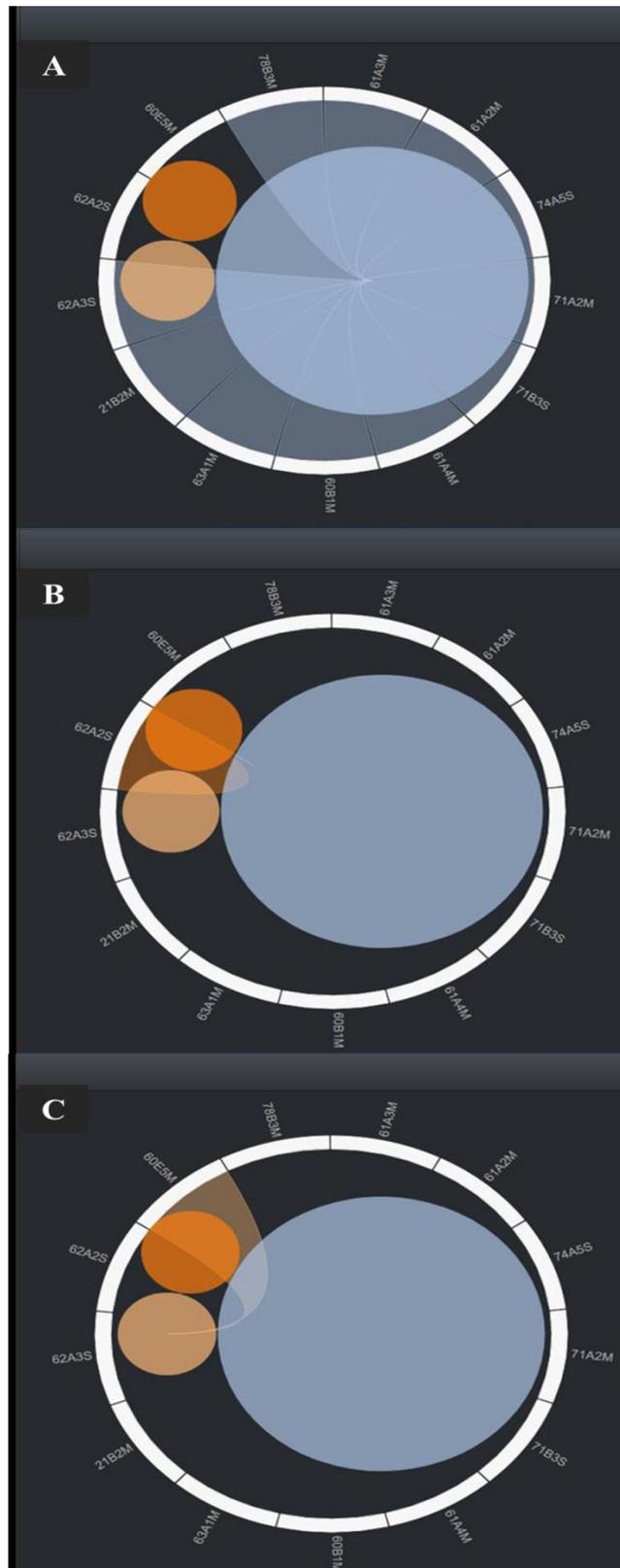
Embora os grupamentos *E. coli* 3 e *E. coli* 5 tenham sido menos frequentes no grupo de amostras multirresistentes, é importante ressaltar a presença de representantes destes dois grupos em amostras de água coletadas em diferentes municípios. Este dado indica que, embora estes grupamentos sejam menos representativos, sendo o grupamento *E. coli* 5 encontrado de forma mais pontual, o fato de estarem presentes em amostras de água dos dois municípios indica que podem se tratar, assim como o grupamento *E. coli* 1, de grupos compostos por bactérias de ampla distribuição no ambiente. Vale, ainda, ressaltar que as amostras bacterianas não portadoras de *integrons* de classe 1 e ou perfil multirresistente não foram contempladas nesta análise, o que pode ter reduzido o número de grupamentos formados e ou o número de amostras integrantes de cada grupamento. Os três grupamentos formados, compostos pelas 42 amostras identificadas, podem ser

visualizados nas Figuras 5 e 6 para as amostras coletadas nos municípios de Ouro Preto e Itabirito, respectivamente.

A presença desses grupamentos, em especial do grupamento *E. coli* 1, em diversas amostras de água, sugere uma fonte de contaminação comum entre as amostras de
5 água envolvidas e ou a disseminação destes grupos bacterianos entre diferentes fontes de contaminação presentes nos dois municípios. Assim, a determinação das variantes genéticas envolvidas nos mais diversos casos de contaminação é importante para traçar as rotas de contaminação, assim como as fontes envolvidas, possibilitando a tomada de ações que possam mitigar os mais diversos casos de contaminação microbiana. Entretanto, para isso,
10 é necessário, também, analisar os microrganismos presentes nas supostas fontes de contaminação, a critério de comparação. Embora esta análise não tenha sido contemplada nos objetivos deste estudo, os dados gerados poderão ser usados para análises futuras, subsidiando comparações com outras amostras de *E. coli*. De todo modo, é preocupante o fato de que distintas amostras de *E. coli* que expressam variados perfis de multirresistência
15 estejam contaminando diferentes amostras de água destinadas ao consumo nos municípios de Ouro Preto e Itabirito.

A distribuição temporal destas amostras pôde ser avaliada em duas fontes de água que apresentaram amostras contaminadas com bactérias multirresistentes em momentos distintos. Na Unidade Básica de Saúde Nossa Senhora de Fátima, no município
20 de Itabirito, estas amostras multirresistentes foram recuperadas de duas amostras de água (amostras 60 e 74), coletadas nos meses de outubro e dezembro de 2015. No primeiro momento, três amostras bacterianas recuperadas apresentaram perfil de multirresistência e foram submetidas a esta análise, sendo cada uma delas pertencente a um grupamento distinto. No segundo momento, apenas uma amostra bacteriana foi analisada e esta
25 correspondeu ao grupamento *E. coli* 1. O outro ponto de amostragem de água que apresentou amostras bacterianas multirresistentes em momentos distintos de coleta foi a Escola de Farmácia da UFOP, na qual a contaminação por estas amostras bacterianas foi detectada nos meses de agosto e novembro de 2015 (amostras 45 e 67). Na primeira coleta, foram recuperadas 11 amostras multirresistentes e ou portadoras de *integrons* de classe 1.
30 Representantes de dois dos três grupamentos estavam presentes. As 10 amostras portadoras de *integrons*, sendo três destas também multirresistentes, pertencem ao grupamento *E. coli* 1 e a outra amostra, pertence ao grupamento *E. coli* 3. Da segunda coleta, quatro amostras bacterianas foram analisadas, sendo todas pertencentes ao grupamento *E. coli* 1.

FIGURA 6: Distribuição das 13 amostras de *Escherichia coli* no município de Itabirito.



LEGENDA: A: grupamento *E. coli* 1. B: grupamento *E. coli* 3. C: grupamento *E. coli* 5.

A presença do mesmo grupamento, *E. coli* 1, em coletas realizadas da mesma água em períodos diferentes pode, nos dois pontos de amostragem citados acima, indicar a atuação de uma fonte de contaminação recorrente destas águas. É importante ressaltar que outras amostras bacterianas coletadas das amostras de água mencionadas não foram analisadas por não se enquadrarem no critério de seleção para esta etapa do estudo, de tal modo que a presença de bactérias dos grupamentos não detectados não está descartada nestas águas.

5.4 PESQUISA DE INTEGRONS EM AMOSTRAS DE ÁGUA PARA CONSUMO

O ambiente aquático, como já discutido anteriormente, apresenta microrganismos portadores de *integrons* com frequência variável. Embora a capacidade dos *integrons* em conferir fenótipo de multirresistência a antimicrobianos já seja reconhecida, o que os torna elementos genéticos importantes na disseminação de resistência antimicrobiana, é provável que, até o momento, sua descrição e compreensão em populações naturais não tenham sido totalmente exploradas (AMOS *et al.*, 2018). Neste estudo, a presença do gene *intI1* foi, também, avaliada, de modo independente de cultivo, em amostras de água para consumo do município de Ouro Preto, por PCR em tempo real. Esta se trata de uma versão modificada da PCR convencional, cuja principal vantagem é a possibilidade de obtenção de dados quantitativos com acurácia e sensibilidade elevadas (NAVARRO *et al.*, 2015).

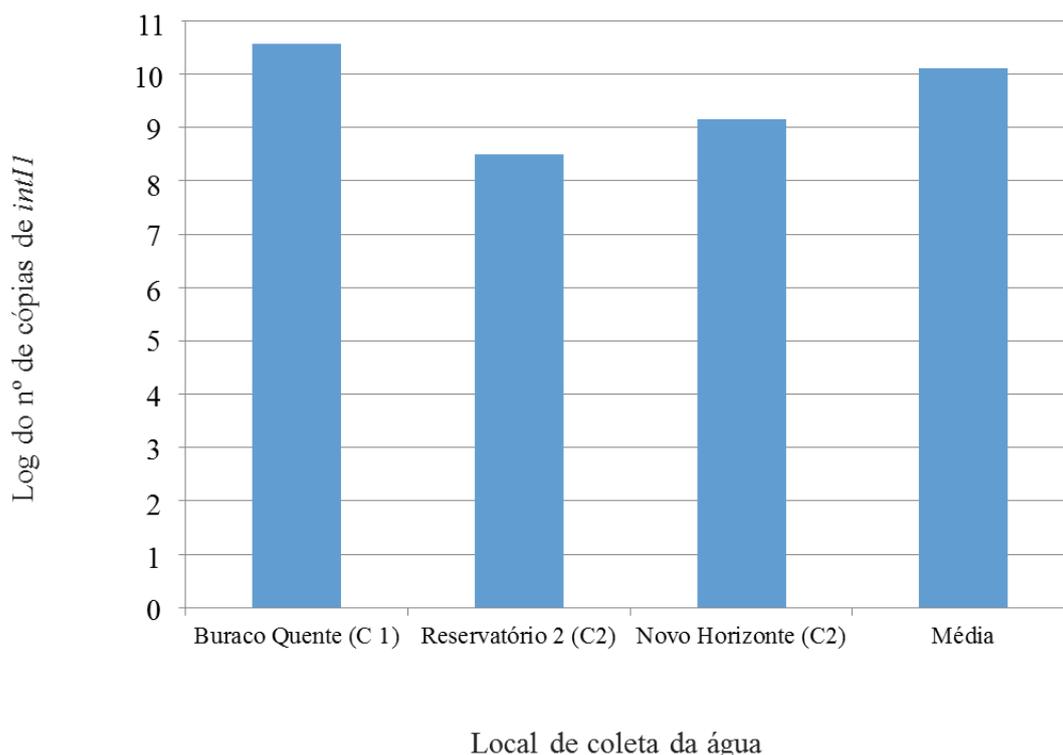
A curva padrão é um passo importante da técnica e deve ser bem planejada. Dessa forma, para a construção da curva padrão fidedigna, foi utilizado o produto de amplificação originado do *pool* de todas as amostras de DNA obtidas das amostras de água utilizadas neste estudo. Assim, o material assemelha-se às amostras tanto quanto possível, seja na presença de interferentes para a qPCR (que são abundantes em DNA extraído de amostras complexas, como é o caso das águas), seja no conteúdo CG de diferentes genes de procariotos, que levaria à formação de mais de um pico na curva de *melting* (HARDWICK *et al.*, 2008; CARDINALI-REZENDE *et al.*, 2012). As curvas padrão foram geradas para cada marcador gênico pesquisado, apresentando coeficiente de correlação (r) 0,99 e 0,9857, com *slope* de -3,0879 e -4,142 e com eficiência das reações de

111% e 74%, respectivamente para os genes rDNA 16s e *intI1*. As análises das curvas de *melting* comprovam a especificidade dos iniciadores empregados (APÊNDICE C - Curvas padrão para a quantificação dos marcadores gênicos pesquisados; APÊNDICE D - Perfis de amplificação observados para os marcadores gênicos pesquisados; APÊNDICE E - Curvas de *melting* observadas para os marcadores gênicos pesquisados).

O gene *intI1* foi detectado (valores acima do limite mínimo de detecção) em três das 14 amostras de água analisadas. Foi detectada uma média de $1,29 \times 10^{10}$ cópias do marcador *intI1* por litro de água filtrado destes três pontos. O log do número de cópias de *intI1* detectado em cada uma das três amostras de água é mostrado no Gráfico 3.

10

GRÁFICO 3 - Log do número de cópias do gene *intI1* por litro de água filtrado.



LEGENDA: C1: coleta 1; C2: coleta 2.

15

Embora tenham sido feitas duas coletas em cada um dos sete pontos de amostragem, uma na estação chuvosa e outra na estação seca, com o objetivo de avaliar as

possíveis implicações sazonais na presença do gene *intI1* em diversas fontes de água utilizadas para o consumo no município de Ouro Preto, esta avaliação não foi realizada devido às possíveis implicações do baixo índice de eficiência mostrado pelos iniciadores utilizados para a detecção e quantificação deste gene. Pelo mesmo motivo, a comparação
5 entre os pontos, assim como a comparação das amostras no pré e pós-tratamento, no caso das águas do sistema público de captação e distribuição, não foi realizada. Tendo em vista que a eficiência dos iniciadores está relacionada com a sua sensibilidade, ou seja, a sua capacidade de detectar e quantificar o marcador em questão, é possível que amostras que apresentaram log do número de cópias do gene *intI1* abaixo do limite mínimo de detecção,
10 mas com valores próximos a este, possam se tratar de amostras passíveis de serem adequadamente analisadas, mas que apresentaram resultados insatisfatórios devido à baixa sensibilidade da reação de amplificação utilizada. Por outro lado, os iniciadores se mostraram específicos para o marcador em questão, o que foi evidenciado pelas curvas de *melting*, e puderam, mesmo com a já mencionada sensibilidade inadequada, detectar e
15 quantificar o gene *intI1* em três amostras de água com valores acima do limite mínimo de detecção.

A quantificação do rDNA 16s também foi realizada, com o objetivo de se estimar o número de células bacterianas presentes na água e, conseqüentemente, estimar a proporção de células portadora de *integrons*. Entretanto, considerando a discussão
20 referente à baixa sensibilidade da reação para quantificação de *intI1*, esta análise não foi realizada.

Duas das três amostras de água que apresentaram resultados com valores acima do limite mínimo de detecção foram coletadas no Buraco Quente e no Novo Horizonte. São originadas de fontes alternativas e não são submetidas a qualquer tipo de tratamento.
25 Os resultados acima mostram que a população que faz uso destas duas fontes de água está exposta a estes elementos genéticos que, como discutido anteriormente, estão associados à aquisição e expressão de genes que conferem resistência a antimicrobianos, além de serem horizontalmente transferidos a outras bactérias (GILLINGS, 2014; AN *et al.*, 2018). Assim, a presença destes elementos na água para consumo pode levar a alterações na
30 microbiota indígena com o surgimento de novas linhagens resistentes a antimicrobianos. Além da possível implicação na microbiota e, conseqüentemente, na saúde humana, estes elementos também estão envolvidos na disseminação de genes de resistência entre bactérias ambientais. Segundo MA e colaboradores (2017), *integrons*, dentre outros

elementos genéticos, podem desempenhar um papel importante na transferência de genes de resistência a antimicrobianos entre microrganismos ambientais.

Segundo Giebułtowicz e colaboradores (2017), vários estudos têm mostrado a correlação entre altas concentrações de *integrons* de classe 1 e atividades antropogênicas.

5 As bactérias que carregam estes elementos genéticos podem ser lançadas em grandes números nestas águas, por fluxos de resíduos provenientes de seres humanos e outros animais. Tendo em vista que, segundo Moraes (2018), o município de Ouro Preto apenas coleta e descarta os efluentes gerados em seu território nos corpos d'água, sem nenhum tipo de tratamento, é provável que isso esteja contribuindo não só para a contaminação de
10 algumas águas com microrganismos de origem fecal, como já discutido anteriormente, como também na deposição destes elementos genéticos que podem apresentar papel importante na resistência a antimicrobianos. Segundo AN e colaboradores (2018), além de eliminar microrganismos reconhecidamente patogênicos, o tratamento de efluentes reduz significativamente a abundância de *integrons* e a diversidade de cassetes gênicos
15 associados a eles. Assim, o tratamento adequando dos efluentes gerados no município de Ouro Preto poderia melhorar o atual cenário no qual se encontram algumas fontes de água destinadas ao consumo neste município.

Além da deposição de *integrons* em ambientes aquáticos, as atividades antropogênicas podem contribuir também para a manutenção e aumento da prevalência
20 destes elementos. Segundo Giebułtowicz (2017), a presença do segmento conservado 3' nos *integrons* de classe 1, o qual confere resistência a compostos quaternários de amônia, pode selecionar os microrganismos portadores destes elementos, já que este é um composto amplamente utilizado como ingrediente de desinfetantes que, juntamente com antimicrobianos, contaminam os corpos d'água, selecionando microrganismos portadores
25 de *integrons* e genes de resistência. Deste modo, a contaminação das fontes de água com efluentes não tratados parece ser de grande importância na manutenção e disseminação de genes de resistência em ambientes naturais e também entre populações humanas.

A água do reservatório 2 é de origem subterrânea e faz parte do sistema público de captação e distribuição de água do município de Ouro Preto. Após a captação, a água é
30 armazenada em tanques e submetida ao processo de cloração, o qual promove a desinfecção da água que é distribuída a uma parcela da população de Ouro Preto. Como anteriormente discutido, águas subterrâneas geralmente são mais preservadas que águas superficiais. No entanto, a presença de *integrons* foi detectada em níveis acima do limite

mínimo de detecção nesta fonte de água, o que pode indicar uma possível contaminação desta fonte. É importante ressaltar que esta água foi amostrada no seu ponto de captação, que é a céu aberto, de modo que, neste ponto, a água pode não apresentar a mesma qualidade microbiológica que apresenta no subsolo.

5

10

15

20

6 SÍNTESE DOS RESULTADOS E CONCLUSÃO

- 5 - Foi detectada contaminação por coliformes totais em 92 (7,8 %) das 1.185 amostras de água para consumo coletadas nos municípios de Ouro Preto, Mariana e Itabirito, sendo 49 (4,1%) amostras contaminadas com microrganismos da espécie *E. coli*.
- Águas contaminadas com *E. coli* foram coletadas de diversos locais que concentram populações de risco, como instituições de ensino e lar de idosos, assim como em locais com grande fluxo de pessoas, como unidades de saúde e universidade.
- 10 - Um total de 423 amostras de *E. coli* foram recuperadas de amostras de água para consumo utilizadas nos três municípios.
- Resistência a antimicrobianos foi detectada em 146 (34,5%) das 423 amostras de *E. coli*, sendo que 37 (8,7%) amostras possuíam perfil de multirresistência, os quais são amplamente diversificados entre si.
- Nenhum dos 22 antimicrobianos, contemplando oito classes, foi eficaz contra todas as 15 423 amostras de *E. coli* testadas.
- Em relação à presença de *integrans*, 10 (2,4 %) das 423 amostras de *E. coli* apresentaram resultados positivos para a presença de *integron* de classe 1, sendo todas positivas para a presença da variante denominada *integron* clínico de classe 1. Nenhuma amostra carregava *integron* de classe 2.
- 20 - Das 10 amostras portadoras de *integron* de classe 1, duas (20,0 %) apresentavam cassetes gênicos associados a este elemento genético.
- As 44 amostras portadoras de *integrans* de classe 1 e ou multirresistentes foram divididas em três grupamentos genéticos, cada qual constituído por amostras que apresentavam sequências nucleotídicas essencialmente idênticas.
- 25 - Três fontes de água utilizadas para consumo no município de Ouro Preto apresentaram quantificação do gene *intI1* acima do limite mínimo de detecção, evidenciando a circulação destes elementos genéticos nestas águas.

Assim, pode-se concluir que parte das águas utilizadas para o consumo humano nos municípios de Ouro Preto, Mariana e Itabirito está atuando na veiculação de *E. coli* com distintos perfis genéticos e de resistência a antimicrobianos, evidenciando a contaminação destas amostras de água com matéria orgânica de origem fecal, assim como na disseminação de genes de resistência e elementos genéticos, inclusive de origem clínica, que são classicamente associados à resistência a antimicrobianos. Desta forma, parte da população, incluindo populações mais suscetíveis a contraírem doença diarreica, está exposta aos riscos potenciais associados ao consumo de água não potável. Estes resultados demonstram a necessidade de monitoramento constante da qualidade da água destinada ao consumo humano nestes municípios e fornece informações que podem auxiliar na tomada de decisões que visem a evitar a utilização de águas impróprias ao consumo humano.

15

20

REFERÊNCIAS

- ACOSTA-PÉREZ, G. Structural Diversity of Class 1 Integrons in Multiresistant Strains of *Escherichia coli* Isolated from Patients in a Hospital in Mexico City. *Curr Microbiol*, v. 4, p. 501-8, 2015.
- ADÉKAMBI, T; DRANCOURT, M; RAOULT, D. The *rpoB* gene as a tool for clinical microbiologists. *Trends Microbiol*, v. 17, p. 37-45, 2009.
- ADESOJI, A. T; OGUNJOBI, A. A; OLATOYE, I. O. Characterization of integrons and sulfonamide resistance genes among bacteria from drinking water distribution systems in southwestern Nigeria. *Chemotherapy*, v. 62, p. 34-42, 2017.
- AHMED, A. M. *et al.* Zoo animals as reservoirs of gram-negative bacteria harboring integrons and antimicrobial resistance genes. *Appl and Environ Microbiol*, v. 73, p. 6686-90, 2007.
- ALLEN, M. J. *et al.* Drinking water microbial myths. *Crit Rev Microbiol*, v.41, p. 366-73, 2015.
- AMOS, G. C. A. *et al.* The widespread dissemination of integrons throughout bacterial communities in a riverine system. *ISME J*, v. 12, p. 681-91, 2018.
- AN, X. L. Impact of Wastewater Treatment on the Prevalence of Integrons and the Genetic Diversity of Integron Gene Cassettes. *Appl Environ Microbiol*, v. 84, p. 1-33, 2018.
- BAQUERO, F.; MARTINEZ, J. L.; CANTON, R. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Curr Opin Biotechnol*, v.19, p.260-5. 2008.
- BARRERA, S. *et al.* Changes in dominant *Escherichia coli* and antimicrobial resistance after 24 hr in fecal matter. *Microbiologyopen*: p. 1-6, 2018.
- BERGEY'S MANUAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY. The Proteobacteria. 2nd Edition. Published by Springer, New York, 848 p. 2005.

- BHAR, D. *et al.* Utilization of safe drinking water and sanitary facilities in slum households of Siliguri, West Bengal. *Indian J Public Health*, v. 61, p. 248-53, 2017.
- BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Fármacos no meio ambiente. *Quim. Nova*, v.26, p.523-530, 2003.
- 5 BLEIBTREU, A. *et al.* Fitness, stress resistance, and extraintestinal virulence in *Escherichia coli*. *Infect Immun*, v.81, p. 2733-42, 2013.
- BRIANCESCO, R. Microbial indicators and fresh water quality assessment. *Ann Ist Super Sanita*. v. 41, p. 353-8, 2005.
- CABRAL, J. P. S. Water microbiology. Bacterial pathogens and water. *Int J Environ Res Public Health*, v.7, p.3657-703, 2010.
- 10 CAMBRAY, G.; GUEROUT, A. M.; MAZEL, D. Integrons. *Annu Rev Genet*, v.44, p.141-66, 2010.
- CARDINALI-REZENDE, J. *et al.* Prokaryotic diversity and dynamics in a full-scale municipal solid waste anaerobic reactor from start-up to steady-state conditions. *Bioresour Techno*, v. 119, p. 373-383, 2012.
- 15 CASE, R.J. *et al.* Use of 16S rRNA and *rpoB* genes as molecular markers for microbial ecology studies. *Appl Environ Microbiol*, v. 73, p. 278-88, 2007.
- CHO, S. Prevalence and characterization of *Escherichia coli* isolated from the Upper Oconee Watershed in Northeast Georgia. *PLoS One*, v. 13, p. 1-15, 2018.
- 20 CHRISTOFF, A. P. *et al.* Bacterial identification through accurate library preparation and high-throughput sequencing. *White Paper: Bacterial NGS Sequencing*, 2017.
- CLEMENTS, A. *et al.* Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Gut Microbes*, v.3, p.71-87, 2012.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance Standards
25 for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement. CLSI document M100-S23. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2013.

- COLEMAN, B. L. *et al.* The role of drinking water in the transmission of antimicrobial-resistant *E. coli*. *Epidemiol Infect*, v. 4, p. 633-42, 2011.
- COLEMAN, B. L. *et al.* Contamination of Canadian private drinking water sources with antimicrobial resistant *Escherichia coli*. *Water Res*, v. 9, p. 3026-36, 2013.
- 5 CONTE, M. P. *et al.* Adherent-invasive *Escherichia coli* (AIEC) in pediatric Crohn's disease patients: phenotypic and genetic pathogenic features. *BMC Research Notes*, v.7, p.748-60, 2014.
- CROXEN, M. A.; FINLAY, B. B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat Rev Microbiol*, v.8, p.26-38, 2010.
- 10 DA SILVA, G. J.; MENDONCA, N. Association between antimicrobial resistance and virulence in *Escherichia coli*. *Virulence*, v.3, p.18-28, 2012.
- DALLAGASSA, C. B. *et al.* Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry analysis of *Escherichia coli* categories. *Genet Mol Res*, v.13, p.716-22, 2014.
- 15 DAN, T. *et al.* A novel multi-locus sequence typing (MLST) protocol for *Leuconostoc lactis* isolates from traditional dairy products in China and Mongolia. *BMC Microbiol*, v.14, p. 1-9, 2014.
- DAN, T. *et al.* The evolution and population structure of *Lactobacillus fermentum* from different naturally fermented products as determined by multilocus sequence typing (MLST). *BMC Microbiol*, v.15, P. 2-11, 2015.
- 20
- DEVANGA RAGUPATHI, N. K. *et al.* Accurate differentiation of *Escherichia coli* and *Shigella* serogroups: challenges and strategies. *New Microbes New Infect*, v. 21, p. 58-62, 2018.
- DOMINGUES, S.; SILVA, G. J.; NIELSEN, K. M. Integrons: Vehicles and pathways for horizontal dissemination in bacteria. *Mob Genet Elements*, v.2, p.211-223, 2012.
- 25
- DOS REIS, V. W. Fatores de risco da diarreia humana associado às condições de saneamento básico em Ouro Preto, MG. 2007. 84 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia

Ambiental com Ênfase no Uso e Conservação de Recursos Hídricos) - Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto 2007.

- FIGUEIRA, V.; SERRA, E.; MANAIA, C.M. Differential patterns of antimicrobial resistance in population subsets of *Escherichia coli* isolated from waste- and surface waters. *Sci Total Environ*, v. 6. p. 1017-23, 2011.
- 5
- FLEECE, M. E. *et al.* Molecular diagnosis of antimicrobial resistance in *Escherichia coli*. *Expert Rev Mol Diagn*, v. 3, p. 207-17, 2018.
- FONSECA, A. F. C.; PRADO, J. F. Um importante episódio na história da gestão dos recursos hídricos no Brasil: o controle da coroa portuguesa sobre o uso da água nas minas de ouro coloniais. *Revista Brasileira de Recursos Hídricos*, v.11, p.5-14, 2006.
- 10
- FOX, J. G. *et al.* Intracellular Campylobacter-like organism from ferrets and hamsters with proliferative bowel disease is a *Desulfovibrio* sp. *J Clin Microbiol*, v. 32, p. 1229-37, 1994.
- FRATAMICO, P. M. *et al.* Advances in Molecular Serotyping and Subtyping of *Escherichia coli*. *Front Microbiol*, v. 7, p. 1-8, 2016.
- 15
- GIEBULTOWICZ, J. *et al.* Occurrence of antimicrobial agents, drug-resistant bacteria, and genes in the sewage-impacted Vistula River (Poland). *Environ Sci Pollut Res Int*. v. 25, p. 5788-5807, 2018.
- GIEDRAITIENE, A. *et al.* Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria. *Medicina (Kaunas)*, v.47, p.137-46, 2011.
- 20
- GILLINGS, M. R. Integrons: past, present and future. *Microbiol Mol Biol Rev*, v. 78, p. 257-277, 2014.
- GILLINGS, M. R. *et al.* Using the class 1 integron-integrase gene as a proxy for anthropogenic pollution. *ISME Journal*, v.9, p.1269-79, 2015.
- GILLINGS, M. R. Class 1 integrons as invasive species. *Curr Opin Microbiol*, v. 38, p. 10-15, 2017.
- 25
- GONI-URRIZA, M. *et al.* Impact of an urban effluent on antibiotic resistance of riverine *Enterobacteriaceae* and *Aeromonas* spp. *Appl Environ Microbiol*, v.66, p.125-32, 2000.

- GUO, X. Genetic diversity analyses of class 1 integrons and their associated antimicrobial resistance genes in Enterobacteriaceae strains recovered from aquatic habitats in China. *Lett Appl Microbiol*, v. 6, p. 667-75, 2011.
- 5 GUZMÁN, B. L.; NAVA, G.; DÍAZ, P. La calidad del agua para consumo humano y su asociación con la morbimortalidad en Colombia, 2008-2012. *Biomédica*, v.35, p.177-90, 2015.
- HARDWICK, S. A. Quantification of class 1 integron abundance in natural environments using real-time quantitative PCR. *FEMS Microbiol Lett*, v. 278, p. 207-12, 2008.
- 10 JOCKENHÖFER, F. *et al.* Current detection rates of multiresistant gram negative bacteria (3MRGN, 4MRGN) in patients with chronic leg ulcers. *Hautarzt*, v. 11, p. 967-73, 2014.
- KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature*, v.2, p.123-40. 2004.
- 15 KIM, J.; LIM, J.; LEE, C. Quantitative real-time PCR approaches for microbial community studies in wastewater treatment systems: applications and considerations. *Biotechnol Adv*, v. 31, p. 1358-73, 2013.
- KUMMERER, K. Resistance in the environment. *J Antimicrob Chemother*, v.54, p.311-20, 2004.
- 20 LAROCHE, E. Occurrence of antibiotic resistance and class 1, 2 and 3 integrons in *Escherichia coli* isolated from a densely populated estuary (Seine, France). *FEMS Microbiol Ecol*, v. 1, p. 118-30, 2009.
- LA SCOLA, B. *et al.* Sequencing of the rpoB gene and flanking spacers for molecular identification of Acinetobacter species. *J Clin Microbiol*, v. 44, p. 827-32, 2006.
- LÉVESQUE, C. *et al.* PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 39, p. 185-191, 1995.
- 25 LEVIN, A. S. S, *et al.* Guia de referência de anti-infecciosos e recomendações para a prevenção de infecções hospitalares. Ed. 5, São Paulo. Hospital das Clínicas, 2012.

- LINDSEY, R. L. *et al.* Evaluating the Occurrence of *Escherichia albertii* in Chicken Carcass Rinses by PCR, Vitek Analysis, and Sequencing of the rpoB Gene. *Appl Environ Microbiol*, v. 81, p. 1727-34, 2015.
- LIMA, A. A. C.; FONTELES, M .C. From *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin to mammalian endogenous guanylin hormones. *Braz J Med Biol Res*, v.47, p.179-91, 2014.
- LOPEZ-PILA, J. M.; SZEWZYK, R. Estimating the infection risk in recreational waters from the faecal indicator concentration and from the ratio between pathogens and indicators. *Water Research*, v. 17, p. 4195-4200, 2000.
- MA, L. *et al.* The Prevalence of Integrons as the Carrier of Antibiotic Resistance Genes in Natural and Man-Made Environments. *Environ Sci Technol*, v. 51, p. 5721-8, 2017.
- MALHOTRA, S.; SIDHU, S. K.; DEVI, P. Assessment of bacteriological quality of drinking water from various sources in Amritsar district of northern India. *J Infect Dev Ctries*, v. 9, p. 844-848, 2015.
- MARTÍNEZ, M. J. F.; Carbapenems disponibles: propiedades y diferencias. *Enferm Infecc MicrobiolClin*, v. 28, p. 53-64, 2010.
- MCGANN, P. *et al.* *Escherichia coli* Harboring mcr-1 and blaCTX-M on a Novel IncF Plasmid: First Report of mcr-1 in the United States. *Antimicrob Agents Chemother*. v. 60, p. 4420-1, 2016.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Brasília, DF, 2011.
- MORAES, G. P. Avaliação da autodepuração e qualidade da água no Rio Maracujá, analisando a influência do distrito de Cachoeira do Campo – MG. 2018. 71 f. Monografia (Graduação em Engenharia Ambiental) – Escola de Minas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2018.
- MOREIRA, M. Pesquisa de *Escherichia coli* diarrreogênica em pontos de abastecimento de água para consumo georreferenciados, na mesorregião de Belo Horizonte, como modelo inovador de ação em Vigilância Epidemiológica. 2018. 88 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2018.

- MOSQUITO, S. *et al.* Molecular mechanisms of antibiotic resistance in *Escherichia coli*-associated diarrhea. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*, v. 28, p. 648-56, 2011.
- MUYZER, G.; DE WAAL, E. C.; UITTERLINDEN, A. G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol*, v. 59, p. 695-700, 1993.
- NAVAB-DANESHMAND, T. *et al.* *Escherichia coli* Contamination across Multiple Environmental Compartments (Soil, Hands, Drinking Water, and Handwashing Water) in Urban Harare: Correlations and Risk Factors. *Am J Trop Med Hyg*, v. 3, p. 803-13, 2018.
- 10 NAVARRO, E. *et al.* Real-time PCR detection chemistry. *Clinica Chimica Acta*, v. 439, p. 231-50, 2015.
- NEVES, K. O. *et al.* Evaluation of rotavirus rate on diarrhea and drinking water quality from poor neighbourhoods of Ouro Preto, Brazil. *Virus – Reviews and Research. J. Brazil. Socie. Virol*, v. 7, p. 12-22, 2002.
- 15 NEVES, K. O. Qualidade microbiológica da água de abastecimento público e alternativo no Município de Ouro Preto, MG. 2003. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental)- Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2003.
- NONTONGANA, N. *et al.* Prevalence and Antibigram Profiling of *Escherichia coli* Pathotypes Isolated from the Kat River and the Fort Beaufort Abstraction Water. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, v. 11, p. 8213-8227, 2014.
- 20 OLIVEIRA, P. L. Ocorrência de integrons em amostras de *Escherichia coli* diarreio gênica e espécimes fecais de crianças com e sem doença diarreica. 2017. 120 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2017
- 25 O'RYAN, M. *et al.* Vaccines for viral and bacterial pathogens causing acute gastroenteritis: Part I: Overview, vaccines for enteric viruses and *Vibrio cholerae*. *Hum Vaccin Immunother*, v. 11, p: 584-600, 2015.

- OZGUMUS, O. B. Molecular characterization of antibiotic resistant *Escherichia coli* strains isolated from tap and spring waters in a coastal region in Turkey. *J Microbiol*, v. 45, p. 379-87, 2007.
- PARTRIDGE, S. R. *et al.* Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance
5 integrons. *FEMS Microbiol Rev*, v.33, p.757-84, 2009.
- PEREIRA, A. *et al.* Genetic diversity and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* from Tagus estuary (Portugal). *Sci Total Environ*, v. 461-462, P. 65-71, 2013.
- POEY, M.E.; LAVIÑA, M. Horizontal transfer of class 1 integrons from uropathogenic *Escherichia coli* to *E. coli* K12. *Microb Pathog*, v. 117, p: 16-22, 2018.
- 10 RAMOS, A. M. Vigilância da Qualidade da Água para Consumo Humano: Avanços e Desafios nos Municípios da SRS Belo Horizonte (2007-2012). IV Seminário Internacional de Engenharia de Saúde Pública da FUNASA, 2013.
- RATAJCZAK, M. *et al.* Influence of hydrological conditions on the *Escherichia coli* population structure in the water of a creek on a rural watershed. *BMC Microbiol*, v.10,
15 p.222-31, 2010.
- RAZZOLINI, M. T. *et al.* Quality of water sources used as drinking water in a Brazilian peri-urban area. *Braz J Microbiol*, v. 42, p. 560-566, 2011.
- ROCHELLE-NEWALL, E. *et al.* A short review of fecal indicator bacteria in tropical aquatic ecosystems: knowledge gaps and future directions. *Front. Microbiol*, v. 6, p. 308-
20 20, 2015.
- ROSSER, S. J.; YOUNG, H. K. Identification and characterization of class 1 integrons in bacteria from an aquatic environment. *J Antimicrob Chemother*, v.44, p.11-8, 1999.
- SAGA, T; YAMAGUCHI, K. History of antimicrobial agents and resistant bacteria. *JMAJ*, v. 52, p.103-108, 2009.
- 25 SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular Cloning. A laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, N.Y.USA, 1989

- SAXENA, G. *et al.* Microbial indicators, pathogens and methods for their monitoring in water environment. *J. Water Health*, v. 100, p. 223-30, 2015.
- SHARMA, B. *et al.* Occurrence of multidrug resistant *Escherichia coli* in groundwater of Brij region (Uttar Pradesh) and its public health implications. *Vet World*, v. 10, p. 293-301, 5 2017.
- SHI, P. *et al.* Metagenomic insights into chlorination effects on microbial antibiotic resistance in drinking water. *Water Res*, v. 47, p. 111-20, 2013.
- SIDHU, J. P. S. *et al.* Comparative prevalence of *Escherichia coli* carrying virulence genes and class 1 and 2 integrons in sub-tropical and cool temperate freshwater. *Environ Sci* 10 *Pollut Res Int*, v. 22, p. 18263-72, 2017.
- SKURNIK, D. *et al.* Integron-associated antibiotic resistance and phylogenetic grouping of *Escherichia coli* isolates from healthy subjects free of recent antibiotic exposure. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 49, p. 3062-65, 2005.
- SINGH, N. S; SINGHAL, N; VIRDI, J. S. Genetic Environment of *bla*_{TEM-1}, *bla*_{CTX-M-15}, 15 *bla*_{CMY-42} and Characterization of Integrons of *Escherichia coli* Isolated From an Indian Urban Aquatic Environment. *Front Microbiol*, v. 9, p. 1-8, 2018.
- SPECIAL FEATURE: *Escherichia coli*, 1885-1985. *J Hyg (Lond)*, v.95, p.521, 1985.
- STALDER, T. *et al.* Integron involvement in environmental spread of antibiotic resistance. *Front Microbiol*, v.3, p.119-32, 2012.
- 20 SU, J. *et al.* Analysis of integrons in clinical isolates of *Escherichia coli* in China during the last six years. *FEMS Microbiol Lett*, v. 254, p. 75-80, 2006.
- SU, H. C. *et al.* Class 1 and 2 integrons, *sul* resistance genes and antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolated from Dongjiang River, South China. *Environ Pollution*, v. 169, p. 42-49, 2012.
- 25 SZMOLKA, A.; NAGY, B. Multidrug resistant commensal *Escherichia coli* in animals and its impact for public health. *Front Microbiol*, v.4, p.258, 2013.

THANI, T. S. *et al.* Isolation and characterization of *Escherichia coli* pathotypes and factors associated with well and boreholes water contamination in Mombasa County. *Pan Afr Med J*. v. 22, p. 1-11, 2016.

5 TOUCHON, M. *et al.* Organised genome dynamics in the *Escherichia coli* species results in highly diverse adaptive paths. *PLoS Genet*, v.5, p.e1000344, 2009.

VARELA, A. R. Genetic characterization of fluoroquinolone resistant *Escherichia coli* from urban streams and municipal and hospital effluents. *FEMS Microbiol Ecol*, v. 91, p. 1-12, 2015.

10 VAZ-MOREIRA, I. *et al.* Multidrug Resistance in Quinolone-Resistant Gram-Negative Bacteria Isolated from Hospital Effluent and the Municipal Wastewater Treatment Plant. *Microb Drug Resist*. v. 22, p. 155-63, 2015.

VERSTRAETE, K. *et al.* A qPCR Assay to Detect and Quantify Shiga Toxin-Producing *E. coli* (STEC) in Cattle and on Farms: A Potential Predictive Tool for STEC Culture-Positive Farms. *Toxins (Basel)*, v.6, p.1201-21, 2014.

15 VOLOKHOV, D. V. *et al.* Genetic analysis of housekeeping genes of members of the genus *Acholeplasma*: phylogeny and complementary molecular markers to the 16S rRNA gene. *Mol Phylogenet*, v. 44, p. 699–710, 2006.

ZEIGHAMI, H. *et al.* Multi-drug-resistant enterotoxigenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* isolated from children with diarrhea. *J Chemother*, v.000, p.1-4, 2014.

20

25

APÊNDICES

APÊNDICE A

Detection of multidrug resistant *Escherichia coli* isolates in drinking water from Minas Gerais, Brazil

5

Detecção de amostras de *Escherichia coli* multirresistentes em água para consumo em Minas Gerais, Brasil

Ferreira, J. F. G.¹; Freitas, D. L.¹; Moreira, M.¹; Lanna, M. C. S.²; Farias, L. M.¹;
10 Magalhães, P.P.¹

¹Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Minas Gerais, Brazil.

²Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), Minas Gerais, Brazil.

15

ABSTRACT

Antimicrobial resistance has been recognized as one of the greatest public health problems in the world. In this study, the susceptibility profile of 423 *Escherichia coli* isolates recovered from drinking water in the mesoregion of Belo Horizonte, MG was evaluated.

20 Among them, 37 isolates were classified as multidrug resistant. Resistance to all 22 antimicrobials tested was detected, with the highest rates observed for ampicillin (59.5%) and nalidixic acid (56.8%). These results indicate that waters for human consumption are disseminating fecal microorganisms and resistance genes among human populations.

25 **Keywords:** Drinking water; *Escherichia coli*; antimicrobial resistance.

INTRODUCTION

Potable water and sanitation are universally recognized as necessary for human dignity and development⁽¹⁾. Therefore, the safe and affordable supply of this property must
5 be available to all. However, access to drinking water as well as to basic sanitation is not a rule, especially in developing countries⁽²⁾. In 2015 it was estimated that, globally, 663 million people still consume water from unsafe sources⁽³⁾ and, according to the World Health Organization (WHO), about 2.9 million people die each year due to the lack of access to safe drinking water and basic sanitation, with about 90% of deaths occurring
10 among children under five years of age⁽²⁾. Thus, the microbiological quality of drinking water is currently a major public health problem worldwide⁽⁴⁾.

The methods used to monitor the microbiological quality of drinking water aim the detection and enumeration of faecal indicators. The presence of these microorganisms evidences the contamination of the water with organic matter of faecal origin, from human
15 or other animals, so that they characterize the water as unsuited for consumption. The faecal indicators usually applied to monitor the quality of water destined to consumption are the microorganisms included in the total coliforms group, especially the *Escherichia coli* species⁽⁵⁾.

E. coli is an important component of the *Enterobacteriaceae* family. The
20 species is mostly composed by lineages which reside harmlessly in human and other animals' intestine lumen. However, there are several pathotypes which are frequently associated to the development of diseases in humans, being an important cause of diarrheal disease⁽⁶⁾. Another concerning situation, which *E. coli* is directly associated with, is antimicrobial resistance. Cases of antimicrobial resistance among *E. coli* isolates retrieved
25 from nonclinical environments are alarming. Several studies have pointed to the diversified susceptibility profile of these isolates which are obtained from several environments, including the aquatic, presenting considerable resistance rates to diverse antimicrobial classes^(7,8,9).

Antimicrobial resistance has been recognized as one of the greatest public
30 health problems in the world⁽⁹⁾, causing a global crisis with profound economic and public health consequences⁽¹⁰⁾. The last decades have witnessed the increasing emergence of

antimicrobial resistance, and the intensive and, mainly, imprudent use of these drugs are intimately associated with this scenario⁽⁹⁾.

In addition to the presence of enteropathogenic and/or antimicrobial resistant microorganisms, another crucial problem related to the aquatic environment is antimicrobial contamination. It is estimated that approximately 30 to 90% of the ingested antimicrobials are excreted, being only partially removed by sewage treatment systems⁽¹¹⁾ and are therefore launched into water bodies, where they act in the selection of microorganisms that express antimicrobial resistance. Thus, the aim of this study was to evaluate the antimicrobial susceptibility profile of *E. coli* isolates retrieved from drinking water and to detect the presence of microorganisms with a multiresistance profile, in order to evaluate the association of these waters, as well as *E. coli*, with the dissemination of resistance genes among human populations.

MATERIAL AND METHODS

15

A total of 423 *E. coli* isolates isolated from drinking water from the municipalities of Ouro Preto and Itabirito, MG, Brazil, between the years 2014 and 2015 were included in this study. The isolates were collected directly from the taps of public houses and buildings in the municipalities of Ouro Preto and Itabirito by employees of the Health State Secretary of Minas Gerais.

Water contamination by total coliforms was detected with the use of Colilert® method, which applies the substrate-defined technology for the detection of these coliforms in water. After obtaining and cultivating the bacterial isolates from these waters, phenotypic identification was performed and all isolates identified as *E. coli* were stored at -80°C.

The investigation of the susceptibility profile to antimicrobial drugs was performed by the agar diffusion method, according to the specifications of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)⁽¹²⁾. Antimicrobials ampicillin, amoxicillin/clavulanate, ampicillin/sulbactam, piperacillin/tazobactam, ticarcillin/clavulanate, cefazolin, cefepime, cefotaxime, ceftriaxone, cefoxitin, cefuroxime, ceftazidime, aztreonam, imipenem, meropenem, gentamicin, tobramycin, amikacin,

ciprofloxacin, levofloxacin, nalidixic acid, and sulfamethoxazole/trimethoprim were tested. As control, the reference isolate *E. coli* ATCC 25922 was employed.

RESULTS AND DISCUSSION

5

The criteria for interpretation of the results considered the fact that, according to CLSI⁽¹²⁾, the “intermediate” category is assigned to the relationship between antimicrobials and bacterial isolates, for which the response rates in blood and tissue levels may be lower than those presented by susceptible isolates.

10

Thirty seven (8.7%) bacterial isolates presented multidrug resistance profile. Considering all the multidrug resistant bacterial isolates and all the antimicrobial drugs used, 814 antibiogram tests were performed. The resistance rate was 19.7% and the intermediate rate was 9.5%, so that, on average, each bacterial isolate was resistant to 4.3 antimicrobials. The highest resistance rates were observed for ampicillin (59.5%), nalidixic acid (56.8%), cefuroxime (48.6%), tobramycin (45.9%), amikacin (37.8%), sulfamethoxazole-trimethoprim (32.4%) and ampicillin-sulbactam (29.7%) (**Figure**).

15

20

All 22 antimicrobials tested were involved in multidrug resistant cases. The multidrug resistant isolates presented a widely diverse susceptibility profile among themselves, in which 32 distinct combinations of antimicrobials for which the isolates showed resistance were detected, evidencing the wide range of resistance genes carried by those *E. coli* isolates.

25

Antimicrobial resistance is an emerging major worldwide problem observed in several bacterial groups, including *E. coli*. The species possesses high rates of resistance to antimicrobial drugs such as ampicillin, sulfamethoxazole/trimethoprim, tetracycline, chloramphenicol and nalidixic acid^(13,14).

30

Faecal surface water pollution is a current global public health problem that can contribute to the spread of antimicrobial resistance⁽¹⁵⁾. Since *E. coli* is recognized as capable of transferring genes by horizontal transference to other bacteria, including other species⁽¹⁶⁾, it is likely that these *E. coli* isolates play an important role in the spread of resistance genes in aquatic environments.

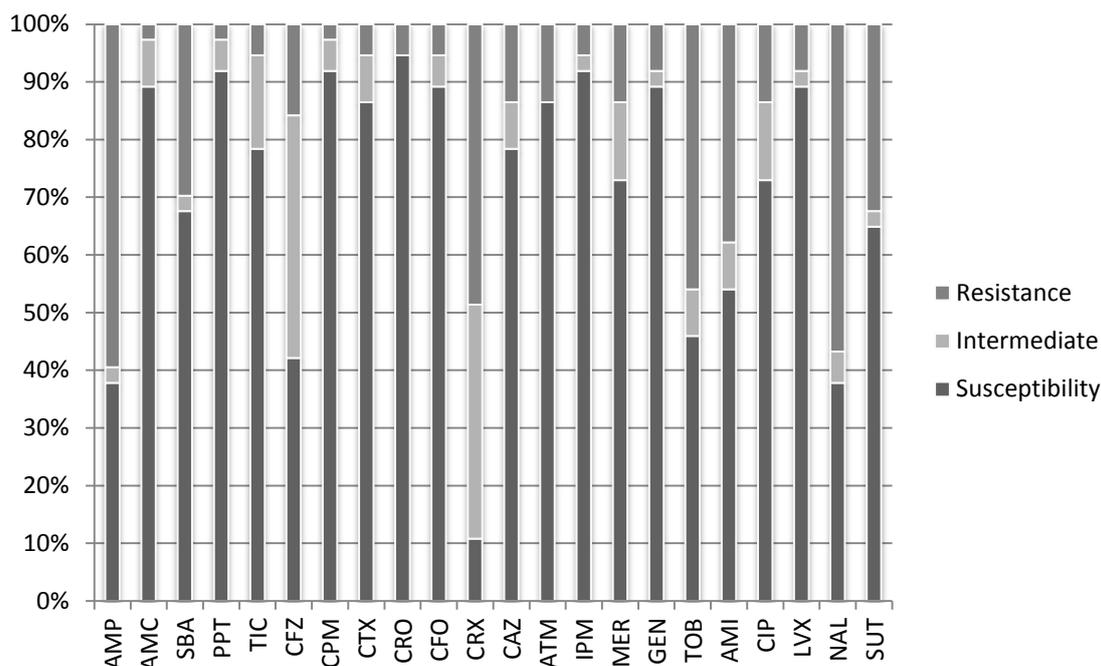


FIGURE – Antimicrobial susceptibility profile of multidrug resistant *E. coli* isolated from drinking water.

AMP: Ampicillin; AMC: Amoxicillin/clavulanate; SBA: Ampicillin/sulbactam; PPT: Piperacillin/azobactam;
 5 TIC: Ticarcillin/clavulanate; CFZ: Cefazolin; CPM: Cefepime; CTX: Cefotaxime; CRO: Ceftriaxone; CFO: Cefoxitin; CRX: Cefuroxime; CAZ: Ceftazidime; ATM: Aztreonam; IPM: Imipenem; MER: Meropenem; GEN: Gentamicin; TOB: Tobramycin; AMI: Amikacin; CIP: Ciprofloxacin; LVX: Levofloxacin; NAL: Nalidixic Acid; SUT: Sulfamethoxazole/trimethoprim.

10 Another relevant implication of the presence of these multidrug resistant *E. coli* isolates in waters destined for consumption is the dissemination of resistance genes among human populations. Studies have shown that the consumption of contaminated water has been associated with the carrying of resistant *E. coli* among humans^(16,17). Thus, in view of the aforementioned horizontal gene transference ability, it is possible that these
 15 microorganisms disseminate resistance genes to components of the indigenous microbiota, causing an alteration in the susceptibility profile of this community, which may also lead to a change in its structure when in eventual antimicrobial exposure.

Thus, it is possible to affirm that part of the potable water used for human consumption in the municipalities of Ouro Preto and Itabirito is acting in the dissemination
 20 of multidrug resistant *E. coli*, with distinct antimicrobial susceptibility profiles. These data indicate that in addition to the risk of developing diarrheal disease, since the presence of

these microorganisms is indicative of the occurrence of water contamination by faecal organic matter, these populations are prone to host antimicrobial resistance genes that can be transferred to its indigenous microbiota.

5 These results reinforce the need for constantly monitoring the quality of water destined for human consumption in these locations, as well as the characterization of the detected contaminants.

ACKNOWLEDGMENT

10 We are grateful for the funding provided by the funding agencies Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Pró-reitoria de Pesquisa (PRPq)/UFMG.

15 RESUMO

A resistência a antimicrobianos tem sido reconhecida como um dos maiores problemas de saúde pública no mundo. Neste estudo, foi avaliado o perfil de suscetibilidade de 423 amostras de *Escherichia coli* recuperadas de água para consumo da mesorregião de Belo Horizonte, MG. Foram classificadas como multirresistentes 37 amostras bacterianas. Resistência a todos os 22 antimicrobianos testados foi detectada entre as amostras, sendo as maiores taxas observadas para ampicilina (59,5%) e ácido nalidíxico (56,8%). Estes resultados indicam que águas para o consumo humano estão veiculando microrganismos de origem fecal e genes de resistência entre populações humanas.

25

Unitermos: Água para consumo; *Escherichia coli*; resistência antimicrobiana.

REFERENCES

1. Malhotra S, Sidhu SK, Devi P. Assessment of bacteriological quality of drinking water from various sources in Amritsar district of northern India. *J Infect Dev Ctries.* 2015; 9(8): 844-8. PubMed PMID: 26322876.
- 5 2. Guzmán BL, Nava G, Díaz P. [Quality of water for human consumption and its association with morbimortality in Colombia, 2008-2012]. *Biomedica.* 2015 ;35 Spec: 177-90. PubMed PMID: 26535753.
3. Bhar D, Bhattacharjee S, Mukherjee A, Sarkar TK, Dasgupta S. Utilization of safe drinking water and sanitary facilities in slum households of Siliguri, West Bengal. *Indian J Public Health.* 2017; 61(4): 248-253. PubMed PMID: 29219129.
- 10 4. Ratajczak M, Laroche E, Berthe T, Clermont O, Pawlak B, Denamur E, Petit F. Influence of hydrological conditions on the *Escherichia coli* population structure in the water of a creek on a rural watershed. *BMC Microbiol.* 2010; 10:222. PubMed PMID: 20723241.
- 15 5. Saxena G, Bharagava RN, Kaithwas G, Raj A. Microbial indicators, pathogens and methods for their monitoring in water environment. *J Water Health.* 2015; 13(2): 319-39. PubMed PMID: 26042966.
6. Dallagassa CB, Huergo LF, Stets MI, Pedrosa FO, Souza EM, Cruz LM, Assis FE, Wolf S, Volanski W, Picheth G, Pigatto-Denardi CP, Farah SM, Fadel-Picheth CM. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry analysis of *Escherichia coli* categories. *Genet Mol Res.* 2014; 13(1): 716-22. PubMed PMID: 24615036.
- 20 7. Vaz-Moreira I, Varela AR, Pereira TV, Fochat RC, Manaia CM. Multidrug Resistance in Quinolone-Resistant Gram-Negative Bacteria Isolated from Hospital Effluent and the Municipal Wastewater Treatment Plant. *Microb Drug Resist.* 2016; 22(2): 155-63. PubMed PMID: 26469134.
- 25 8. Sharma B, Parul, Verma AK, Jain U, Yadav JK, Singh R, Mishra R. Occurrence of multidrug resistant *Escherichia coli* in groundwater of Brij region (Uttar Pradesh) and its public health implications. *Vet World.* 2017; 10(3): 293-301. PubMed PMID: 28435191.

9. Cho S, Hiott LM, Barrett JB, McMillan EA, House SL, Humayoun SB, Adams ES, Jackson CR, Frye JG. Prevalence and characterization of *Escherichia coli* isolated from the Upper Oconee Watershed in Northeast Georgia. *PLoS One*. 2018; 13(5): e0197005. PubMed PMID: 29738574.
- 5 10 Fleece ME, Pholwat S, Mathers AJ, Houpt ER. Molecular diagnosis of antimicrobial resistance in *Escherichia coli*. *Expert Rev Mol Diagn*. 2018; 18(3): 207-217. PubMed PMID: 29431523.
11. Gillings MR, Gaze WH, Pruden A, Smalla K, Tiedje JM, Zhu YG. Using the class 1 integron-integrase gene as a proxy for anthropogenic pollution. *ISME J*. 2015; 9(6): 1269-10 79. PubMed PMID: 25500508.
12. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. CLSI document M100-S26. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2016.
13. Diniz-Santos DR, Silva LR, Silva N. Antibiotics for the empirical treatment of acute 15 infectious diarrhea in children. *Braz J Infect Dis*. 2006; 10(3): 217-27. PubMed PMID: 17568855.
14. Mosquito S, Ruiz J, Bauer JL, Ochoa TJ. Mecanismos moleculares de resistência antibiótica em *Escherichia coli* associadas a diarreia. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2011; 28(4): 648-56. PubMed PMID: 22241263.
- 20 15. Pereira A, Santos A, Tação M, Alves A, Henriques I, Correia A. Genetic diversity and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* from Tagus estuary (Portugal). *Sci Total Environ*. 2011; 461-462: 65-71. PubMed PMID: 23714246.
- 25 16. Coleman BL, Louie M, Salvadori MI, McEwen SA, Neumann N, Sibley K, Irwin RJ, Jamieson FB, Daignault D, Majury A, Braithwaite S, Crago B, McGeer AJ. Contamination of Canadian private drinking water sources with antimicrobial resistant *Escherichia coli*. *Water Res*. 2013; 47(9): 3026-36. PubMed PMID: 23548566.
17. Coleman BL, Salvadori MI, McGeer AJ, Sibley KA, Neumann NF, Bondy SJ, Gutmanis IA, McEwen SA, Lavoie M, Strong D, Johnson I, Jamieson FB, Louie M; ARO

Water Study Group. The role of drinking water in the transmission of antimicrobial-resistant E. coli. *Epidemiol Infect.* 2012; 140(4): 633-42. PubMed PMID: 21733246.

CORRESPONDING AUTHOR

5

Paula Prazeres Magalhães

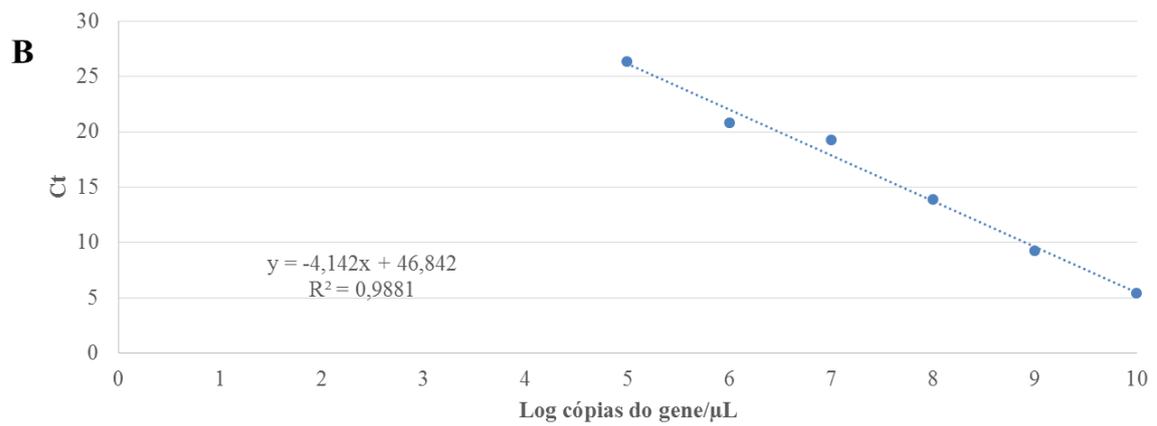
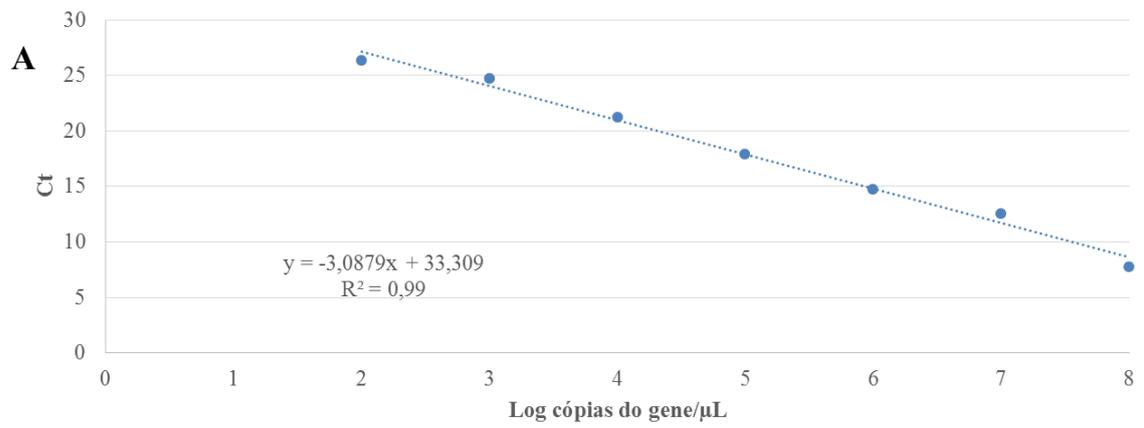
Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios; Departamento de Microbiologia; Instituto de Ciências Biológicas; Universidade Federal de Minas Gerais; Avenida Antônio Carlos, 6.627; CEP: 31270-901; Belo Horizonte - MG, Brasil; Phone: +55 (31) 3409-2759;

10 e-mail: ppmagalhaes@ufmg.br.

APÊNDICE B - Sequências nucleotídicas das amostras de *Escherichia coli*
multirresistentes e ou portadoras de *integrons* de classe 1

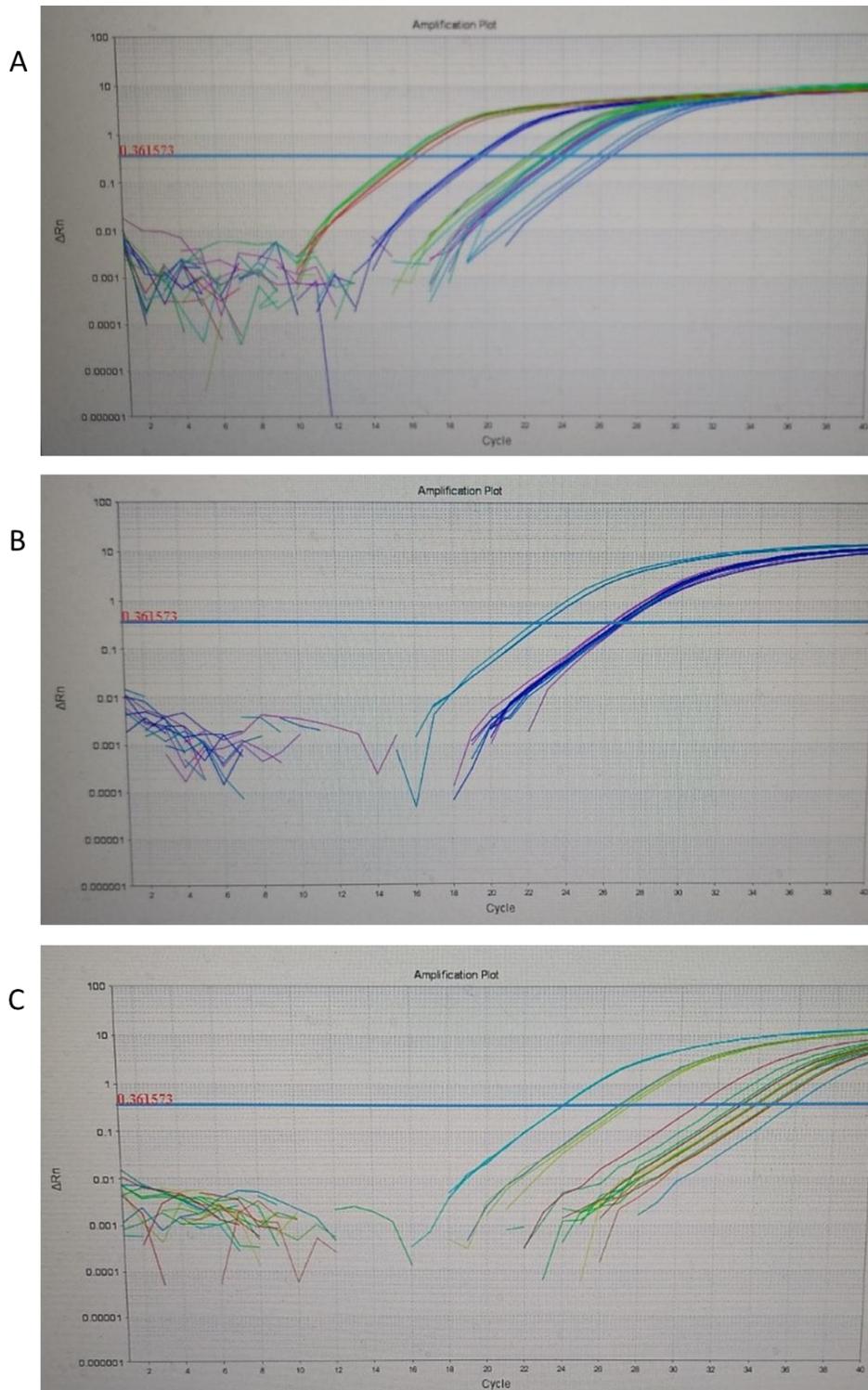
Grupo	Amostras de águas contaminadas	Sequência nucleotídica
<i>E. coli</i> 1	20, 21, 45, 60, 61, 62, 63, 67, 71 74, 78, 83, 86, 88 e 89	TCTGATCAACTCTCTGTCCGTGTACGCACAGAC TAACGAATACGGCTTCCTTGAGACTCCGTATCG TAAAGTGACCGACGGTGTGTAAGTACGAAAT TCACTATCTGTCTGCTATCGAAGAAGGCAACTA CGTTATCGCCCAGGCGAACTCCAACCTGGATGA AGAAGGCCACTTCGTAGAAGACCTGGTAACTTG CCGTAGCAAAGGCGAATCCAGCTTGTTTCAGCCG CGACCAGGTTGACTACATGGACGTATCCACCCA GCAGGTGGTATCC
<i>E. coli</i> 3	45, 62, 65, 85 e 86	TCTGATCAACTCTCTGTCCGTGTACGCACAGAC TAACGAATACGGCTTCCTTGAGACTCCGTATCG TAAAGTGACCGACGGTGTGTAAGTACGAAAT TCACTACCTGTCTGCTATCGAAGAAGGCAACTA CGTTATCGCCCAGGCGAACTCCAACCTGGATGA AGAAGGCCACTTCGTAGAAGACCTGGTAACTTG CCGTAGCAAAGGCGAATCCAGCTTGTTTCAGCCG CGACCAGGTTGACTACATGGACGTATCCACCCA GCAGGTGGTATCC
<i>E. coli</i> 5	4 e 60	TCTGATCAACTCTCTGTCCGTGTACGCACAGAC TAACGAATACGGCTTCCTTGAGACTCCGTATCG TAAAGTGACCGACGGTGTGTAAGTACGAAAT TCACTACCTGTCTGCTATCGAAGAAGGCAACTA CGTTATCGCCCAGGCGAACTCCAACCTGGATGA AGAAGGCCACTTCGTAGAAGACCTGGTAACTTG CCGTAGCAAAGGCGAATCCAGCTTGTTTCAGCCG CGACCAGGTTGACTACATGGACGTATCCACCCA GCAGGTGGTATCC

APÊNDICE C - Curvas padrão para a quantificação dos marcadores gênicos pesquisados.



5 **LEGENDA:** **A:** Bacteria; **B:** *int11*.

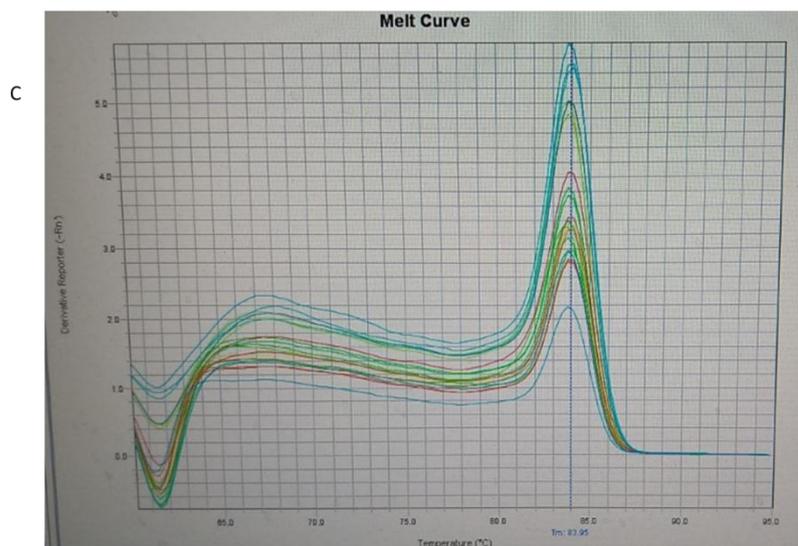
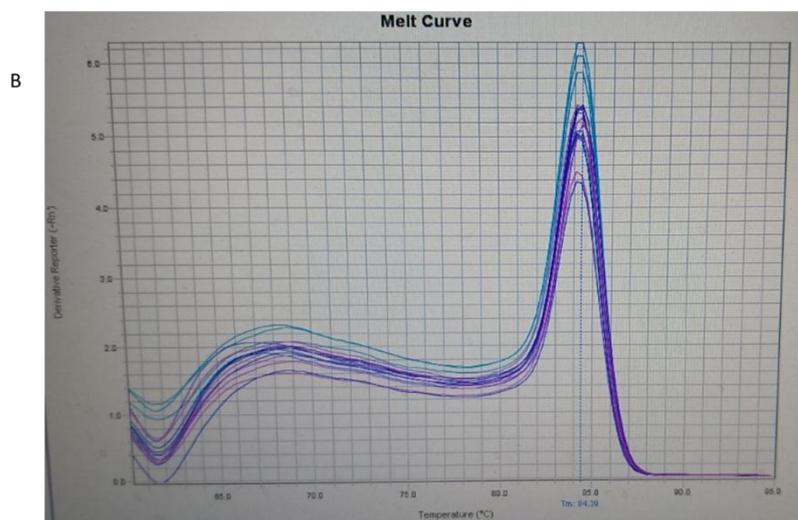
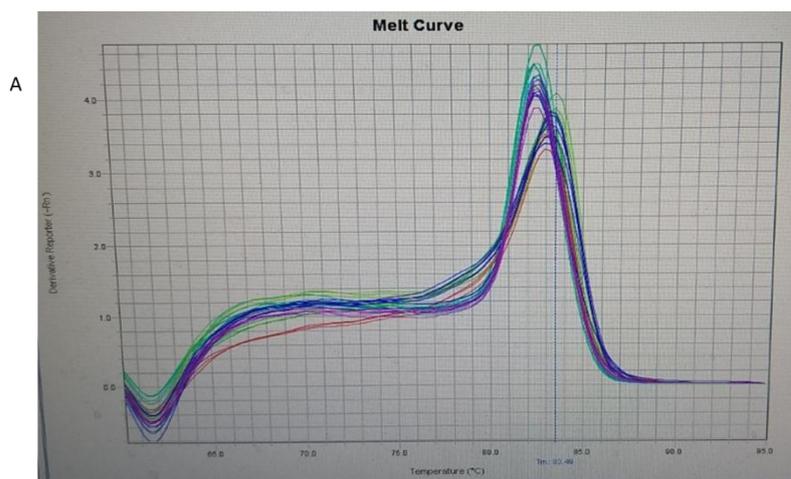
APÊNDICE D - Perfis de amplificação observados para os marcadores gênicos pesquisados.



5

LEGENDA: **A:** Bacteria; **B e C:** *int11*.

APÊNDICE E - Curvas de *melting* observadas para os marcadores gênicos pesquisados.



LEGENDA: A: Bacteria; B e C: *intl1*.

ANEXOS

ANEXO A - Parâmetros de interpretação do perfil de suscetibilidade a antimicrobianos da família *Enterobacteriaceae*.

5

Test/Report Group	Antimicrobial Agent	Disk Content	Zone Diameter Interpretive Criteria (nearest whole mm)				MIC Interpretive Criteria (µg/mL)				Comments
			S	SDD	I	R	S	SDD	I	R	
PENICILLINS											
A	Ampicillin	10 µg	≥17		14–16	≤13	≤8		16	≥32	(4) Results of ampicillin testing can be used to predict results for amoxicillin. See comment (2).
B	Piperacillin	100 µg	≥21		18–20	≤17	≤16		32–64	≥128	
O	Mecillinam	10 µg	≥15		12–14	≤11	≤8		16	≥32	(5) For testing and reporting of <i>E. coli</i> urinary tract isolates only.
O	Ticarcillin	75 µg	≥20		15–19	≤14	≤16		32–64	≥128	
β-LACTAM/β-LACTAMASE INHIBITOR COMBINATIONS											
B	Amoxicillin-clavulanate	20/10 µg	≥18		14–17	≤13	≤8/4		16/8	≥32/16	
B	Ampicillin-sulbactam	10/10 µg	≥15		12–14	≤11	≤8/4		16/8	≥32/16	
B	Piperacillin-tazobactam	100/10 µg	≥21		18–20	≤17	≤16/4		32/4–64/4	≥128/4	
B	Ticarcillin-clavulanate	75/10 µg	≥20		15–19	≤14	≤16/2		32/2–64/2	≥128/2	
CEPHEMS (PARENTERAL) (Including cephalosporins I, II, III, and IV. Please refer to Glossary I.)											
<p>(6) WARNING: For <i>Salmonella</i> spp. and <i>Shigella</i> spp., first- and second-generation cephalosporins and cephamycins may appear active <i>in vitro</i>, but are not effective clinically and should not be reported as susceptible.</p> <p>(7) Following evaluation of PK-PD properties, limited clinical data, and MIC distributions, revised interpretive criteria for cephalosporins (cefazolin, cefotaxime, ceftazidime, ceftizoxime, and ceftriaxone) and aztreonam were first published in January 2010 (M100-S20) and are listed in this table. Cefuroxime (parenteral) was also evaluated; however, no change in interpretive criteria was required for the dosage indicated below. When using the current interpretive criteria, routine ESBL testing is no longer necessary before reporting results (ie, it is no longer necessary to edit results for cephalosporins, aztreonam, or penicillins from susceptible to resistant). However, ESBL testing may still be useful for epidemiological or infection control purposes. For laboratories that have not implemented the current interpretive criteria, ESBL testing should be performed as described in Table 3A.</p> <p>Note that interpretive criteria for drugs with limited availability in many countries (eg, moxalactam, cefonicid, cefamandole, and cefoperazone) were not evaluated. If considering use of these drugs for <i>E. coli</i>, <i>Klebsiella</i>, or <i>Proteus</i> spp., ESBL testing should be performed (see Table 3A). If isolates test ESBL positive, the results for moxalactam, cefonicid, cefamandole, and cefoperazone should be reported as resistant.</p> <p>(8) <i>Enterobacter</i>, <i>Citrobacter</i>, and <i>Serratia</i> may develop resistance during prolonged therapy with third-generation cephalosporins as a result of derepression of AmpC β-lactamase. Therefore, isolates that are initially susceptible may become resistant within three to four days after initiation of therapy. Testing of repeat isolates may be warranted.</p>											
A	Cefazolin	30 µg	≥23		20–22	≤19	≤2		4	≥8	(9) Interpretive criteria are based on a dosage regimen of 2 g every 8 h. See comment (7). For UTI interpretive criteria, see below under CEPHEMS (ORAL).
C	Ceftaroline	30 µg	≥23		20–22	≤19	≤0.5		1	≥2	(10) Interpretive criteria are based on a dosage regimen of 600 mg every 12 h.

CEPHEMS (PARENTERAL) (Including cephalosporins I, II, III, and IV. Please refer to Glossary I.) (Continued)											
U	Cephalothin (surrogate test for uncomplicated UTI)	30 µg	≥18		15–17	≤14	≤8		16	≥32	(11) Cephalothin interpretive criteria can be used only to predict susceptibility to the oral agents, cefadroxil, cefpodoxime, cephalexin, and loracarbef. Older data that suggest that cephalothin results could predict susceptibility to some other cephalosporins may still be correct, but there are no recent data to confirm this. (12) To predict results for oral cephalosporins when used for therapy of uncomplicated UTIs, testing cefazolin is preferred to testing cephalothin.
B	Cefepime	30 µg	≥25	19–24	–	≤18	≤2	4–8	–	≥16	(13) The interpretive criterion for susceptible is based on a dosage regimen of 1 g every 12 h. The interpretive criterion for SDD is based on dosing regimens that result in higher cefepime exposure, either higher doses or more frequent doses or both, up to approved maximum dosing regimens. See Appendix E for more information about interpretive criteria and dosing regimens. Also see the definition of SDD in the Instructions for Use of Tables section.
B	Cefotaxime or ceftriaxone	30 µg	≥26		23–25	≤22	≤1		2	≥4	(14) Interpretive criteria are based on a dosage regimen of 1 g every 24 h for ceftriaxone and 1 g every 8 h for cefotaxime. See comment (7).
B		30 µg	≥23		20–22	≤19	≤1		2	≥4	
B	Cefotetan	30 µg	≥16		13–15	≤12	≤16		32	≥64	
B	Cefoxitin	30 µg	≥18		15–17	≤14	≤8		16	≥32	(15) The interpretive criteria are based on a dosage regimen of at least 8 g per day (eg, 2 g every 6 h).
B	Cefuroxime (parenteral)	30 µg	≥18		15–17	≤14	≤8		16	≥32	(16) Interpretive criteria are based on a dosage regimen of 1.5 g every 8 h. See comment (7).

10

Test/Report Group	Antimicrobial Agent	Disk Content	Zone Diameter Interpretive Criteria (nearest whole mm)				MIC Interpretive Criteria (µg/mL)				Comments
			S	SDD	I	R	S	SDD	I	R	
CEPHEMS (PARENTERAL) (Including cephalosporins I, II, III, and IV. Please refer to Glossary I.) (Continued)											
C	Ceftazidime	30 µg	≥21		18–20	≤17	≤4		8	≥16	(17) Interpretive criteria are based on a dosage regimen of 1 g every 8 h. See comment (7).
O	Cefamandole	30 µg	≥18		15–17	≤14	≤8		16	≥32	See comment (7).
O	Cefmetazole	30 µg	≥16		13–15	≤12	≤16		32	≥64	(18) Insufficient new data exist to reevaluate interpretive criteria listed here.
O	Cefonicid	30 µg	≥18		15–17	≤14	≤8		16	≥32	See comment (7).
O	Cefoperazone	75 µg	≥21		16–20	≤15	≤16		32	≥64	See comment (7).
O	Ceftizoxime	30 µg	≥25		22–24	≤21	≤1		2	≥4	(19) Interpretive criteria are based on a dosage regimen of 1 g every 12 h. See comment (7).
O	Moxalactam	30 µg	≥23		15–22	≤14	≤8		16–32	≥64	See comment (7).
CEPHEMS (ORAL)											
B	Cefuroxime (oral)	30 µg	≥23		15–22	≤14	≤4		8–16	≥32	See comments (12 and 20).
U	Cefazolin (surrogate test for uncomplicated UTI)	30 µg	≥15		–	≤14	≤16	–	–	≥32	(20) Rx: Cefazolin results predict results for the oral agents cefaclor, cefdinir, cefpodoxime, cefprozil, cefuroxime, cephalixin, and loracarbef when used for therapy of uncomplicated UTIs due to <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , and <i>P. mirabilis</i> . Cefpodoxime, cefdinir, and cefuroxime may be tested individually because some isolates may be susceptible to these agents while testing resistant to cefazolin. See comment (12).
O	Loracarbef	30 µg	≥18		15–17	≤14	≤8		16	≥32	(21) Do not test <i>Citrobacter</i> , <i>Providencia</i> , or <i>Enterobacter</i> spp. with cefdinir or loracarbef by disk diffusion because false-susceptible results have been reported. See comments (12 and 20).
O	Cefaclor	30 µg	≥18		15–17	≤14	≤8		16	≥32	See comments (12 and 20).
O	Cefdinir	5 µg	≥20		17–19	≤16	≤1		2	≥4	See comments (12, 20, and 21).
O	Cefixime	5 µg	≥19		16–18	≤15	≤1		2	≥4	(22) Do not test <i>Morganella</i> spp. with cefixime, cefpodoxime, or cefetamet by disk diffusion.
O	Cefpodoxime	10 µg	≥21		18–20	≤17	≤2		4	≥8	See comments (12, 20, and 22).
O	Cefprozil	30 µg	≥18		15–17	≤14	≤8		16	≥32	(23) Do not test <i>Providencia</i> spp. with cefprozil by disk diffusion because false-susceptible results have been reported. See comments (12 and 20).
Inv.	Cefetamet	10 µg	≥18		15–17	≤14	≤4		8	≥16	See comment (22).
Inv.	Ceftibuten	30 µg	≥21		18–20	≤17	≤8		16	≥32	(24) For testing and reporting of urine isolates only.
MONOBACTAMS											
C	Aztreonam	30 µg	≥21		18–20	≤17	≤4		8	≥16	(25) Interpretive criteria are based on a dosage regimen of 1 g every 8 h. See comment (7).
CARBAPENEMS											
<p>(26) Following evaluation of PK-PD properties, limited clinical data, and MIC distributions that include recently described carbapenemase-producing strains, revised interpretive criteria for carbapenems were first published in June 2010 (M100-S20-U) and are listed below. Because of limited treatment options for infections caused by organisms with carbapenem MICs or zone diameters in the intermediate range, clinicians may wish to design carbapenem dosage regimens that use maximum recommended doses and possibly prolonged intravenous infusion regimens, as has been reported in the literature.¹⁴ Consultation with an infectious diseases practitioner is recommended for isolates for which the carbapenem MICs or zone diameter results from disk diffusion testing are in the intermediate or resistant ranges.</p> <p>Laboratories using <i>Enterobacteriaceae</i> MIC interpretive criteria for carbapenems described in M100-S20 (January 2010) should perform the modified Hodge test (MHT), the Carba NP test, and/or a molecular assay when isolates of <i>Enterobacteriaceae</i> are suspicious for carbapenemase production based on imipenem or meropenem MICs of 2–4 µg/mL or ertapenem MIC of 2 µg/mL (refer to Tables 3B and 3C). After implementation of the current interpretive criteria, the MHT does not need to be performed other than for epidemiological or infection control purposes (refer to Table 3B).</p> <p>The following information is provided as background on carbapenemases in <i>Enterobacteriaceae</i> that are largely responsible for MICs and zone diameters in the intermediate and resistant ranges, and thus the rationale for setting revised carbapenem breakpoints:</p> <ul style="list-style-type: none"> The clinical effectiveness of carbapenem treatment of infections produced by isolates for which the carbapenem MIC or disk diffusion test results are within the intermediate (I) range is uncertain due to lack of controlled clinical studies. Imipenem MICs for <i>Proteus</i> spp., <i>Providencia</i> spp., and <i>Morganella morganii</i> tend to be higher (eg, MICs in the intermediate or resistant range) than meropenem or doripenem MICs. These isolates may have elevated imipenem MICs by mechanisms other than production of carbapenemases. 											
B	Doripenem	10 µg	≥23		20–22	≤19	≤1		2	≥4	(27) Interpretive criteria are based on a dosage regimen of 500 mg every 8 h.
B	Ertapenem	10 µg	≥22		19–21	≤18	≤0.5		1	≥2	(28) Interpretive criteria are based on a dosage regimen of 1 g every 24 h.
B	Imipenem	10 µg	≥23		20–22	≤19	≤1		2	≥4	(29) Interpretive criteria are based on a dosage regimen of 500 mg every 6 h or 1 g every 8 h.
B	Meropenem	10 µg	≥23		20–22	≤19	≤1		2	≥4	(30) Interpretive criteria are based on a dosage regimen of 1 g every 8 h.
AMINOGLYCOSIDES											
(31) WARNING: For <i>Salmonella</i> spp. and <i>Shigella</i> spp., aminoglycosides may appear active <i>in vitro</i> but are not effective clinically and should not be reported as susceptible.											
A	Gentamicin	10 µg	≥15		13–14	≤12	≤4		8	≥16	
A	Tobramycin	10 µg	≥15		13–14	≤12	≤4		8	≥16	
B	Amikacin	30 µg	≥17		15–16	≤14	≤16		32	≥64	
O	Kanamycin	30 µg	≥18		14–17	≤13	≤16		32	≥64	

Test/Report Group	Antimicrobial Agent	Disk Content	Zone Diameter Interpretive Criteria (nearest whole mm)				MIC Interpretive Criteria (µg/mL)				Comments
			S	SDD	I	R	S	SDD	I	R	
AMINOGLYCOSIDES (Continued)											
O	Netilmicin	30 µg	≥15		13–14	≤12	≤8		16	≥32	(32) There are no MIC interpretive standards.
O	Streptomycin	10 µg	≥15		12–14	≤11	–	–	–	–	
MACROLIDES											
Inv.	Azithromycin	15 µg	≥13		–	≤12	≤16		–	≥32	(33) <i>Salmonella</i> Typhi only: Interpretive criteria are based on MIC distribution data.
TETRACYCLINES											
(34) Organisms that are susceptible to tetracycline are also considered susceptible to doxycycline and minocycline. However, some organisms that are intermediate or resistant to tetracycline may be susceptible to doxycycline, minocycline, or both.											
C	Tetracycline	30 µg	≥15		12–14	≤11	≤4		8	≥16	
O	Doxycycline	30 µg	≥14		11–13	≤10	≤4		8	≥16	
O	Minocycline	30 µg	≥16		13–15	≤12	≤4		8	≥16	
FLUOROQUINOLONES											
NOTE: Reevaluation of fluoroquinolones is ongoing. See comment (2).											
B	Ciprofloxacin	5 µg	≥21		16–20	≤15	≤1		2	≥4	(35) For testing and reporting of <i>Enterobacteriaceae</i> except for <i>Salmonella</i> spp.
B	Levofloxacin	5 µg	≥17		14–16	≤13	≤2		4	≥8	
B	Ciprofloxacin	5 µg	≥31		21–30	≤20	≤0.06		0.12–0.5	≥1	(36) For testing and reporting of <i>Salmonella</i> spp. (including <i>S. Typhi</i> and <i>S. Paratyphi</i> A–C). See comment (2).
Inv.	Pefloxacin	5 µg (surrogate test for ciprofloxacin)	≥24		–	≤23	–		–	–	(37) Strains of <i>Salmonella</i> that test nonsusceptible to ciprofloxacin, levofloxacin, ofloxacin, pefloxacin, or nalidixic acid may be associated with clinical failure or delayed response in fluoroquinolone-treated patients with salmonellosis.
B	Levofloxacin	–	–		–	–	≤0.12		0.25–1	≥2	(38) If a ciprofloxacin, levofloxacin, or ofloxacin MIC test cannot be done, pefloxacin disk diffusion may be used as a surrogate test. Because pefloxacin is not available in the United States, a ciprofloxacin disk alone or both ciprofloxacin and nalidixic acid disks could also be tested.
B	Ofloxacin	–	–		–	–	≤0.12		0.25–1	≥2	
(39) No single screening test will detect resistance resulting from all possible fluoroquinolone resistance mechanisms that have been identified in <i>Salmonella</i> spp.											

Test/Report Group	Antimicrobial Agent	Disk Content	Zone Diameter Interpretive Criteria (nearest whole mm)				MIC Interpretive Criteria (µg/mL)				Comments
			S	SDD	I	R	S	SDD	I	R	
FLUOROQUINOLONES (Continued)											
U	Lomefloxacin or ofloxacin	10 µg	≥22		19–21	≤18	≤2		4	≥8	
U	Ofloxacin	5 µg	≥16		13–15	≤12	≤2		4	≥8	
U	Norfloxacin	10 µg	≥17		13–16	≤12	≤4		8	≥16	
O	Enoxacin	10 µg	≥18		15–17	≤14	≤2		4	≥8	
O	Gatifloxacin	5 µg	≥18		15–17	≤14	≤2		4	≥8	
O	Gemifloxacin	5 µg	≥20		16–19	≤15	≤0.25		0.5	≥1	(40) FDA-approved for <i>Klebsiella pneumoniae</i> .
O	Grepafoxacin	5 µg	≥18		15–17	≤14	≤1		2	≥4	
Inv.	Fleroxacin	5 µg	≥19		16–18	≤15	≤2		4	≥8	
QUINOLONES											
O	Cinoxacin	100 µg	≥19		15–18	≤14	≤16		32	≥64	See comment (24).
O	Nalidixic acid	30 µg	≥19		14–18	≤13	≤16		–	≥32	(41) These interpretive criteria are for urinary tract isolates of <i>Enterobacteriaceae</i> and for all isolates of <i>Salmonella</i> .
FOLATE PATHWAY INHIBITORS											
B	Trimethoprim-sulfamethoxazole	1.25/23.75 µg	≥16		11–15	≤10	≤2/38		–	≥4/76	See comment (2).
U	Sulfonamides	250 or 300 µg	≥17		13–16	≤12	≤256		–	≥512	(42) Sulfisoxazole can be used to represent any of the currently available sulfonamide preparations.
U	Trimethoprim	5 µg	≥16		11–15	≤10	≤8		–	≥16	
PHENICOLS											
C	Chloramphenicol	30 µg	≥18		13–17	≤12	≤8		16	≥32	(43) Not routinely reported on isolates from the urinary tract.
FOSFOMYCINS											
U	Fosfomycin	200 µg	≥16		13–15	≤12	≤64		128	≥256	(44) For testing and reporting of <i>E. coli</i> urinary tract isolates only. (45) The 200-µg fosfomycin disk contains 50 µg of glucose-6-phosphate. (46) The only approved MIC method for testing is agar dilution using agar media supplemented with 25 µg/mL of glucose-6-phosphate. Broth dilution MIC testing should not be performed.
NITROFURANS											
U	Nitrofurantoin	300 µg	≥17		15–16	≤14	≤32		64	≥128	

Abbreviations: ATCC®, American Type Culture Collection; ESBL, extended-spectrum β-lactamase; FDA, US Food and Drug Administration; I, intermediate; MHT, modified Hodge test; MIC, minimal inhibitory concentration; PK-PD, pharmacokinetic-pharmacodynamic; R, resistant; S, susceptible; SDD, susceptible-dose dependent; UTI, urinary tract infection.

ANEXO B - Identificação dos patotipos diarreio gênicos de *Escherichia coli*.

Amostra bacteriana	Patotipo	Nº de casos de resistência antimicrobiana	Local de coleta	Data de coleta
4A2S	ETEC	1/-	Residência no bairro Vila Aparecida - Ouro Preto	Set/2014
4A1M	ETEC	6/+	Residência no bairro Vila Aparecida - Ouro Preto	Set/2014
6A4S	ETEC	1/-	Escola Municipal José Ferreira Bastos – Itabirito	Set/2014
6A5S	ETEC	0/-	Escola Municipal José Ferreira Bastos – Itabirito	Set/2014
6A1M	ETEC	0/-	Escola Municipal José Ferreira Bastos – Itabirito	Set/2014
6A2M	ETEC	1/-	Escola Municipal José Ferreira Bastos – Itabirito	Set/2014
13A4M	EPEC	0/-	Residência no distrito Paina – Itabirito	Nov/2014
25A3M	STEC ³	0/-	Escola Municipal Manoel Salvador de Oliveira - Itabirito	Fev/2015
73A4S	STEC	0/-	Centro de Atendimento a Pessoas Especiais (CAPES) - Ouro Preto	Nov/2015
75A5M	STEC	0/-	Fundação Projeto Sorria - - Ouro Preto	Dez/2015
81A4M	STEC	0/-	Unidade Básica de Saúde Antônio Pereira - Ouro Preto	Dez/2015
90A1S	EPEC	1/-	Centro de Convergência (UFOP) - Ouro Preto	Dez/2015

LEGENDA: ETEC: *Escherichia coli* enterotoxigênica. EPEC: *Escherichia coli* enteropatogênica. STEC: *Escherichia coli* produtora de toxina shiga.

5 **FONTE:** MOREIRA, 2018; Presente estudo.

NOTA: FERREIRA, 2018; Nenhum dos patotipos diarreio gênicos de *E. coli* são portadores de *integrans*.