

UNIVERSIDADE DA REGIÃO DE JOINVILLE – UNIVILLE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E MEIO AMBIENTE

**DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS
DE BACTÉRIAS ISOLADAS DA BAÍA BABITONGA**

MARIA TEREZA DALLA VECCHIA

JOINVILLE

2021

MARIA TEREZA DALLA VECCHIA

**DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS
DE BACTÉRIAS ISOLADAS DA BAÍA BABITONGA**

Dissertação de Mestrado apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Saúde e Meio Ambiente na Universidade da Região de Joinville.

Orientador: Dr. Paulo Henrique Condeixa de França

Coorientadora: Dra. Regina Maria Miranda Gern

JOINVILLE

2021

Catálogo na publicação pela Biblioteca Universitária da Univille

V397d	<p>Vecchia, Maria Tereza Dalla Determinação do perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de bactérias isoladas da Baía da Babitonga / Maria Tereza Dalla Vecchia; orientador Dr. Paulo Henrique Condeixa de França; coorientadora Dra. Regina Maria Miranda Gem. – Joinville: UNIVILLE, 2021.</p> <p>63 f. ; 30 cm</p> <p>Dissertação (Mestrado em Saúde e Meio Ambiente – Universidade da Região de Joinville)</p> <p>1. Farmacorresistência Bacteriana. 2. Áreas alagadas – Babitonga, Baía de (SC). 3. Microbiologia ambiental. 4. Monitoramento ambiental. I. França, Paulo Henrique Condeixa de (orient.). II. Gem, Regina Maria Miranda (coorient.). III. Título.</p> <p>CDD 579.17</p>
-------	--

Termo de Aprovação

“Determinação do Perfil de Susceptibilidade a Antimicrobianos de Bactérias Isoladas da Baía Babitonga”

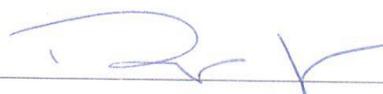
por

Maria Tereza Dalla Vecchia

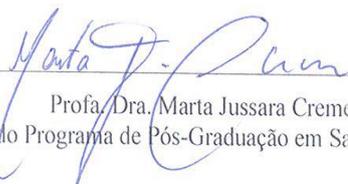
Dissertação julgada para a obtenção do título de Mestra em Saúde e Meio Ambiente, área de concentração Saúde e Meio Ambiente e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente.



Prof. Dr. Paulo Henrique Condeixa de França
Orientador (UNIVILLE)



Prof. Dra. Regina Maria Miranda Gern
Coorientadora (UNIVILLE)



Prof. Dra. Marta Jussara Cremer
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente

Banca Examinadora:



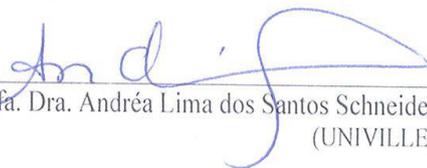
Prof. Dr. Paulo Henrique Condeixa de França
Orientador (UNIVILLE)



Prof. Dra. Regina Maria Miranda Gern
Coorientadora (UNIVILLE)



Prof. Dra. Keite da Silva Nogueira
(UFPR)



Prof. Dra. Andréa Lima dos Santos Schneider
(UNIVILLE)

Joinville, 31 de março de 2021

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me permitir a realização de mais uma formação acadêmica e por me dar forças em tantos momentos de angústia.

Agradeço a todo suporte recebido pelo corpo docente da Univille, principalmente a professora Andréa Schneider, por toda a troca de conhecimento e pelas colaborações relevantes tanto na metodologia aplicada quanto na elaboração teórica do trabalho, ao professor Paulo Henrique Condeixa de França pelo suporte fornecido no ramo de biologia molecular, a professora Vanessa Kobs e toda equipe do laboratório de biologia molecular, por tantos ensinamentos e pela grande contribuição na realização das análises. De maneira especial, agradeço a Regina Maria Miranda Gern, minha orientadora, por todo suporte, apoio e companheirismo durante a realização desse trabalho.

Agradeço também a minha colega Thaisa Nocetti Carvalho pelo suporte na execução dos ensaios e pela troca de conhecimentos.

Por fim, agradeço ao suporte de meu companheiro de vida, pelo apoio durante todo o processo.

RESUMO

A resistência a antimicrobianos é uma das principais e mais crescentes preocupações de saúde pública. Entretanto, a análise acerca da expansão desse fenômeno no meio ambiente é limitada, e com isso ele tem se tornado um grande reservatório de bactérias resistentes a antimicrobianos. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi determinar o perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de bactérias isoladas da Baía Babitonga. Foram realizados isolamento e identificação dos microrganismos a partir da amostra de sedimento de manguezal, coletadas em dois pontos amostrais da Baía Babitonga. As análises de identificação microbiana demonstraram a presença dos seguintes microrganismos Gram negativos: *Acinetobacter lwoffii*, *Vibrio metschnikovii*, *Shewanella putrefaciens*, *Pseudomonas stutzeri*, *Aeromonas hydrophila*, *Serratia* sp., *Providencia rustigianii*, *Enterobacter gergoviae* e *Pseudomonas* sp. A análise de perfil de susceptibilidade a antimicrobianos, realizada por meio do método de disco difusão, evidenciou a presença de resistência a Aztreonam do isolado *Pseudomonas* sp, resistência de *Pseudomonas stutzeri* a Ciprofloxacino, resistência de *Serratia* sp. a Cefuroxime e Nitrofurantoína, resistência de *Providencia rustigianii* a Cefuroxime, Meropenem e Nitrofurantoína, resistência de *Enterobacter gergoviae* a Cefuroxime, Aztreonam e Tetraciclina e resistência de *Vibrio metschnikovi* a Cefotaxime e Ceftazidime. Os microrganismos Gram positivos identificados foram: *Bacillus cereus*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis* e *Micrococcus luteus*. A análise de perfil de susceptibilidade a antimicrobianos, realizada por meio do método de microdiluição para determinar a concentração mínima inibitória, evidenciou a presença de resistência à Ampicilina do isolado *Bacillus cereus* e resistência à Clindamicina pelo isolado *Bacillus pulmillus*. A investigação genotípica, realizada por técnica de PCR e posterior eletroforese, demonstrou que as resistências encontradas não eram causadas pelos genes pesquisados, *bla_{SHV}*, *bla_{CTX-M}*, *bla_{OXA-48-like}*, *bla_{KPC}*, *bla_{NDM-1}*, *bla_{VIM}* e *bla_{IMP}*. Os resultados encontrados indicam que as áreas estudadas abrigam microrganismos que apresentam resistências a antimicrobianos que merecem estudos mais aprofundados.

Palavras-chave: Resistência bacteriana a antibióticos; manguezais; microbiologia ambiental; monitoramento ambiental.

ABSTRACT

Antimicrobial resistance is a major and growing public health concern. However, the analysis about the expansion of this phenomenon in the environment is limited, and the environment has become a large reservoir of bacteria resistant to antimicrobials. Thus, the objective of this work was to determine the antimicrobial susceptibility profile of bacteria from Baía Babitonga. Isolation and identification of microorganisms were carried out from the mangrove sediment sample, collected at two sampling points in Baía Babitonga. The microbial identification analyzes showed the presence of the following Gram-negative microorganisms: *Acinetobacter Iwoffii*, *Vibrio metschnikovii*, *Shewanella putrefaciens*, *Pseudomonas stutzeri*, *Aeromonas hydrophila*, *Serratia* sp., *Providencia rustigianii*, *Enterobacter gergoviae* and *Pseudomonas* sp. The profile analysis of susceptibility to antimicrobials, performed using the disk diffusion method, showed the presence of resistance to Aztreonam from the isolate *Pseudomonas* sp, resistance from *Pseudomonas stutzeri* to Ciprofloxacin, resistance from *Serratia* sp. to Cefuroxime and Nitrofurantoin, *Providencia rustigianii* resistance to Cefuroxime, Meropenem and Nitrofurantoin, *Enterobacter gergoviae* resistance to Cefuroxime, Aztreonam and Tetracycline and *Vibrio metschnikovi* resistance to Cefotaxime and Ceftazidime. The Gram-positive microorganisms identified were: *Bacillus cereus*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis* and *Micrococcus luteus*. An antimicrobial susceptibility profile analysis, carried out using the microdilution method to determine a minimum inhibitory concentration, showed the presence of resistance to Ampicillin from the isolated *Bacillus cereus* and resistance to Clindamycin by the isolated *Bacillus pulmillus*. The genotypic investigation, performed by PCR technique and posterior electrophoresis, showed that the resistance found was not caused by the researched genes, *bla_{SHV}*, *bla_{CTX-M}*, *bla_{OXA-48-like}*, *bla_{KPC}*, *bla_{NDM-1}*, *bla_{VIM}* and *bla_{IMP}*. The results found indicate that the studied areas have resistance to antimicrobials that deserve further studies.

Keywords: Bacterial resistance to antibiotics; mangroves; environmental microbiology; environmental monitoring.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Mecanismos de resistência bacteriana intrínseca a antibióticos β -lactâmicos.....	12
Figura 2:	Ponto amostral Praia do Lixo.....	22
Figura 3:	Ponto amostral Praia Avenida.....	23
Figura 4:	Coleta das amostras. A) Amostrador utilizado. B) Amostras de sedimento de manguezal. C) Amostras de sedimento de manguezal homogeneizada e armazenada em tubos Falcon.....	24
Figura 5:	Procedimento de repique das amostras.....	26
Figura 6:	Leitura do Kit BBL Crystal® Gram positivos sob luz visível.....	27
Figura 7:	Leitura do Kit BBL Crystal® Gram positivos sob luz UV.....	27
Figura 8:	Kit de identificação microbiana BBL Crystal® Gram negativos após incubação.....	28
Figura 9:	Placas de ágar seletivo após período de incubação.....	35
Figura 10:	Eletroforese realizada para pesquisa do gene <i>bla</i> _{CTX-M} no microrganismo <i>Pseudomonas</i> spp. e do gene <i>bla</i> _{SHV} no microrganismo <i>Enterobacter</i> spp.....	51

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1:	Iniciadores utilizados na detecção dos genes codificadores de ESBL.....	32
Tabela 2:	Termociclagens empregadas para a investigação dos genes <i>bla_{SHV}</i> e <i>bla_{CTX-M}</i>	32
Tabela 3:	Iniciadores utilizados na detecção dos genes codificadores de carbapenemases.....	33
Tabela 4:	Termociclagens empregadas para a investigação dos genes <i>bla_{OXA-48-like}</i> , <i>bla_{KPC}</i> , <i>bla_{NDM-1}</i> , <i>bla_{VIM}</i> e <i>bla_{IMP}</i>	33
Tabela 5:	Cepas padrão usadas como controle positivo nos testes genotípicos.....	34
Tabela 6:	Resultados do antibiograma de <i>Acinetobacter lwoffii</i>	36
Tabela 7:	Resultados do antibiograma de <i>Vibrio metschnikovi</i>	38
Tabela 8:	Resultados do antibiograma de <i>Shewanella putrefaciens</i> , <i>Pseudomonas sp.</i> e <i>Pseudomonas stutzeri</i>	39
Tabela 9:	Resultados do antibiograma de <i>Aeromonas hydrophila</i>	41
Tabela 10:	Resultado do antibiograma de <i>Serratia sp.</i> , <i>Providencia rustigianii</i> e <i>Enterobacter gergoviae</i>	43
Tabela 11:	Resultado do antibiograma de <i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> e <i>Bacillus pulmillus</i>	45
Tabela 12:	Resultado do antibiograma de <i>Micrococcus luteus</i>	46
Quadro 1:	Isolados de amostras de sedimento de manguezal da Baía Babitonga que apresentaram resistência ou resistência intermediária a antibióticos.....	47
Quadro 2:	Possíveis genes de resistência associados aos microrganismos resistentes ou com resistência intermediária isolados de sedimentos de manguezal da Baía Babitonga, conforme literatura.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	American Type Culture Collection
BRA	Bactérias resistentes a antibióticos
CIM	Concentração Inibitória Mínima
TEM	Temoniera
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
DNA	Deoxyribonucleic acid / Ácido desoxirribonucleico
ESBL	Extended-spectrum beta-lactamase / Beta Lactamase de Espectro Estendido
FC	Fibrose Cística
GRAs	Genes de Resistência a Antibióticos
ONGs	Organizações Não Governamentais
H	Horas
Min	minutos
PCR	Polymerase Chain Reaction / Reação em Cadeia da Polimerase
PBP	Proteína de Ligação à Penicilina
PRAD	Plano de Recuperação de Áreas Degradadas
TBE	Tris/Borato/EDTA
UNIVILLE	Universidade da Região de Joinville

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	6
2 OBJETIVOS	8
2.1 OBJETIVO GERAL	8
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	8
3 REVISÃO DE LITERATURA	9
3.1 ANTIMICROBIANOS: IMPORTÂNCIA E APLICAÇÕES.....	9
3.2 RESISTÊNCIA MICROBIANA, POR QUE ACONTECE?.....	9
3.3 MECANISMOS DE RESISTÊNCIAS.....	11
3.3.1 β -lactamases de espectro estendido (ESBLs).....	14
3.3.2 Presença de resistência a antimicrobianos no meio ambiente.....	15
3.3.3 Principais microrganismos portadores de genes de resistência a antimicrobianos em ambientes aquáticos	16
3.4 MANGUEZAIS.....	17
3.4.1 Importância do ecossistema do manguezal	18
3.4.2 Baía Babitonga.....	19
4 INTERDISCIPLINARIDADE	21
5 METODOLOGIA	22
5.1 ÁREA DE ESTUDO.....	22
5.2 PONTOS DE COLETA DAS AMOSTRAS.....	22
5.3 ATIVAÇÃO DOS MICRORGANISMOS.....	24
5.4 ISOLAMENTO DOS MICRORGANISMOS	24
5.5 IDENTIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS	26
5.5.1 Identificação fenotípica.....	26
5.6 PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS.....	28
5.6.1 Bacilos e cocobacilos Gram-negativos.....	28
5.6.2 Bacilos Gram-positivos.....	29
5.6.2.1 Sistema automatizado	29
5.6.2.2 Etest®	30
5.7 IDENTIFICAÇÃO DOS GENES CAUSADORES DE RESISTÊNCIA BACTERIANA	30
5.7.1 Obtenção do DNA microbiano	30
5.7.2 Avaliação da viabilidade do DNA microbiano	30
5.7.3 Investigação dos genes alvos	31
5.7.3.1 Identificação de genes codificadores de ESBL	31
5.7.3.2 Identificação de genes codificadores de carbapenemases	32
5.7.4 Verificação dos produtos da PCR via eletroforese	34
5.8 - ANÁLISE DOS RESULTADOS	34
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
6.1 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS	35
6.2 DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS	36
6.3 IDENTIFICAÇÃO DOS GENES ASSOCIADOS À RESISTÊNCIA BACTERIANA	48

7- CONCLUSÃO	54
REFERÊNCIAS.....	55

1 INTRODUÇÃO

O manguezal apresenta uma grande diversidade de plantas, artrópodes, moluscos, peixes e aves, e constitui um criadouro natural para inúmeras espécies, estabelecendo um local seguro para reprodução, desova e nascimento, apresentando grande importância ecológica e também econômica, pois fornece meios de sustento para comunidades ribeirinhas (KATHIRESAN; BINGHAM, 2001; MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2018; GHOSH *et al.*, 2010).

Cerca de 35% dos manguezais do mundo já foram destruídos desde a década de 1980 e as principais ameaças a esse ecossistema são o seu uso para atividades agrícolas, a aquicultura e o desenvolvimento urbano (IBHARIM *et al.*, 2015; ROMAÑACH *et al.*, 2018).

A Baía Babitonga, localizada ao norte do Estado de Santa Catarina, abriga cerca de 75% das florestas de manguezal da região Sul do Brasil. Devido a sua localização geográfica, ao longo dos anos a região vem sofrendo com a ocupação desordenada, resultando na degradação de seus ecossistemas, especialmente os manguezais. A ocupação ilegal, o assoreamento acelerado por supressão ilegal da vegetação, a pesca predatória, a caça clandestina, a ocupação ilegal das áreas públicas, o despejo de materiais sólidos e a poluição hídrica por esgotos domésticos e industriais são algumas das atividades que mais ameaçam o equilíbrio da região (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2007; VIEIRA *et al.*, 2008).

O ecossistema do manguezal é uma área de transição entre os ambientes terrestre e marinho, onde ocorre o encontro de águas de rios com a água do mar como nas margens de baías, enseadas, barras, desembocaduras de rios, lagunas e reentrâncias costeiras (KRUG; LEÃO; AMARAL, 2007; MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2007).

Desde a década de 1940, quantidades cada vez maiores de antimicrobianos têm sido utilizadas em diferentes atividades, humanas, veterinárias e agrícolas. Após o seu uso, as águas dos rios são os principais receptores desses poluentes, uma vez que recebem os esgotos urbano, industrial e hospitalar. Essa disseminação via sistema fluvial, proporciona a seleção constante e pressão de manutenção de populações de cepas resistentes em todos os ambientes (FUENTEFRÍA *et al.* 2008; DAVIES; DAVIES, 2010).

Sendo os rios considerados uma das principais fontes de água, direta ou indiretamente, para consumo humano e animal, essa poluição permite que espécies bacterianas se desenvolvam e disseminem genes de resistência no meio ambiente (DAVIES; DAVIES, 2010). No meio ambiente a proliferação de bactérias resistentes a antibióticos ocorre via transmissão vertical e horizontal de genes de resistência, possibilitando a difusão da resistência entre grupos bacterianos ambientais (GAO *et al.*, 2018). Desta forma, o meio ambiente tem se tornado um grande reservatório de bactérias resistentes, uma vez que já há relatos de cepas resistentes a antimicrobianos na água e no solo. Além da presença de resistência bacteriana em estuários costeiros onde ocorre a disposição de esgoto humano e hospitalar já ter sido relatada (AMINOV, 2009).

A descoberta de cepas bacterianas resistentes a antimicrobianos em amostras ambientais permite visualizar o alcance que as resistências podem atingir, podendo interferir na vida do ecossistema e disseminar ainda mais as cepas resistentes no ambiente, o que ajuda a entender parte da origem das resistências observadas no ambiente hospitalar.

Considerando a importância econômica e ecológica da Baía Babitonga, torna-se relevante investigar a presença de bactérias patogênicas portadoras de genes de resistência a antimicrobianos em amostras de sedimentos do manguezal.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Determinar o perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de bactérias com potencial patogênico isoladas de sedimentos de manguezal da Baía Babitonga.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar bactérias com potencial patogênico de sedimentos de manguezal da Baía Babitonga;
- Identificar fenotipicamente as bactérias isoladas;
- Determinar o perfil de susceptibilidade a antimicrobianos das bactérias isoladas;
- Pesquisar a presença de genes de resistência a cefalosporinas e a carbapenêmicos.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 ANTIMICROBIANOS: IMPORTÂNCIA E APLICAÇÕES

Os antimicrobianos estão entre as classes de medicamentos mais prescritas no mundo. A sua introdução no mercado permitiu o aumento da expectativa de vida, uma vez que eles são cruciais em cirurgias invasivas, tratamentos de quimioterapia, transplantes e outros procedimentos, com o objetivo de controlar infecções que podem ser fatais (BLAIR *et al.*, 2015; MARQUIOTI; LANES; CASTRO, 2015).

Os antimicrobianos revolucionaram a medicina em muitos aspectos, especialmente por serem um dos tratamentos terapêuticos mais eficazes contra doenças infecciosas. A sua descoberta foi um grande acontecimento na história humana (WRIGHT; POINAR, 2012). Entretanto, após o uso em seres humanos, os antibióticos e seus metabólitos são lançados para o sistema de esgotos e, dependendo de sua polaridade, solubilidade em água e persistência, os compostos podem ser degradados, se associar com lodo de esgoto, ou serem liberados para rios (WELLINGTON *et al.*, 2013).

A ampla gama de utilização dos antibióticos aumenta a exposição dos seres humanos a esses produtos, como no uso de lodo contendo resíduo de antibiótico em sistemas agrícolas como fertilizante; irrigação de solo agrícola com águas residuais; consumo de peixe exposto a antibióticos liberados para a água intencionalmente (aquicultura); consumo de água contendo resíduos de produtos farmacêuticos; água costeiras usadas para recreação. Este fato resulta em uma pressão evolutiva para o surgimento de resistências a antibióticos (BLAIR *et al.*, 2015; DAVIES; DAVIES, 2010; KINNEY *et al.*, 2006).

3.2 RESISTÊNCIA MICROBIANA, POR QUE ACONTECE?

Uma ampla gama de mecanismos bioquímicos e fisiológicos pode ser responsável pela resistência. No caso específico dos agentes antimicrobianos, a complexidade dos processos que contribuem para a emergência e a disseminação da resistência não pode ser subestimada, e a falta de conhecimento básico sobre esses tópicos é uma das principais razões pelas quais houve tão pouca realização na efetiva prevenção e controle do desenvolvimento de resistência. A maioria das agências

internacionais, nacionais e locais reconhece esse problema. Muitas resoluções e recomendações foram propostas, e numerosos relatórios foram escritos, mas em vão: o desenvolvimento da resistência aos antimicrobianos é implacável (DAVIES; DAVIES, 2010).

Embora muita atenção tenha sido dada na resistência a antibióticos de patógenos em pacientes de hospitais e nas bactérias que são diretamente responsáveis por efeitos adversos sobre a saúde humana, o desenvolvimento de resistência aos antibióticos é um fenômeno ecológico natural e é o produto de bilhões de anos de evolução (BLAIR *et al.*, 2015). A troca de genes é uma propriedade universal das bactérias que tem ocorrido ao longo de eras de evolução microbiana. A descoberta da presença de sequências de genes bacterianos putativos em genomas eucarióticos aumentou a consciência da grande importância da transferência horizontal de genes na evolução do genoma (DAVIES; DAVIES, 2010).

A transferência horizontal de genes é o processo de transferência de informação genética entre organismos, um processo que inclui a disseminação de genes de resistência a antibióticos entre as bactérias. A transferência horizontal de genes ocorre por três mecanismos genéticos que são bem compreendidos:

- Transformação: as bactérias absorvem DNA do ambiente;
- Conjugação: as bactérias transferem genes diretamente para outra célula;
- Transdução: bacteriófagos (vírus bacterianos) movem genes de uma célula para outra (BURMEISTER, 2015).

As bactérias estão naturalmente presentes em todo o meio ambiente. Porém a coexistência em larga escala das bactérias ambientais com bactérias de fontes antropogênicas, fornece as condições seletivas e ecológicas ideais para que surjam novas cepas resistentes. Assim, o solo, a água e outros habitats enriquecidos com nutrientes podem atuar como pontos críticos para a transferência horizontal de genes (WELLINGTON *et al.*, 2013). Este não é um processo natural, mas uma situação humana sobreposta à natureza; talvez não haja melhor exemplo das noções darwinianas de seleção e sobrevivência (DAVIES; DAVIES, 2010).

A questão de como os genes de resistência a antibióticos são mantidos no ambiente é contraditória. Se a única função desses genes é conferir proteção contra as concentrações letais de antibióticos, a seleção e disseminação de genes de resistência a antibióticos devem ser ligados a fatores antropogênicos. O contato

repetitivo de bactérias a baixas concentrações de antibióticos, advindos do uso indiscriminado em atividades humanas, veterinárias e agrícolas, favorece o desenvolvimento das resistências, já que concentrações de antibióticos em áreas protegidas são normalmente abaixo dos limites de detecção e certamente abaixo da concentração inibitória mínima (CIM) para a maioria das bactérias ambientais (AMINOV, 2009; BORTOLOTTI *et al.*, 2018).

É possível ter uma visão geral de como a resistência bacteriana pode se estabelecer, por meio da análise da evolução no uso de alguns antibióticos (WELLINGTON *et al.*, 2013).

A introdução de penicilinas semissintéticas (por exemplo, ampicilina e carbenicilina) na década de 1960 e sua combinação subsequente com inibidores das beta-lactamases (por exemplo, amoxicilina mais ácido clavulânico) permitiu o sucesso no tratamento de infecções causadas por bactérias da ordem Enterobacterales. Nos 10 anos seguintes, beta-lactamases codificadas por plasmídeos (particularmente da família Temoniera - TEM) prejudicaram substancialmente essa vantagem terapêutica, resultando no aumento do uso de aminoglicosídeos (por exemplo, gentamicina e amicacina), cefalosporinas de terceira geração (por exemplo, cefotaxima e ceftazidima) e quinolonas (por exemplo, Ciprofloxacina) (WELLINGTON *et al.*, 2013).

Contudo, novamente as bactérias desenvolveram resistência. No final dos anos 70, o surgimento da resistência a aminoglicosídeos mediada por plasmídeos resultou em um uso substancial de cefalosporinas de terceira geração e quinolonas (WELLINGTON *et al.*, 2013).

Assim, percebe-se que a pressão seletiva exercida sobre uma classe de antibióticos favorece o desenvolvimento de resistência e força o uso de antibióticos diferentes para o tratamento de infecções que antes eram tratáveis (WELLINGTON *et al.*, 2013).

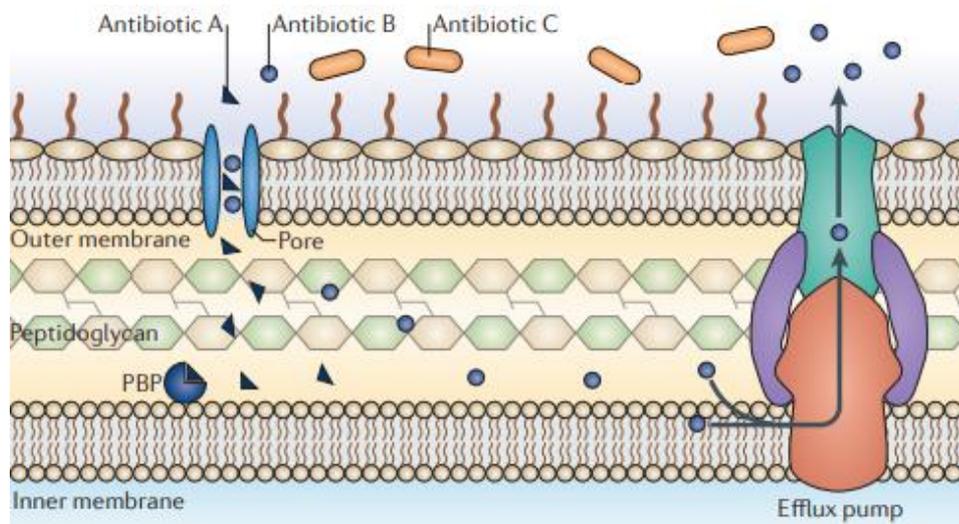
3.3 MECANISMOS DE RESISTÊNCIAS

A resistência intrínseca de uma espécie bacteriana a um determinado antibiótico é a capacidade dela resistir à ação de um antibiótico, como resultado de características estruturais ou funcionais inerentes (BLAIR *et al.*, 2015). Nessa situação, todas as cepas de uma mesma espécie bacteriana contêm em seu genoma,

o(s) gene(s) que confere(m) a resistência a um determinado antimicrobiano (GONZÁLEZ-CANDELAS *et al.*, 2017).

A Figura 1 mostra uma visão geral dos mecanismos de resistência intrínseca. O exemplo mostrado é de antibióticos β -lactâmicos que tem ação ao estabelecer ligação com uma proteína de ligação à penicilina (PBP). O antibiótico A pode entrar na célula através de uma proteína de membrana, o canal de porina, e atingir o seu alvo e inibir a síntese de peptidoglicano. O antibiótico B também pode entrar na célula através de uma porina, mas ao contrário do antibiótico A, é eficientemente removido por efluxo. O antibiótico C não pode atravessar a membrana externa e, portanto, é incapaz de acessar a PBP alvo (BLAIR *et al.*, 2015).

Figura 1- Mecanismos de resistência bacteriana intrínseca a antibióticos β -lactâmicos



Fonte: Blair *et al.* (2015).

Diferentemente da resistência intrínseca, que é uma resistência natural, a resistência adquirida ou extrínseca, se apresenta de maneiras diferentes para cada tipo de microrganismo, ou seja, em uma mesma espécie bacteriana são observadas cepas sensíveis e resistentes a um mesmo antimicrobiano (GONZÁLEZ-CANDELAS *et al.*, 2017).

O desenvolvimento de resistência adquirida pode acontecer por meio de vários mecanismos, podendo ser:

- a) Diminuição da concentração intracelular do antibiótico, como resultado de uma alteração na permeabilidade da membrana ou pela ação da bomba de efluxo;

A permeabilidade da membrana celular é mediada pela presença de proteínas especiais, as porinas, que estabelecem canais específicos pelos quais as substâncias podem passar para o espaço periplasmático e, em seguida, para o interior da célula. As bactérias utilizam-se dessas proteínas para a aquisição de resistência. Temos como exemplo, uma alteração na porina específica da membrana celular externa de *P. aeruginosa*, pela qual o Imipenem geralmente se difunde, tornando assim a *P. aeruginosa* resistente ao Imipenem (ANVISA, 2007). A alteração da permeabilidade também pode acontecer por meio do espessamento da parede celular, como ocorre nas cepas de *S. aureus* resistentes aos glicopeptídeos (GONZÁLEZ-CANDELAS *et al.*, 2017).

A ação da bomba de efluxo permite a expulsão de substâncias tóxicas do interior das células para o meio externo. Dessa forma, essas bombas podem realizar o efluxo ativo de antimicrobianos, do meio intracelular para o extracelular. Um exemplo de bactéria que se utiliza desse mecanismo é a resistência às tetraciclinas codificada por plasmídeos em *Escherichia coli* (ANVISA, 2007; MARTÍNEZ; BAQUERO, 2014).

- b) Modificação do alvo de ação do antibiótico por mutação genética ou modificação pós-traducional do alvo;

A ação de um medicamento frente a um microrganismo depende inevitavelmente da interação entre o fármaco e o receptor. A alteração do receptor de ação, ocorre, muitas vezes, por meio de mutação cromossômica, o que resulta na alteração química do receptor, o que impede a interação de forma perfeita entre o fármaco e o receptor. Um exemplo dessa alteração é visto na resistência de *S. aureus* à Meticilina (MRSA) (ANVISA, 2007).

- c) Inativação do antibiótico por hidrólise ou modificação por ação de enzimas.

A degradação do antimicrobiano por ação de enzimas é o mecanismo de resistência mais frequente. As enzimas β -lactamases hidrolizam a ligação amida do anel beta-lactâmico, destruindo, assim, seu potencial de ação. Existem diferentes enzimas da classe das β -lactamases. Essas enzimas são codificadas em cromossomos ou sítios extra cromossômicos, por meio de plasmídeos ou transposons, podendo ser produzidas de modo constitutivo ou induzido (MARTÍNEZ; BAQUERO, 2014). Esse mecanismo de resistência compreende o grupo das β -lactamases de espectro estendido (ESBL), β -lactamases induzíveis do tipo AmpC e as carbapenemases (GOMES *et al.*, 2014).

3.3.1 β -lactamases de espectro estendido (ESBLs)

As β -lactamases de espectro estendido (ESBLs) são enzimas de amplo espectro produzidas mais caracteristicamente pelas espécies de *Escherichia coli*, *Klebsiella* e *Proteus*. Representando a facilidade com que a resistência pode ocorrer, essas enzimas podem se desenvolver com base em uma mudança em apenas um aminoácido nas β -lactamases normalmente produzidas. Apesar da mudança estrutural mínima, as ESBLs têm a capacidade de inativar muitos fármacos β -lactâmicos de amplo espectro (KARAM *et al.*, 2016).

As β -lactamases são codificadas por genes chamados *bla*, que podem estar presentes no cromossomo bacteriano ou em plasmídeos. A expressão dos genes *bla* pode ser induzida pelo uso de medicamentos da classe dos β -lactâmicos, como também pode estar continuamente ativada. Assim, as β -lactamases podem estar presentes de forma induzível ou intrínseca (LIVERMORE, 1995).

As primeiras ESBLs descritas eram derivadas de β -lactamases do tipo TEM e SHV, embora esses tipos sejam muito presentes, atualmente o tipo CTX-M é o mais amplamente distribuído, além de ser o tipo predominante em muitas regiões do mundo (BRADFORD, 2001; LIVERMORE, 2008).

A contaminação ambiental com bactérias da ordem Enterobacterales produtoras de ESBL é cada vez mais relatada, especialmente em países em desenvolvimento, mas também em países desenvolvidos. Um ambiente de especial interesse são as águas residuais, pois capturam os rejeitos das atividades humanas e têm potencial para ampla contaminação ambiental (DOI; IOVLEVA; BONOMO, 2017).

A terapia para o tratamento de bactérias produtoras de ESBL e AmpC é a aplicação de antimicrobianos carbapenêmicos. E a classe de β -lactamases capazes de hidrolisar esses medicamentos, é a classe das carbapenemases. Embora o nome carbapenemase identifique a capacidade dessas enzimas de inativar antibióticos carbapenêmicos, as carbapenemases não são específicas para antibióticos carbapenêmicos, mas têm a capacidade de hidrolisar β -lactâmicos de todas as classes (KARAM *et al.*, 2016).

3.3.2 Presença de resistência a antimicrobianos no meio ambiente

Apesar do fato de que a resistência a antibióticos é uma das principais e crescentes preocupações de saúde pública, a vigilância da expansão desse fenômeno no meio ambiente é notavelmente limitada (MARTI; VARIATZA; BALCAZAR, 2014).

O uso excessivo e indevido de agentes antimicrobianos na medicina humana e medicina veterinária, na criação de animais, indústrias, e sua posterior liberação no tratamento de águas residuais, contribuíram para o surgimento e disseminação de bactérias resistentes no meio ambiente, incluindo bactérias causadoras de infecções em humanos e animais (GAO *et al.*, 2018; MARTI; VARIATZA; BALCAZAR, 2014). Essas atividades eliminam no meio ambiente baixas concentrações de antimicrobianos, porém estudos recentes revelaram que mesmo concentrações subinibitórias de antibióticos podem promover resistência a antibióticos (MARTI; VARIATZA; BALCAZAR, 2014)

A proliferação de genes de resistência a antibióticos (GRAs) e bactérias resistentes a antibióticos (BRA) aumenta a migração, transformação e difusão da resistência a antibióticos entre grupos bacterianos ambientais, tornando eventualmente as bactérias ambientais um reservatório natural para vários GRAs (GAO *et al.*, 2018).

O fato de as bactérias obterem rapidamente resistência a antibióticos não pode ser explicado apenas por mutação genética. No ambiente natural aberto, a transmissão vertical e horizontal desempenha um papel importante no processo de difusão de GRAs. Como os GRAs têm ambas as características biológicas da replicação e a característica física e química de persistência no meio ambiente, o processo pode ser descrito como um processo de comunicação complexo multidimensional e multi-mecanismo (GAO *et al.*, 2018).

Dois mecanismos foram comumente propostos para descrever a disseminação e proliferação de GRAs no meio ambiente. Bactérias humanas, ou seja, de origem clínica, resistentes a antibióticos que possuem GRAs são liberadas no ambiente via caminhos semelhantes aos antibióticos de fontes pontuais, como estações de tratamento de águas residuais municipais (OBERLÉ *et al.*, 2012), ou fontes não pontuais, como escoamento superficial de campos agrícolas (HAMSCHEER *et al.*, 2005).

Alternativamente, o estresse exercido por poluentes (por exemplo, antibióticos, metais, biocidas e desinfetantes) co-seleciona bactérias portadoras de GRAs e/ou estimula a transferência horizontal de genes de GRAs entre bactérias via elementos genéticos móveis, como plasmídeos, transposons e integrons (KNAPP *et al.*, 2008; BHATTACHARYYA *et al.*, 2019).

Em vista da amplificação em presença de agentes de seleção, transferência entre bactérias hospedeiras e existência em formas intra ou extracelulares, o destino e transporte de GRAs são considerados únicos em comparação com outros contaminantes no ambiente (CHEN *et al.*, 2013).

Nos últimos anos, pesquisas sobre a persistência de resistência a antibióticos no ambiente aumentaram. GRAs e BRA já foram isolados do solo, sedimentos, esgoto urbano, rios, água de abastecimento e até ambientes marinhos (CHEN *et al.*, 2013) (CALERO-CÁCERES *et al.*, 2017; GRIFFIN *et al.*, 2019; SZEKERES *et al.*, 2017; BORTOLOTTI *et al.*, 2018)

Vias potenciais para transmissão GRAs de bactérias ambientais para patógenos humanos prejudicam seriamente a eficácia dos antibióticos, representando uma grave ameaça à saúde pública (CHEN *et al.*, 2013). Sendo assim, entender as fontes e mecanismos de difusão de GRAs no ambiente é fundamental para o desenvolvimento de estratégias para controlar a disseminação de resistência a antibióticos (CHEN *et al.*, 2013).

Atualmente é universalmente aceito que o meio ambiente abriga genes de resistências a antibióticos diversos. Junto a isso, sabe-se que os ecossistemas aquáticos são um ambiente ideal para a aquisição e difusão desses genes (AMINOV, 2009), sendo que, a presença de resistência bacteriana em estuários costeiros onde ocorre a disposição de esgoto humano e hospitalar já foi relatada (BHATTACHARYYA *et al.*, 2019; AMINOV, 2009).

3.3.3 Principais microrganismos portadores de genes de resistência a antimicrobianos em ambientes aquáticos

Os sedimentos aquáticos marinhos mantêm uma mistura ativa de comunidades bacterianas, com evidências que sugerem que eles podem ser um reservatório substancial de patógenos (CHEN *et al.*, 2015). A detecção de numerosos genes de resistência a antimicrobianos (GRA's) distribuídos globalmente em sedimentos

aquáticos tem sido relatada nos últimos anos (CHEN *et al.*, 2013). Vários GRA's foram documentados como presentes em sedimentos aquáticos, como *sul 1*, *sul 2*, *tetB*, *tetC*, *tetM*, *tetO*, *tetW* (CHEN *et al.*, 2015; PEI *et al.*, 2006). Portanto, os sistemas de sedimentos são uma matriz ambiental significativa para transferência e recombinação genética, e as partículas de sedimentos oferecem uma interface essencial para interações complexas da comunidade microbiana, permitindo a transferência de GRA's (WATTS *et al.*, 2017).

3.4 MANGUEZAIS

Os manguezais são ecossistemas costeiros de transição de ambientes terrestres para aquáticos, em regiões tropicais e subtropicais, onde ocorre o encontro de água de rios com a água do mar (KATHIRESAN; BINGHAM, 2001; KRUG; LEÃO; AMARAL, 2007).

Esse ecossistema representa 8% de toda a linha de costa do planeta e um quarto da linha de costa da zona tropical, perfazendo um total de 181.077 km². O Brasil é o segundo país em extensão de áreas de manguezal (13.400 km²), ficando atrás apenas da Indonésia, que apresenta 42.550 km², distribuídos ao longo de seus arquipélagos (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2018).

O termo mangue é empregado para designar um grupo floristicamente diverso de árvores tropicais que, embora pertençam a famílias botânicas sem qualquer relação taxonômica entre si, compartilham características fisiológicas similares (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2018).

Esses ambientes são caracterizados por substratos lodosos ricos em nutrientes e pobres em oxigênio que sofrem influência de muitos fatores físicos, químicos e biológicos, como, variações de salinidade, frequência e duração de inundações, entrada de água doce, temperatura, tempestades, atividades da flora e fauna (FERREIRA, 2007). Dessa forma as plantas que pertencem a esse ambiente necessitam de adaptações especiais que permitem que tais espécies cresçam em ambientes abrigados, banhados por águas salobras ou salgadas, com reduzida disponibilidade de oxigênio e substrato inconsolidado (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2018; FERREIRA *et al.*, 2010).

Estas comunidades halófitas podem crescer sob vários tipos de condições ambientais; portanto, suas características estruturais e funcionais podem variar consideravelmente nas escalas global, regional e local (FERREIRA *et al.*, 2010).

Além disso, essas regiões costeiras constituem áreas propícias à alimentação, reprodução e proteção de muitas espécies animais, que são atraídas por um dos mais eficientes sistemas de transformação de matéria orgânica em nutrientes para o meio, sustentando a base de teias alimentares costeiras, gerando bens e serviços sem custos para os usuários ribeirinhos, caiçaras e praianos (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2018).

No Brasil, os manguezais estão sob constante ameaça pelo desenvolvimento da aquicultura, indústria e desenvolvimento urbano, entre outras coisas, que destruíram mais de 50,000 ha, ou cerca de 4% do total dos mangues nas últimas três décadas. Os esforços de restauração permitem minimizar as perdas, mas apenas 5% da área total degradada já foi recuperada (ROMAÑACH *et al.*, 2018).

Cerca de 70% dos manguezais brasileiros estão hoje localizados dentro de áreas de preservação facilitando o gerenciamento. No entanto, prejudicada por interesses econômicos e inibida pela falta de políticas de conservação e melhores práticas, o futuro da conservação dos manguezais no Brasil depende da integração das comunidades indígenas e ribeirinhas, que dependem de bens e serviços de mangue, com outros setores da sociedade através da cogestão integrada baseada na ciência e na comunidade. ONGs, agências governamentais, instituições acadêmicas e agências de fomento podem desempenhar o papel de importantes agentes de ação e geração de consciência (ROMAÑACH *et al.*, 2018).

3.4.1 Importância do ecossistema do manguezal

Os manguezais exercem importantes funções ecológicas, entre elas, proteção e estabilização das zonas costeiras, nutrição da área costeira (GHOSH *et al.*, 2010), filtração de poluentes, proteção contra erosão do solo, controle de enchentes e expansão da zona costeira aprisionando sedimentos (LEE *et al.*, 2014), além de desempenharem um papel importante como áreas de alimentação e reprodução de muitos organismos, incluindo plantas, animais e microrganismos (GHOSH *et al.*, 2010).

Além do valor único da biodiversidade, os manguezais são importantes também pelos serviços ecossistêmicos que fornecem aos humanos, especialmente às populações costeiras. Estes serviços vão desde o tangível, como no fornecimento de madeira, carvão vegetal, e produtos de pesca como peixes e moluscos, além do turismo, recreação e educação, até o abstrato, como valores espirituais e estéticos (FRIESS, 2016).

Cerca de 35% dos manguezais do mundo já foram destruídos desde a década de 1980. Atividades antrópicas, como atividades industriais, mineração de carvão, refinarias, desmatamento, eliminação de resíduos industriais e/ou agrícolas, e várias outras atividades humanas têm contribuído significativamente para a rápida degradação dos ecossistemas de mangue. No entanto, a principal ameaça é o uso no mangue para atividades agrícolas, e o desenvolvimento urbano (IBHARIM *et al.*, 2015; ROMANACH *et al.*, 2018).

3.4.2 Baía Babitonga

O complexo estuarino da Baía Babitonga localiza-se entre as latitudes 26° 07' e 26° 27' Sul, caracterizando-se por ser o maior complexo estuarino do Estado de Santa Catarina e por preservar a maior área de manguezal do território catarinense. A bacia hidrográfica da Baía Babitonga, com uma superfície de 1.567 km², drena terrenos de seis municípios que circundam a baía: Garuva, Itapoá, Joinville, São Francisco do Sul, Araquari e Balneário Barra do Sul (VIEIRA *et al.*, 2008).

A baía possui águas calmas e quentes, com profundidade média de 6 m e máxima de 28 m. As margens são formadas por manguezais, praias arenosas e margens rochosas, e em seu interior há cerca de 24 ilhas. A região apresenta um clima mesotérmico úmido, com temperatura média anual de 20,5 °C e precipitação média de 2.265 mm (GROSE; HILLEBRANT; CREMER, 2013).

A respeito da relevância ecológica, o estuário é importante devido a sua alta produtividade biológica ser associada à ocorrência de estágios iniciais de muitos organismos, ou seja, apresenta importância como área de desova e berçário para muitas espécies (COSTA; SOUZA-CONCEIÇÃO, 2009).

Entre as atividades econômicas sustentadas por este sistema costeiro, destacam-se as atividades portuárias, a pesca e o cultivo de organismos marinhos

(VIEIRA *et al.*, 2008). Essas atividades representam uma grande pressão antrópica sobre o ecossistema, o que resulta em problemas como desmatamento, sobrepesca, ocupação ilegal das margens e contaminação das águas (CREMER *et al.*, 2006).

O aumento populacional na região do entorno da Baía Babitonga atraiu muitos empreendimentos. O crescimento econômico da região não foi acompanhado pelo tratamento e descarte adequado dos efluentes domésticos e industriais, gerando contaminação das águas e de muitos organismos da baía (CREMER *et al.*, 2006).

A região localmente conhecida como a “Praia do Lixo”, situa-se no município de São Francisco do Sul. A região recebeu essa designação, pelo tipo de uso do solo entre 1950 a 1970, quando o local era aproveitado como depósito de resíduos domésticos, de materiais de construção e hospitalares. Foi executada nesta área uma intervenção denominada Plano de Recuperação de Áreas Degradadas (PRAD). Esse plano realizou a demolição de algumas edificações em uma área da região, sendo elas, ranchos de pesca e uma residência desocupada. O objetivo dessa ação foi diminuir a supressão da vegetação nativa, e controlar o depósito de resíduos de forma desordenada. Atualmente essa região ainda abriga residências, ranchos pesqueiros além de comércio local. O local tem medidas de saneamento básico e coleta de resíduos precários (PAGANI; PFUTZENREÜTER, 2020).

4 INTERDISCIPLINARIDADE

“One Health” é definido pela OMS como um conceito e abordagem para “projetar e implementar programas, políticas, legislação e pesquisa em que vários setores se comunicam e trabalham juntos para alcançar melhores resultados de saúde pública. As áreas de trabalho nas quais a abordagem “One Health” é particularmente relevante incluem a segurança alimentar, o controle de zoonoses e o combate à resistência aos antibióticos ” (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017). Ou seja, “One Health” é uma abordagem que reconhece que a saúde das pessoas está intimamente ligada à saúde dos animais e ao meio ambiente (ONE HEALTH COMMISSION, 2018)

A OMS trabalha em estreita colaboração com a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) e a Organização Mundial para a Saúde Animal (OIE) para promover respostas multissetoriais a ameaças à saúde pública. A colaboração entre estas organizações tem interface animal-ecossistema e leva em consideração o meio ambiente, bem como a saúde humana e animal e, unindo forças, fornece orientação sobre como reduzir os riscos nesses setores (ROBINSON *et al.*, 2016). Frente a isso, o estudo se encaixa no conceito “One Health” uma vez que aborda a correlação entre saúde humana e meio ambiente sob a ótica interdisciplinar, contribuindo para um conhecimento mais aprofundado sobre o microbioma existente na Baía Babitonga. Além disso, o estudo contribui com resultados sobre a dimensão da disseminação da resistência bacteriana no meio ambiente, que pode constituir um grave risco de saúde pública.

5 METODOLOGIA

5.1 ÁREA DE ESTUDO

O manguezal estudado está localizado na Baía Babitonga, maior complexo estuarino do Estado de Santa Catarina, com uma área de aproximadamente 160 km². As coletas foram realizadas no manguezal da região da Baía Babitonga, na cidade de São Francisco de Sul.

5.2 PONTOS DE COLETA DAS AMOSTRAS

O primeiro ponto de estudo é denominado Praia do Lixo, S26° 15.701' W048° 38.852, e está demonstrado na Figura 2.

Figura 2 - Ponto amostral Praia do Lixo.



Fonte: A autora

O segundo ponto amostral está localizado na Praia Avenida, S 26° 15'08.4" W 48° 38'38.3". Esse ponto foi escolhido devido a sua proximidade com a Praia do Lixo, além de ser caracterizado pela construção de moradias bem próximas às áreas

ambientais além de despejo de esgoto doméstico no ambiente, como demonstra a Figura 3, que foi realizada ao lado de um emissário de esgoto.

Figura 3 - Ponto amostral Praia Avenida.

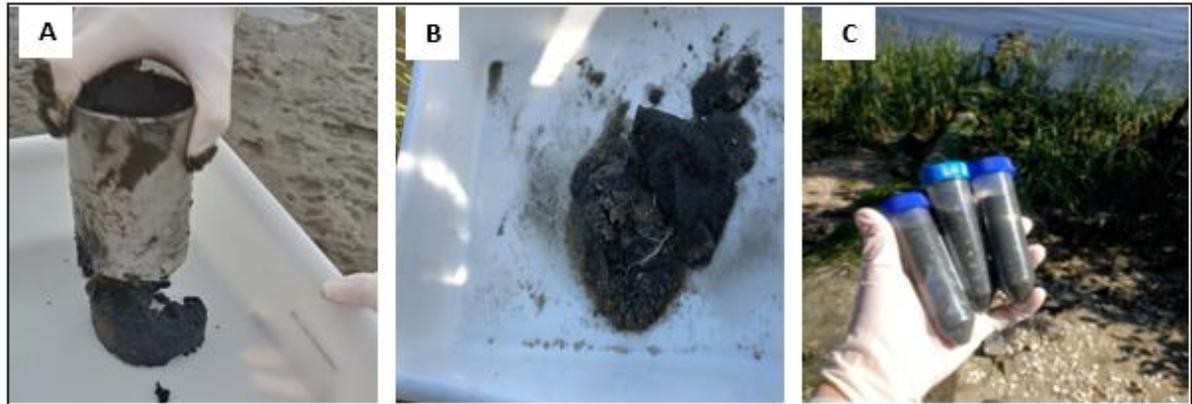


Fonte: A autora

Ambos os locais do manguezal sofrem intensa influência de atividades antrópicas, tais como a construção de moradias e despejo de esgoto doméstico.

Para diminuir a ação da variabilidade do ambiente, a amostragem foi feita a partir de três sub-amostras de sedimento do manguezal, com um metro de distância entre si, obtidas por um amostrador de 10 cm de comprimento, com 7 cm de diâmetro. Estas sub-amostras foram homogeneizadas *in situ* e armazenadas em tubos Falcon (50 mL) esterilizados (Figura 4). As amostras foram imediatamente transportadas para o Laboratório de Biotecnologia da Universidade da Região de Joinville (UNIVILLE).

Figura 4 - Coleta das amostras. A) Amostrador utilizado. B) Amostras de sedimento de manguezal. C) Amostras de sedimento de manguezal homogeneizada e armazenada em tubos Falcon.



Fonte: A autora

5.3 ATIVAÇÃO DOS MICRORGANISMOS

Para a ativação dos micro-organismos aeróbios mesófilos presentes nas amostras de sedimento coletadas foi utilizada a técnica de enriquecimento de culturas adaptada de Ouriques (2019).

A ativação dos microrganismos ocorreu em Caldo Marinho (Difco ®): indicado para o desenvolvimento de microrganismos isolados de ambientes marinhos. Esse meio de cultivo contém minerais e sais semelhantes à água do mar (MERCCK, 2018).

A inoculação das amostras foi feita em Caldo Marinho previamente autoclavado por 15 min, a 121 °C e 1 atm, transferindo-se 25 g de amostra em 225 mL de caldo. O frasco com caldo foi incubado em temperatura de 34 °C sob agitação de 150 rpm, por um período de 72 h, visando o crescimento de microrganismos aeróbios mesófilos.

5.4 ISOLAMENTO DOS MICRORGANISMOS

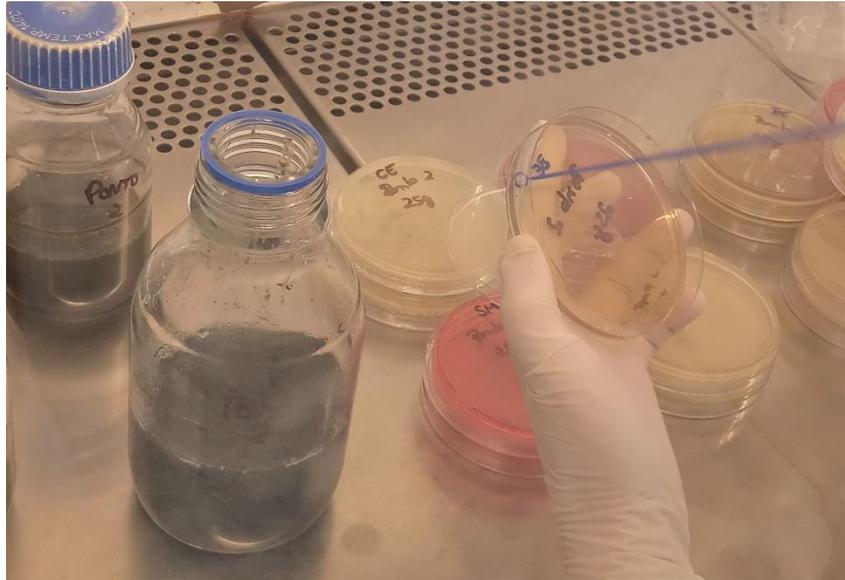
Após o período de incubação, as amostras foram repicadas para meios de cultura seletivos (Figura 5). Todos os repiques foram realizados em duplicata, a partir da suspensão inicial, utilizando alça bacteriológica estéril.

Os meios de cultura seletivos utilizados foram:

1. Ágar MacConkey (Biobrás ®): utilizado para isolar bacilos Gram-negativos (fermentadores e não fermentadores) e verificar a fermentação ou não da lactose. Tem em sua composição o cristal violeta, que inibe o crescimento de microrganismos Gram-positivos especialmente *Enterococos* sp. e *Staphylococcus* sp. (ANVISA, 2013).
2. Ágar Cetrimide (Merck ®): utilizado para isolamento e diferenciação de *Pseudomonas aeruginosa*. O meio contém inibidores de outros microrganismos que poderiam interferir no crescimento da *P. aeruginosa* (ANVISA, 2019).
3. Ágar Bile Esculina (Acumedia ®): utilizado para isolamento e identificação de *Enterococos* sp. As bactérias Bile-Esculina positivas, como o *Enterococos*, são capazes de crescer em presença de sais biliares. A hidrólise da esculina no meio resulta na formação de glicose e esculetina. A esculetina reage com íons férricos (fornecidos pelo composto inorgânico do meio – o citrato férrico), formando um complexo negro (ANVISA, 2013).
4. Ágar Manitol Salgado (Acumedia®): utilizado para isolamento de *Staphylococcus*. O meio contém uma alta concentração de sal, o que inibe o crescimento de outros microrganismos e permite o crescimento de espécies de *Staphylococcus* (NEOGEN, 2020).

Além dos meios de cultura seletivos, as amostras também foram repicadas para Ágar nutriente (Himedia®) que é um meio de cultura básico, não seletivo, ou seja, permite o crescimento de quase todos os organismos, por não ter inibidores de crescimento. É usado para manutenção de microrganismos, cultivo de organismos fastidiosos, e também para verificação de pureza antes de testes bioquímicos ou sorológicos (ANVISA, 2013).

Figura 5 - Procedimento de repique das amostras.



Fonte: A autora

5.5 IDENTIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS

5.5.1 Identificação fenotípica

A identificação microbiana foi realizada por meio de testes fenotípicos, sendo eles:

- 1) Coloração de Gram: teste aplicado para todas as colônias suspeitas. Para essa identificação foi utilizada uma lâmina de vidro limpa para microscópio. Com o auxílio de uma alça bacteriológica estéril foram colocadas duas a três gotas de água estéril na lâmina. Com a mesma alça foi transferida a colônia que se desejava identificar e foi feita uma suspensão bacteriana na lâmina. Em bico de Bunsen, a suspensão foi seca, de modo a fixá-la na lâmina. Na lâmina seca foi adicionado o corante cristal violeta. Após 1 min, o corante foi escoado da lâmina e foi adicionado o fixador, lugol fraco. Após 1 min, a lâmina foi lavada com a solução descorante de álcool-acetona (70:30), e após foi aplicado o contra corante safranina, e foi deixado agir por 30 s, o excesso do corante foi removido com auxílio de água. A lâmina foi novamente seca em bico de Bunsen e foi realizada a leitura em microscópio. Células coradas de azul escuro a violeta foram consideradas Gram-positivas, e células rosas foram consideradas Gram-negativas (SANTOS *et al.*, 2016).

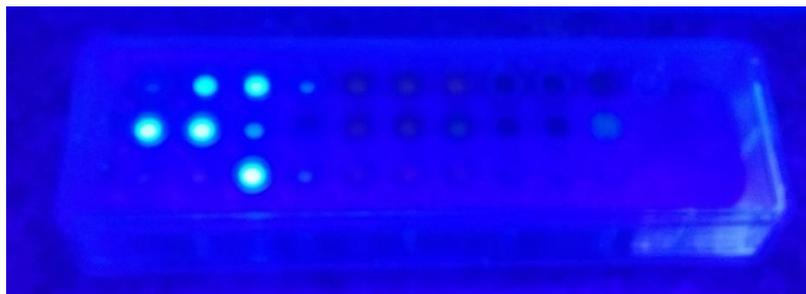
- 2) Kit de identificação BBL Crystal (BD®, Sparks, EUA) Gram positivos: consiste em um método de identificação miniaturizado que utiliza substratos convencionais, para testes de fermentação, oxidação, degradação e hidrólise, além de utilizar substratos fluorogênicos e cromogênicos. Destina-se à identificação de bactérias aeróbias Gram-positivas isoladas frequentemente. O teste contém 29 substratos enzimáticos e bioquímicos, desidratados, os quais são hidratados com a suspensão bacteriana do microrganismo que se pretende identificar. O teste contém também um controle negativo de fluorescência. Após o período de incubação, os poços de leitura são analisados quanto a existência de alterações de cor ou presença de fluorescência, alterações estas, que são consequências das atividades metabólicas do microrganismo. O padrão das 29 reações é convertido em um número de perfil de 10 dígitos, o qual é comparado com a base de dados do BBL Crystal. Se o padrão existir na base de dados ele é identificado (CRYSTAL, 2015). Representações do kit após incubação estão demonstradas nas Figuras 6 e 7.

Figura 6 - Leitura do Kit BBL Crystal (BD®, Sparks, EUA) Gram-positivos sob luz visível.



Fonte: A autora.

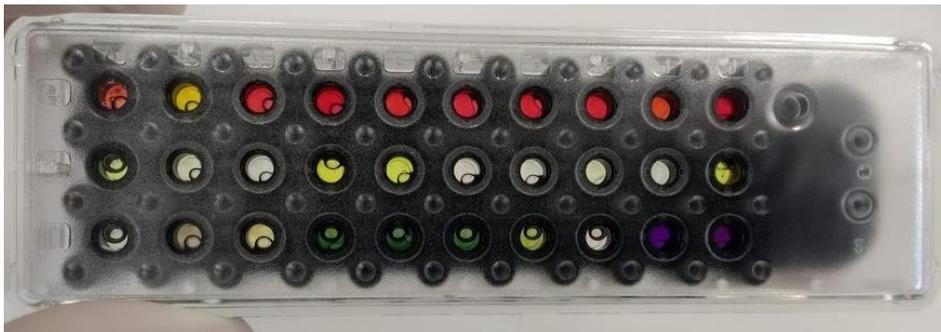
Figura 7 - Leitura do Kit BBL Crystal (BD®, Sparks, EUA) Gram-positivos sob luz UV.



Fonte: A autora.

3) Kit de identificação BBL Crystal (BD ®, Sparks, EUA) Gram-negativos: consiste em um método de identificação miniaturizado que utiliza substratos convencionais, para testes de fermentação, oxidação, degradação e hidrólise, totalizando 30 substratos. Destina-se à identificação de bactérias aeróbias gram-negativas que pertençam à ordem Enterobacterales, assim como de outros bacilos Gram-negativos fermentadores e não fermentadores de glicose. O teste contém 30 substratos enzimáticos e bioquímicos, desidratados, os quais são hidratados com a suspensão bacteriana do microrganismo que se pretende identificar. Os microrganismos foram previamente testados quanto a oxidase, utilizando Tiras de Oxidase (Labordin ®) e quanto a capacidade do microrganismos degradar o aminoácido triptofano, utilizando o reativo de Kovacs (Labordin®). Após o período de incubação, os poços de leitura são analisados quanto a existência de alterações de cor, alterações estas, que são consequências das atividades metabólicas do microrganismo. O padrão das 30 reações é convertido em um número de perfil de 10 dígitos, o qual é comparado com a base de dados do BBL Crystal. Se o padrão existir na base de dados ele é identificado (CRYSTAL, 2004). A representação do Kit, após a incubação, está demonstrada na Figura 8.

Figura 8 - Kit de identificação microbiana BBL Crystal (BD ®, Sparks, EUA) Gram-negativos após incubação.



Fonte: A autora

5.6 PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS

5.6.1 Bacilos e cocobacilos Gram-negativos

Os microrganismos isolados e identificados como bacilos ou cocobacilos Gram-

negativos foram submetidos à avaliação do perfil de suscetibilidade a antimicrobianos, o qual foi determinado de acordo com a metodologia de Bauer (1966) e CLSI (2018a). Os microrganismos isolados foram cultivados em meio de cultura não seletivo por 24 h, a 34 °C. Após este período, foi feita uma suspensão bacteriana de cada microrganismo com a turbidez equivalente ao padrão 0,5 da escala MacFarland. Em seguida, a suspensão foi inoculada em diversas direções com a ajuda de um swab estéril sobre a placa de Petri contendo ágar Müller-Hinton (Kasvi ®). Após esse procedimento, os discos contendo os antimicrobianos a serem testados foram distribuídos sobre a placa e esta foi armazenada em estufa a 35 °C, por 24 h, para a subsequente medida do diâmetro dos halos de inibição.

Os antimicrobianos testados para cada microrganismo constam no item 6.2 e foram determinados de acordo com os protocolos do “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI, 2018b; CLSI, 2015).

Para todos os antimicrobianos testados foi realizado controle de qualidade com as cepas *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.

5.6.2 Bacilos Gram-positivos

5.6.2.1 Sistema automatizado

A determinação do perfil de susceptibilidade aos antibióticos Penicilina, Ampicilina, Clindamicina, Eritromicina, Tetraciclina e Gentamicina foi realizada pelo sistema automatizado Microscan Walkaway Plus (Beckman Coulter, EUA), por meio da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) para cada antibiótico.

O sistema automatizado Microscan Walkaway Plus consiste em microplacas ou painéis contendo agentes antimicrobianos com suas respectivas diluições para a determinação da susceptibilidade antimicrobiana. Por meio desta técnica obteve-se a CIM para cada antibiótico, que correspondeu à menor concentração capaz de promover a inibição da suspensão bacteriana padronizada. A interpretação da susceptibilidade (categorizada em “sensível, intermediário ou resistente”) aos antibióticos foi realizada manualmente utilizando-se os pontos de corte recomendados pelo CLSI no documento M045 de 2015.

5.6.2.2 Etest®

A definição da CIM do antibiótico Meropenem foi realizada pelo método quantitativo de fita padronizada Etest® (bioMérieux, Brasil) contendo gradiente de concentração exponencial.

Preparou-se uma suspensão bacteriana a partir das colônias isoladas, com crescimento prévio por 18 a 24 h. A turbidez da suspensão foi comparada ao padrão 0,5 na escala MacFarland. A seguir, essa suspensão foi semeada em placa contendo meio de cultura ágar Mueller-Hinton (bioMérieux ®) e, após cinco minutos, foi feita a aplicação da fita Etest®. Em seguida, as placas foram incubadas em posição invertida em estufa a 35 °C, por 16 a 18 h. A interpretação dos resultados foi realizada conforme o estabelecido pelo CLSI, documento M045 de 2015.

5.7 IDENTIFICAÇÃO DOS GENES CAUSADORES DE RESISTÊNCIA BACTERIANA

5.7.1 Obtenção do DNA microbiano

Para a obtenção do DNA bacteriano, foi utilizado o método de choque térmico (BARATTO; MEGIOLARO, 2012; VANEECHOUTTE *et al.*, 1995), com modificações, a partir de cultivo em meio sólido (ágar Mueller-Hinton). Primeiramente, duas a três colônias de uma cultura pura, coletadas com alça de inoculação, foram ressuspensas em 100 µL de água destilada estéril, em microtubo de 1,5 mL. As suspensões foram submetidas a banho com água em ebulição por 5 min e, em seguida, a choque térmico em banho de gelo por 5 min. O procedimento de fervura e resfriamento foi repetido por um total de 3 vezes, seguido de centrifugação (Eppendorf 5415 R, Hamburgo, Alemanha) a 8.000 x g por 10 min. Ao final do processamento, o sobrenadante foi coletado e o precipitado, descartado. O sobrenadante contendo o DNA bacteriano foi qualificado e quantificado por meio de análise espectrofotométrica (leituras a 260 e 280 nm) em aparelho Epoch (BioTek Instruments, Winooski, EUA) e, em seguida, armazenado a -20 °C até o uso subsequente.

5.7.2 Avaliação da viabilidade do DNA microbiano

Para verificar a viabilidade do DNA extraído para fins das análises genotípicas subsequentes, foi aplicada a PCR no DNA bacteriano recém obtido. Utilizou-se o par

de iniciadores específicos para o gene 16S rRNA - 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1492R (5'-GCAGAGATACCAGCAGAGATACACG-3') - que propiciam a amplificação de um segmento único de aproximadamente 1500 pb. O gene 16S rRNA codifica para a subunidade ribossômica 30S do RNA, que é parte do sítio de ocorrência da síntese proteica e, portanto, está presente em todas as eubactérias.

As reações foram estabelecidas em volume final de 50 µL, acrescentando-se, aproximadamente, 50 a 500 ng de DNA extraído à mistura de reagentes contendo 1 U de Platinum® Taq DNA Polimerase (Invitrogen, Brasil), 200 µM de dNTPs (GE Healthcare, Reino Unido), 1X PCR Buffer (Invitrogen), 50 pmols de cada iniciador (DNA Express, Brasil) e 1,5 mM de MgCl₂ (Invitrogen). As termociclagens foram realizadas em aparelho XP Cyclyer (BIOER Technology, Tóquio, Japão), tendo uma etapa de desnaturação inicial a 94 °C por 3 min, seguida de 40 ciclos de 94 °C por 1 min, 37 °C por 1 min e 72 °C por 2 min. Uma extensão final foi conduzida a 72 °C por 10 min (HAYASHI *et al.*, 2005).

5.7.3 Investigação dos genes alvos

A escolha dos genes a serem pesquisados foi realizada após o conhecimento das resistências apresentadas em análise fenotípica e levando-se em consideração os genes de resistência a cefalosporinas e carbapênimos mais frequentemente associados a resultados de resistência.

5.7.3.1 Identificação de genes codificadores de ESBL

Foram investigados os genes *bla*_{SHV} e *bla*_{CTX-M} em todos os microrganismos Gram negativos que apresentaram resistência β-lactâmicos e monobactâmico. A pesquisa foi realizada empregando a técnica PCR, em reações individuais e utilizando os iniciadores apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Iniciadores utilizados na detecção dos genes codificadores de ESBL.

Alvo	Sequência (5'-3')	Produto (pb)	Referência
<i>bla_{SHV}</i>	TTATCTCCCTGTTAGCCACC GATTTGCTGATTTTCGCTCGG	795	Weill <i>et al.</i> (2004)
<i>bla_{CTX-M}</i>	CGATGTGCAGTACCAGTAA TTAGTGACCAGAATCAGCGG	585	Batchelor <i>et al.</i> (2005)

Fonte: A autora

Todas as reações foram estabelecidas em volume final de 50 µL, e os reagentes e as concentrações utilizadas em cada reação seguiram conforme descrito no item “5.7.2 Avaliação da viabilidade do DNA microbiano”.

Tabela 2 - Termociclagens empregadas para a investigação dos genes *bla_{SHV}* e *bla_{CTX-M}*

Alvo	Desnaturação	Hibridização
	°C (tempo)	°C (tempo)
<i>bla_{SHV}</i>	94 (1 min)	50 (30 s)
<i>bla_{CTX-M}</i>	94 (30 s)	60 (30 s)

Fonte: A autora

5.7.3.2 Identificação de genes codificadores de carbapenemases

Foram investigados os genes *bla_{NMP-1}*, *bla_{oxa-48-like}*, *bla_{kpc}*, *bla_{IMP}* e *bla_{VIM}* nos microrganismos Gram-negativos que apresentaram resistência ou resistência intermediária aos carbapenêmicos. A pesquisa foi realizada empregando a técnica PCR, em reações individuais e utilizando os iniciadores apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Iniciadores utilizados na detecção dos genes codificadores de carbapenemases

Alvo	Sequência (5' a 3')	Produto (pb)	Referência
<i>bla</i> _{OXA-48-like}	TGTTTTTGGTGGCATCGAT	177	Monteiro <i>et al.</i> (2012)
	GTAAMRATGCTTGGTTCGC		
<i>bla</i> _{KPC}	TCGCTAAACTCGAACAGG	785	Monteiro <i>et al.</i> (2009)
	TTACTGCCCGTTGACGCCCAATCC		
<i>bla</i> _{NDM}	GGTGCATGCCCGGTGAAATC	661	Yong <i>et al.</i> (2009)
	ATGCTGGCCTTGGGGAACG		
<i>bla</i> _{VIM}	GTTTGGTCGCATATCGCAAC	382	Mendes <i>et al.</i> (2007)
	AATGCGCAGCACCAGGATAG		
<i>bla</i> _{IMP}	GGAATAGAGTGGCTTAAYTCTC	232	Poirel <i>et al.</i> (2011)
	GGTTTAAAYAAAACAACCACC		
	ACATTATCCGCTGGAACAGG		

Fonte: A autora

As reações para os genes *bla*_{NMP-1}, *bla*_{OXA-48-like}, *bla*_{KPC} e *bla*_{VIM} foram estabelecidas em volume final de 50 µL, e os reagentes e as concentrações utilizadas em cada reação seguiram conforme descrito no item 5.7.2.

A reação para o gene *bla*_{IMP} foi estabelecida em volume final de 50 µL, e os reagentes e as concentrações utilizadas em cada reação seguiram conforme descrito no item 5.7.2, exceto o volume de iniciador, o qual foi ajustado para 5 pmols.

As termociclagens foram realizadas por uma etapa inicial de desnaturação a 94 °C por 3 min. As termociclagens específicas para cada gene alvo investigado estão descritas na Tabela 4.

Tabela 4 - Termociclagens empregadas para a investigação dos genes *bla*_{OXA-48-like}, *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM-1}, *bla*_{VIM} e *bla*_{IMP}

Alvo	Desnaturação	Hibridização	Extensão	Ciclos	Extensão Final
	°C (tempo)	°C (tempo)	°C (tempo)		n°
<i>bla</i> _{OXA-48-like}	94 (1 min)	63 (40 s)	72 (30 s)	35	72 (7 min)
<i>bla</i> _{KPC}	94 (1 min)	60 (1 min)	72 (1 min)	40	72 (10 min)
<i>bla</i> _{NDM-1}	94 (1 min)	62 (1 min)	72 (1 min)	35	72 (10 min)
<i>bla</i> _{VIM}	94 (30 s)	68,8 (1 min)	72 (1 min)	40	72 (10 min)
<i>bla</i> _{IMP}	94 (30 s)	45 (1 min)	72 (1 min)	40	72 (10 min)

Fonte: A autora

5.7.4 Verificação dos produtos da PCR via eletroforese

Para a verificação dos resultados das reações de PCR destinadas aos genes de interesse, foi realizada eletroforese submersa em tampão Tris/Borato/EDTA (TBE) em gel de agarose a 1%, contendo 0,5 ug/mL de brometo de etídeo, com padrão de corrida estabelecida em 100V e 400mA por uma hora. Na sequência, a confirmação se deu via exposição à luz ultravioleta em transiluminador (MiniBis-Pro Photodocumentation System – DNR Bio-Image Systems Ltd., Jerusalém, Israel), seguido de registro digitalizado.

Além de serem utilizados controles positivos, descritos na Tabela 5, e brancos, foi realizada a confirmação da obtenção dos produtos (*amplicons*) correspondentes aos segmentos planejados por meio da comparação de tamanhos com um padrão disponível comercialmente (100 pb Ladder, Fermentas, Burlington, Canadá), também exposto a mesma condição de eletroforese. Sendo assim, pela análise dos perfis eletroforéticos obtidos foi determinada a ocorrência dos elementos genéticos investigados.

Tabela 5 - Cepas padrão usadas como controle positivo nos testes genotípicos.

Genótipo	Espécie bacteriana	Nº de origem	Procedência
<i>bla_{SHV}</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCBH6556	FIOCRUZ-RJ
<i>bla_{CTX-M}</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCBH6556	FIOCRUZ-RJ
<i>bla_{OXA-48-like}</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	12692 RM	LACEN-PR
<i>bla_{KPC}</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCBH6556	FIOCRUZ-RJ
<i>bla_{NDM-1}</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	5379 RM	LACEN-PR
<i>bla_{VIM}</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	13493 RM	LACEN-PR
<i>bla_{IMP}</i>	<i>Serratia marcescens</i>	12492 RM	LACEN-PR

FIOCRUZ: Fundação Oswaldo Cruz - Cepas doadas gentilmente por Ana Paula Assef

LACEN: Laboratório Central de Saúde Pública - Cepas doadas gentilmente por Marcelo Pilonetto

5.8 - ANÁLISE DOS RESULTADOS

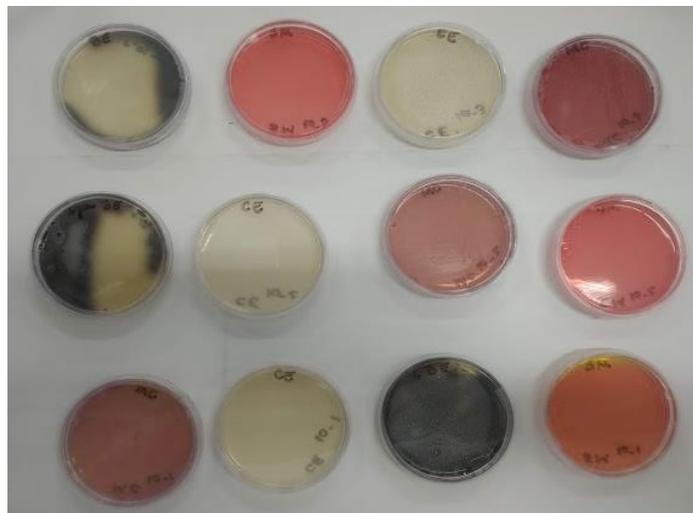
O estudo é apresentado de forma descritiva, ou seja, as bactérias foram isoladas, identificadas e descritas, não havendo comparação entre os dados expostos.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS

O repique das amostras em ágar seletivo permitiu o crescimento de colônias em todos os meios de cultura utilizados. Exemplos desses crescimentos estão demonstrados na Figura 9.

Figura 9: Placas de ágar seletivo após período de incubação das amostras de lodo da Baía Babitonga.



Fonte: A autora.

Todas as colônias crescidas em ágar seletivo foram repicadas em ágar nutriente, a fim de verificar se estas estavam puras.

Após a confirmação de pureza e com as culturas novas, com repique de não mais de 24 h, foi realizada a coloração de Gram das amostras.

Os microrganismos que se apresentaram como bacilos ou coco bacilos Gram-negativos foram identificados através do kit de identificação BBL Crystal® - Gram Negativos. A avaliação dos resultados do kit permitiu evidenciar que foram isolados os seguintes microrganismos: *Acinetobacter lwoffii*, *Vibrio metschnikovii*, *Shewanella putrefaciens*, *Pseudomonas stutzeri*, *Aeromonas hydrophila*, *Serratia* sp., *Providencia rustigianii*, *Enterobacter gergoviae* e *Pseudomonas* sp.

Os microrganismos que se apresentaram como bacilos ou cocos Gram-positivos foram identificados através do kit de identificação BBL Crystal® - Gram

Positivos. A avaliação dos resultados do kit permitiu evidenciar que foram isolados os seguintes microrganismos: *Bacillus cereus*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis* e *Micrococcus luteus*.

6.2 DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS

Acinetobacter lwoffii é um bacilo Gram-negativo, aeróbio, não fermentador, amplamente distribuído na natureza (GONZÁLEZ-CANDELAS *et al.*, 2017). Esse organismo tem sido associado a infecções da corrente sanguínea relacionadas a cateter, em pacientes imunocomprometidos, e à bacteremia associada a gastroenterite e gastrite adquiridas na comunidade (HU *et al.*, 2011).

O antibiograma realizado para *Acinetobacter lwoffii* seguiu o padrão do documento M100 – CLSI, descrito para *Acinetobacter* sp. Os resultados obtidos estão descritos na Tabela 6.

Tabela 6 - Resultados do antibiograma de *Acinetobacter lwoffii*

Antibiótico	Dose / Disco (µg)	Diâmetro do halo (mm) Critério de interpretação			<i>Acinetobacter lwoffii</i>
		S	I	R	
Piperacilina/ Tazobactam	100/10	≥ 21	18-20	≤ 17	33
Meropenem	10	≥ 18	15-17	≤ 14	30
Gentamicina	10	≥ 15	13-14	≤ 12	25
Tetraciclina	30	≥ 15	12-14	≤ 11	31
Ciprofloxacino	5	≥ 21	16-20	≤ 15	30
Levofloxacin	5	≥ 17	14-16	≤ 13	30

S – Sensível I – Intermediário R - Resistente

Os resultados demonstram que a cepa de *A. lwoffii* isolada neste trabalho foi sensível a todos os antimicrobianos testados, corroborando com os resultados obtidos por Figueiredo e colaboradores (2010), no qual todos os isolados de *Acinetobacter lwoffii* foram totalmente suscetíveis a todos os antibióticos testados, incluindo penicilinas, Imipenem e Meropenem. Além disso, os autores reportaram que

os resultados do PCR mostraram que todas as cepas possuíam um gene semelhante ao *bla*_{OXA-134}. Esse gene foi investigado e descobriu-se que *A. Iwoffii* possui intrinsecamente um gene cromossômico que codifica uma β -lactamase classe D de hidrólise de carbapenem, OXA-134. Com o resultado de susceptibilidade a todos os antimicrobianos, é provável que os genes *bla*_{OXA-134}, não foram expressos, ou foram expressos em nível muito baixo, ou ainda esse resultado se deve as OXAS realizarem uma hidrólise lenta dos carbapenêmicos. Dessa forma, de acordo com os autores, essa espécie se torna um reservatório para genes de carbapenemase que podem se espalhar entre outras espécies de *Acinetobacter*.

Por outro lado, o estudo de Hu e colaboradores (2011) realizou o sequenciamento genético de um isolado clínico de *Acinetobacter Iwoffii*. Essa cepa apresentou alta resistência à Ampicilina, Cefazolina, Cefotaxima, Ceftazidima, Cefpiroma, Ceftriaxona, Imipenem e Meropenem. Os resultados desse estudo demonstraram a multirresistência a antimicrobianos desse isolado além da presença de um plasmídeo com o gene de resistência a NDM-1.

Vibrio é um gênero de bactérias que ocorrem amplamente no meio aquático, principalmente nos mares, estuários e águas salobras. Embora a grande maioria das espécies pertencentes ao gênero *Vibrio* sejam consideradas inofensivas quando no ambiente marinho, algumas espécies têm sido descritas como patogênicas para seres humanos, dentre elas estão *V. alginolyticus*, *V. cholerae*, *V. costicola*, *V. mimicus*, *V. cincinnatiensis*, *V. hollisae*, *V. furnissii*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. carchariae* e *V. metschnikovii* são clinicamente importantes, pois causam diferentes tipos de vibriose (BESHIRU *et al.*, 2020; RAMAMURTHY *et al.*, 2014).

O *Vibro metschnikovi* tem sido relatado como um importante causador de infecções, como infecções pós operatórias, sendo um desses casos relatado no estudo de caso de Linde e colaboradores (2004). Além disso, esse organismo também foi relatado no estudo de Jensen; Jellinge (2014), onde foi descrito o relato de caso de choque séptico causado pelo *Vibro metschnikovi*.

O antibiograma realizado para *Vibrio metschnikovi*, seguiu o preconizado no documento M045 – CLSI, descrito para *Vibrio* sp. Foram enfrentadas dificuldades na recuperação do microrganismo no meio de cultura Muller-Hinton. Por se tratar de um microrganismo frequente em águas salobras, o ágar Muller-Hinton foi suplementado com diferentes concentrações de NaCl (1%, 1,5%, 2% e 3,5%), a fim de evidenciar

qual a concentração de NaCl favorecia mais o desenvolvimento deste microrganismo. Foi verificado que a concentração de 3,5% foi a que melhor favoreceu o desenvolvimento microbiano. Os resultados obtidos nesta análise estão na Tabela 7.

Tabela 7 - Resultados do antibiograma de *Vibrio metschnikovi*.

Antibiótico	Dose / Disco (μg)	Diâmetro do halo (mm) Critério de interpretação			<i>Vibrio metschnikovii</i> 3,5% NaCl
		S	I	R	
Ampicilina	10 μg	≥ 17	14-16	≤ 13	24
Ampicilina-sulbactam	10/10 μg	≥ 15	12-14	≤ 11	24
Cefotaxime	30 μg	≥ 26	23-25	≤ 22	20
Ceftazidime	30 μg	≥ 21	18-20	≤ 17	14
Meropenem	10 μg	≥ 23	20-22	≤ 19	20
Ciprofloxacino	5 μg	≥ 21	16-20	≤ 15	22
Levofloxacino	5 μg	≥ 17	14-16	≤ 13	21
Tetraciclina	30 μg	≥ 15	12-14	≤ 11	25

S – Sensível I – Intermediário R - Resistente

Os resultados demonstraram resistência do isolado frente aos antimicrobianos Cefotaxime, Ceftazidime, bem como resultado intermediário para Meropenem.

Os resultados do presente estudo se assemelham com os resultados do estudo de Valáriková *et al.* (2020) no qual foi avaliado o perfil de resistência bacteriana de várias espécies de *Vibrio*, incluindo a espécie *metschnikovi*. Os resultados do autor demonstram que as cepas de *Vibrio sp.* avaliadas apresentaram ampla resistência a antimicrobianos, especialmente β -lactâmicos, entretanto o estudo não avaliou a classe de cefalosporinas de 3ª geração, apenas ampicilina e penicilina, para as quais os isolados foram resistentes.

As bactérias do gênero *Shewanella* são bastante distribuídas no ambiente, podendo ser encontradas no solo e na água salobra. *Shewanella* são bacilos Gram-negativos, móveis, não fermentadores de glicose. Entre as muitas espécies do gênero *Shewanella*, apenas duas espécies, *Shewanella putrefaciens* e *Shewanella algae*, são patógenos oportunistas, causando infecções na pele e mucosas, e mais raramente infecções generalizadas, como bacteremia (PAGNIEZ; BERCHE, 2005).

Inicialmente quando descoberta, a *Shewanella* foi classificada como *Pseudomonas putrefaciens*. Porém, a análise genotípica e fenotípica de muitas

linhagens de *Shewanella* de origens muito variadas, como peixe, carne, óleos e amostras clínicas, confirmaram sua grande heterogeneidade, sugerindo a existência de muitas espécies dentro deste gênero (PAGNIEZ; BERCHE, 2005).

Pseudomonas sp. é uma bactéria Gram-negativa amplamente disseminada e com capacidade de sobreviver em uma ampla gama de ambientes. *Pseudomonas aeruginosa* é reconhecida como um patógeno oportunista, e é a bactéria mais comumente associada a infecções nosocomiais e pneumonia associada à ventilação mecânica. Raramente afeta indivíduos saudáveis, mas causa alta morbidade e mortalidade em pacientes com fibrose cística (FC) e indivíduos imunocomprometidos (PANG *et al.*, 2019).

O tratamento de infecções por *P. aeruginosa* tornou-se um grande desafio devido à capacidade dessa bactéria em resistir a muitos dos antibióticos disponíveis atualmente, como por exemplo, aminoglicosídeos, quinolonas e β -lactâmicos (PANG *et al.*, 2019).

O antibiograma realizado para *Shewanella putrefaciens*, *Pseudomonas* sp. e *Pseudomonas stutzeri* seguiu o padrão do documento M100 – CLSI, descrito para *Pseudomonas* sp. Os resultados obtidos estão expostos na Tabela 8.

Tabela 8 - Resultados do antibiograma de *Shewanella putrefaciens*, *Pseudomonas* sp. e *Pseudomonas stutzeri*.

Antibiótico	Dose / Disco (μ g)	Diâmetro do halo (mm)			<i>Shewanella putrefaciens</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
		Critério de interpretação					
		S	I	R			
Piperacilina/Tazobactam	100/10	≥ 21	15-20	≤ 14	35	20	22
Cefepime	30	≥ 18	15-17	≤ 14	36	22	20
Aztreonam	30	≥ 22	16-21	≤ 15	33	13	18
Meropenem	10	≥ 19	16-18	≤ 15	33	20	24
Amicacina	30	≥ 17	15-16	≤ 14	19	22	22
Ciprofloxacino	5	≥ 21	16-20	≤ 15	31	27	15
Levofloxacina	5	≥ 17	14-16	≤ 13	30	25	23
Gentamicina	10	≥ 15	13-14	≤ 12	20	20	20

S – Sensível I – Intermediário R - Resistente

Os resultados demonstram que a cepa de *Shewanella putrefaciens* foi sensível a todos os antimicrobianos testados.

A patogenicidade da *Shewanella* ainda não é totalmente compreendida. Sabe-se que *Shewanella* é geralmente suscetível a cefalosporinas de terceira e quarta geração, aminoglicosídeos, carbapenêmicos, Eritromicina, fluorquinolonas, Cloranfenicol e, em certa medida, tetraciclinas e Trimetoprim-Sulfametoxazol. É também resistente a cefalosporinas de primeira e segunda geração, Penicilina e Colistina. Além disso, tem sido relatada a resistência emergente ao Imipenem e Piperacilina/ Tazobactam devido à presença da classe D de enzimas beta-lactamases (LATIF *et al.*, 2019).

Devido à raridade de infecções causadas por *Shewanella*, não existem diretrizes definidas de tratamento. No momento, o tratamento continua até as hemoculturas tornarem-se negativas no paciente. O preocupante é que a Piperacilina/Tazobactam é um dos medicamentos mais comumente usados na terapia empírica para sepse, e essa medida de tratamento pode estar contribuindo para o surgimento de resistência a antibióticos (LATIF *et al.*, 2019).

Já os resultados obtidos para *Pseudomonas* sp. evidenciam uma resistência desse microrganismo frente ao antimicrobiano Aztreonam, enquanto *Pseudomonas stutzeri* apresentou resultado de resistência intermediária frente a esse antimicrobiano e resistência ao Ciprofloxacino.

O estudo de (POIREL *et al.*, 2010) caracterizou uma cepa de *Pseudomonas stutzeri* resistente a carbapenêmicos isolada de um paciente. Este isolado produziu uma metalo- β -lactamase, chamada de DIM-1. O estudo conclui que a disseminação do gene *bla*_{DIM-1} entre outros isolados Gram-negativos, principalmente entre as *Enterobacteriaceae*, ainda precisa ser avaliada. De fato, várias evidências indicam que espécies ambientais como *Pseudomonas* sp. podem atuar como reservatórios intermediários para capturar genes de resistência a antibióticos de outras espécies ambientais e, em seguida, trocar esses genes por genes de *Enterobacteriaceae*.

O gênero *Aeromonas* consiste em bactérias Gram-negativas anaeróbias facultativas e que normalmente habitam o ambiente aquático. São microrganismos de circulação ambiental e com capacidade de ocasionar patologias moderadas ou graves tanto no homem quanto nos animais. Atualmente, determinadas espécies

de *Aeromonas* tem sido reconhecidas como patógenos causadores de infecções intestinais ou extra intestinais no homem (PEREIRA *et al.*, 2008).

No Brasil, estudos apontam a ocorrência desses patógenos isolados de ecossistemas aquáticos, de origem alimentar (peixes, ostras, mexilhões e caranguejos) e lesões cutâneas em humanos (EVANGELISTA-BARRETO *et al.*, 2006).

O antibiograma realizado para *Aeromonas hydrophila* seguiu o padrão do documento M045 – CLSI, descrito para *Aeromonas* sp. Os resultados obtidos no antibiograma estão descritos da Tabela 9.

Tabela 9 - Resultados do antibiograma de *Aeromonas hydrophila*.

Antibiótico	Dose / Disco (µg)	Diâmetro do halo (mm) Critério de interpretação			<i>Aeromonas hydrophila</i>
		S	I	R	
Cefepime	30	≥ 25	19-24	≤ 18	35
Cefotaxime	30	≥ 26	23-25	≤ 22	35
Ceftazidime	30	≥ 21	18-20	≤ 17	28
Meropenem	10	≥ 23	20-22	≤ 19	22
Gentamicina	10	≥ 15	13-14	≤ 12	20
Ciprofloxacina	5	≥ 21	16-20	≤ 15	18
o					
Levofloxacina	5	≥ 17	14-16	≤ 13	21
Tetraciclina	30	≥ 15	12-14	≤ 11	26

S – Sensível I – Intermediário R - Resistente

A cepa de *Aeromonas hydrophila* apresentou resultado de resistência intermediária frente aos antimicrobianos Ciprofloxacina e Meropenem e foi sensível aos demais antimicrobianos testados

A maioria das espécies de *Aeromonas* são suscetíveis a tetraciclinas, Sulfametoxazol-Trimetoprima, terceira geração cefalosporinas e as quinolonas (EVANGELISTA-BARRETO *et al.*, 2006).

No estudo de Evangelista-Barreto e colaboradores (2006), 48% dos isolados de *Aeromonas* estudados apresentaram resistência a pelo menos um dos oito

antibióticos testados, sendo que as resistências apresentadas foram frente aos antibióticos: Tetraciclina, Nitrofurantoína, Ceftriaxona, Sulfametoxazol-Trimetropin e Ácido Nalidíxico. Já em um estudo realizado em 2010, Evangelista-Barreto e colaboradores (2010) reportaram que 60% dos isolados apresentaram resistência a pelo menos um dos antimicrobianos, sendo que os antimicrobianos aos quais as resistências foram demonstradas foram: Tetraciclina, Cefalotina, Sulfametoxazol-Trimetropin e Ácido Nalidíxico, demonstrando que a resistência a antibióticos nesse gênero bacteriano é crescente.

Serratia sp., um membro da ordem Enterobacterales, está presente principalmente em habitats ambientais. As bactérias pertencentes a este gênero, são consideradas patógenos nosocomiais oportunistas, causando uma série de infecções, incluindo meningite, sepse, infecções do trato urinário, infecções de pele, corrente sanguínea e infecções respiratórias (WU *et al.*, 2013) além de serem importantes patógenos oculares (SHANKS *et al.*, 2013).

Uma característica importante dos patógenos pertencentes a esse gênero é sua resistência intrínseca e adquirida a uma variedade de famílias de antibióticos, incluindo β -lactâmicos, aminoglicosídeos, quinolonas, macrolídeos e polipeptídicos (SANDNER-MIRANDA *et al.*, 2018).

O gênero *Providencia* consiste de microrganismos Gram-negativos da ordem Enterobacterales. São no total cinco espécies de importância que ocupam a seguinte ordem decrescente de prevalência: *Providencia stuartii*, *P. rettgeri*, *P. alcalifaciens*, *P. rustigianii* e *P. heimbachae* (SANTOS *et al.*, 2015).

Diversas patogenias em diferentes animais estão relacionadas ao gênero *Providencia*. Em humanos, essas bactérias causam infecções do trato urinário, ceratite, dacriocistite, conjuntivite e endoftalmite (KOREISHI; SCHECHTER; KARP, 2006).

O gênero *Enterobacter* inclui bacilos Gram-negativos anaeróbios facultativos que pertencem à ordem Enterobacterales pode ser encontrado em uma variedade de habitats, tanto no solo quanto em água. Além disso, fazem parte da microbiota intestinal normal do homem (DAVIN-REGLI; LAVIGNE; PAGÈS, 2019).

O antibiograma realizado para *Serratia* sp., *Providencia rustigianii* e *Enterobacter gergoviae*, seguiu o padrão do documento M100 – CLSI, descrito para Enterobacteriaceae. Os resultados obtidos estão descritos na Tabela 10.

Tabela 10 - Resultado do antibiograma de *Serratia* sp. *Providencia rustigianii* e *Enterobacter gergoviae*.

Antibiótico	Dose / Disco (µg)	Diâmetro do halo (mm)			<i>Serratia</i> sp.	<i>Providencia rustigianii</i>	<i>Enterobacter gergoviae</i>
		Critério de interpretação					
		S	I	R			
Cefuroxime	30	≥ 23	15-22	≤ 14	6	6	6
Meropenem	10	≥ 23	20-22	≤ 19	26	19	20
Aztreonam	30	≥ 21	18-20	≤ 17	33	23	16
Tetraciclina	30	≥ 15	12-14	≤ 11	12	14	10
Ciprofloxacino	5	≥ 21	16-20	≤ 15	23	18	18
Levofloxacina	5	≥ 17	14-16	≤ 13	25	27	22
Cloranfenicol	30	≥ 18	13-17	≤ 12	22	16	15
Nitrofurantoina	300	≥ 17	15-16	≤ 14	7	6	17

S – Sensível I – Intermediário R - Resistente

Conforme os resultados apresentados na Tabela 8, a cepa de *Serratia* sp. apresentou resistência a Cefuroxime e Nitrofurantoina, além de apresentar resistência intermediária para o antimicrobiano Tetraciclina.

O estudo de Sandner-Miranda e colaboradores (2018) avaliou o perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de 32 *Serratia* spp. Um dos resultados obtidos no estudo demonstrou o seguinte perfil de resistência: 0,13% para macrolídeos (exemplo: Eritromicina); 0,54% para sulfonamidas (exemplo: Sulfadiazina); 3,69% para Cloranfenicol; 3,83% para antimicrobianos fosfônicos (exemplo: Fosfomicina); 3,96% para quinolonas (exemplo: Fluorquinolonas); 4,1% para antibióticos aminocumarínicos (Novobiocina); 7,11% associado à resistência aos aminoglicosídeos (Gentamicina); 20,38% para β-lactâmicos (exemplo: Ampicilina) e 56,22% para polipeptídicos (exemplo: Polimixina B). O resultado de resistência mais pronunciado na classe de antibióticos polipeptídicos é facilmente justificável, visto que esse gênero apresenta resistência intrínseca a Polimixina B. A segunda maior frequência correspondeu a genes de resistência a β-lactâmicos. Esse fato era esperado devido ao elevado número de β-lactamases adquiridas por transferência horizontal de genes em plasmídeos ou transposons encontrados neste gênero (SANDNER-MIRANDA *et al.*, 2018). Esse estudo também demonstrou um total de 123 classes diferentes de genes associados à resistência intrínseca e adquirida a antibióticos entre as 32 espécies de *Serratia*. Do total de 123 genes de resistência, 33

são genes de resistência intrínseca; 16 são genes de resistência adquirida, sendo 13 em plasmídeos, 2 em transposons e o gene *gyrA* com a mutação Ser83 que confere resistência a quinolonas e 74 são genes associados a sistemas de efluxo, dos quais 3 foram localizados em plasmídeos. Os 16 genes de resistência adquirida foram: *vanW*, *aph* (3'), *bla*_{TEM1}, *bla*_{KPC-2}, *bla*_{SHV-30}, *bla*_{IMP-1}, *bla*_{ACT-28}, *bla*_{CMY-8}, *bla*_{OXA-9}, *aac* (6')-Ib, *aad1*, *aad3*, *mphE*, *dfrAS*, *sul1*, *qacE*, *emrE*, *msrE*, *gyrA* (SANDNER-MIRANDA *et al.*, 2018).

Providencia rustigianii apresentou resistência a Cefuroxime, Meropenem e Nitrofurantoína e também resistência intermediária para Tetraciclina, Ciprofloxacino e Cloranfenicol.

Conforme (Santos *et al.*, 2015) as bactérias do gênero *Providencia* apresentam resistência intrínseca aos antimicrobianos Ampicilina, Amoxicilina, Amoxicilina + Ácido Clavulânico, 1ª geração de Cefalosporinas, Netilmicina, Tobramicina, Nitrofurantoína, Cefuroxima, Gentamicina, Polimixina e Colistina. Praticamente todas as espécies de *Providencia* podem produzir beta-lactamases AmpC induzíveis, e muitos isolados também podem produzir beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs) em ambientes nosocomiais (TSHISEVHE *et al.*, 2017). Vários estudos têm demonstrado resultados da presença de resistências a antimicrobianos ou de genes de resistência, em bactérias do gênero *Providencia*, como resistência a carbapenêmicos (TSHISEVHE *et al.*, 2017), multirresistência e identificação de plasmídeo (TSHISEVHE *et al.*, 2017), e a expressão do gene *bla*_{NDM-1} (GEFEN-HALEVI *et al.*, 2013).

Cepas de *Providencia* spp. resistentes a antibióticos podem desempenhar um papel importante na disseminação da resistência por meio da troca com genes de resistência a antibióticos com outras bactérias patogênicas (SANTOS *et al.*, 2015).

Enterobacter gergoviae apresentou resistência a Cefuroxime, Aztreonam, Tetraciclina, além de resultado intermediário para Meropenem, Ciprofloxacino e Cloranfenicol.

Enterobacter aerogenes, *E. cloacae* e *E. hormaechei* representam as espécies mais frequentemente isoladas em infecções clínicas. Essas espécies apresentam resistência intrínseca à Ampicilina, Amoxicilina, cefalosporinas de primeira geração e Cefoxitina devido à expressão de uma β -lactamase AmpC constitutiva. Além disso,

tem sido relatada a produção de β -lactamases de espectro estendido nessas bactérias (DAVIN-REGLI; LAVIGNE; PAGÈS, 2019).

No estudo de Freire *et al.* (2016), foi avaliado um surto causado por *Enterobacter gergoviae*. Por meio do sequenciamento de DNA, esse estudo identificou *bla*_{IMP-1} em todas os *E. gergoviae* isolados.

O gênero *Bacillus* é composto por bactérias Gram-positivas aeróbicas ou facultativas, formadoras de endósporos. Sua capacidade de formar endosporos altamente resistentes é a chave para a colonização bem-sucedida de uma ampla variedade de ambientes (BARUZZI *et al.*, 2011).

Esse gênero é amplamente estudado quanto ao seu potencial biotecnológico, visto que uma série de isolados são capazes de produzir antimicrobianos. Devido a esse potencial, representantes desse gênero são utilizados na produção de alimentos fermentados e na produção de enzimas (BARUZZI *et al.*, 2011). Outra aplicação do gênero *Bacillus* é a produção de probióticos, os quais são uma alternativa à terapia antibiótica na aquicultura (SILVA *et al.*, 2012).

O antibiograma realizado para *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* e *Bacillus pulmillus*, seguiu o padrão do documento M045 – CLSI, descrito para *Bacillus* sp. Os resultados obtidos estão descritos na Tabela 11.

Tabela 11 - Resultado do antibiograma de *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* e *Bacillus pulmillus*.

Antibiótico	CIM ($\mu\text{g/mL}$)			<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus pulmillus</i>
	S	I	R			
Ampicilina	$\leq 0,25$	-	$\geq 0,5$	>8	≤ 2	≤ 2
Meropenem	≤ 4	8	≥ 16	0,094	0,19	0,25
Clindamicina	$\leq 0,5$	1-2	≥ 4	2	2	> 4
Eritromicina	$\leq 0,5$	1-4	≥ 8	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$
Tetraciclina	≤ 4	8	≥ 16	≤ 2	≤ 2	≤ 2
Ciprofloxacino	≤ 1	2	≥ 4	≤ 1	≤ 1	≤ 1
Gentamicina	≤ 4	8	≥ 16	≤ 1	≤ 1	≤ 1

S – Sensível I – Intermediário R - Resistente

Os resultados apresentados demonstram que o isolado *Bacillus cereus* apresentou resistência a Ampicilina, resistência intermediária a Clindamicina e mostrou-se sensível aos demais antimicrobianos testados. O isolado *Bacillus pulmillus* apresentou resistência a Clindamicina, e foi sensível aos demais antimicrobianos testados. Já o isolado *Bacillus subtilis* apresentou resistência intermediária a Clindamicina, e foi sensível aos demais antimicrobianos testados.

O estudo de Noor Uddin *et al.*, (2015) avaliou a presença de resistência antimicrobiana de bactérias isoladas de probióticos usados em culturas de camarão. Esse estudo revelou a presença de resistência entre *Bacillus* spp., em particular para Ampicilina, Cloranfenicol, Clindamicina, Eritromicina e Penicilina.

O *Micrococcus* spp. é comumente conhecido como microflora normal da pele e sua atividade antibacteriana raramente foi relatado contra diferentes patógenos. Esta bactéria pode ser facilmente encontrada na natureza (AKBAR *et al.*, 2014).

Este organismo pode ser explorado por suas habilidades de produzir compostos tecnologicamente importantes e processamento para aplicações industriais. Os dados em relação às atividades antibacteriana, probiótica e produção de metabólitos industrialmente importantes desta bactéria são limitados e precisam de mais explorações (AKBAR *et al.*, 2014).

O antibiograma realizado para *Micrococcus luteus* seguiu o padrão do documento M045 – CLSI, descrito para *Micrococcus* sp. Os resultados obtidos estão descritos na Tabela 12.

Tabela 12 - Resultado do antibiograma de *Micrococcus luteus*.

Antibiótico	CIM (µg/ mL)			<i>Micrococcus luteus</i>
	S	I	R	
Clindamicina	≤ 0,5	1-2	≥ 4	0,5
Eritromicina	≤ 0,5	1-4	≥ 8	≤ 0,5
Penicilina	≤ 0,12	-	≥ 0,25	≤ 0,12

S – Sensível I – Intermediário R - Resistente

Os resultados apresentados demonstram que o isolado *Micrococcus luteus* foi sensível a todos os antimicrobianos testados.

O Quadro 1 apresenta uma compilação dos resultados de resistência e resistência intermediária a antibióticos apresentados por alguns dos isolados neste trabalho.

Quadro 1 – Isolados de amostras de sedimento de manguezal da Baía Babitonga que apresentaram resistência ou resistência intermediária a antibióticos.

Microrganismo	Antimicrobiano	Tipo de resistência
<i>Vibrio metschnikovi</i>	Cefotaxime	Resistente
	Ceftazidime	Resistente
	Meropenem	Intermediária
<i>Pseudomonas spp.</i>	Aztreonam	Resistente
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Aztreonam	Intemediária
	Ciprofloxacino	Resistente
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Meropenem	Intermediária
	Ciprofloxacino	Intermediária
<i>Serratia spp.</i>	Cefuroxime	Resistente
	Nitrofurantoína	Resistente
	Tetraciclina	Intermediária
<i>Providencia rustigianii</i>	Cefuroxime	Resistente
	Meropenem	Resistente
	Nitrofurantoína	Resistente
	Tetraciclina	Intermediária
	Ciprofloxacino	Intermediária
	Cloranfenicol	Intermediária
<i>Enterobacter gergoviae</i>	Cefuroxime	Resistente
	Aztreonam	Resistente
	Tetraciclina	Resistente
	Meropenem	Intermediária
	Ciprofloxacino	Intermediária
	Cloranfenicol	Intermediária
<i>Bacillus cereus</i>	Ampicilina	Resistente

	Clindamicina	Intermediária
<i>Bacillus pulmillus</i>	Clindamicina	Resistente
<i>Bacillus submillis</i>	Clindamicina	Intermediária

Fonte: A autora

Como pode ser observado no Quadro 1, as resistências apresentadas concentraram-se nas classes de antimicrobianos: cefalosporinas de 2ª e 3ª geração, carbapenêmicos, macrolídeos, monobactâmico, tetraciclina, nitrofuranos e fluorquinolonas.

6.3 IDENTIFICAÇÃO DOS GENES ASSOCIADOS À RESISTÊNCIA BACTERIANA

O Quadro 2 apresenta os possíveis genes de resistência associados aos microrganismos resistentes ou com resistência intermediária encontrados neste trabalho, conforme literatura.

Quadro 2 – Possíveis genes de resistência associados aos microrganismos resistentes ou com resistência intermediária isolados de sedimentos de manguezal da Baía Babitonga, conforme literatura.

Microrganismo	Antimicrobianos	Genes de resistência a antimicrobianos associados	Referência
<i>Vibrio metschnikovi</i>	Cefotaxime Ceftazidime Meropenem	<i>bla</i> _{AmpC} , <i>bla</i> _{ACT} , <i>bla</i> _{CMY} , <i>bla</i> _{FOX} , <i>bla</i> _{GCI} , <i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{PER-1} , <i>bla</i> _{VEB-1} , <i>bla</i> _{OXA} , <i>bla</i> _{KPC-2} , <i>bla</i> _{IMI-1} , <i>bla</i> _{SME-1} , <i>bla</i> _{IMP} , <i>bla</i> _{VIM} , <i>bla</i> _{CcrA} , <i>bla</i> _{IND-1} , <i>bla</i> _{L1} , <i>bla</i> _{CAU-1} , <i>bla</i> _{GOB-1} , <i>bla</i> _{FEZ-1} , <i>bla</i> _{CphA} , <i>bla</i> _{Sfh-1}	(BUSH; JACOBY, 2010)
<i>Pseudomonas</i> spp.	Aztreonam	<i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{PER-1} , <i>bla</i> _{VEB-1}	(BUSH; JACOBY, 2010)

<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Aztreonam	<i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{PER-1} , <i>bla</i> _{VEB-1}	(BUSH; JACOBY, 2010)
	Ciprofloxacino	<i>gyr</i> _A , <i>gyr</i> _B , <i>par</i> _C , <i>par</i> _E	(JOHNNING <i>et al.</i> , 2015)
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Meropenem	<i>bla</i> _{OXA} , <i>bla</i> _{KPC-2} , <i>bla</i> _{IMI-1} , <i>bla</i> _{SME-1}	(BUSH; JACOBY, 2010)
	Ciprofloxacino	<i>gyr</i> _A , <i>gyr</i> _B , <i>par</i> _C , <i>par</i> _E	(JOHNNING <i>et al.</i> , 2015)
<i>Serratia spp.</i>	Cefuroxime	<i>bla</i> _{AmpC} , <i>bla</i> _{ACT} , <i>bla</i> _{CMY} , <i>bla</i> _{FOX} , <i>bla</i> _{GCI} , <i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{PER-1} , <i>bla</i> _{VEB-1}	(BUSH; JACOBY, 2010)
	Nitrofurantoína	<i>nsf</i> _A , <i>nfs</i> _B	(VILA; MARTÍ; SÁNCHEZ- CÉSPEDES, 2007)
	Tetraciclina	<i>tet</i> _A , <i>tet</i> _B	(SANDEGREN <i>et al.</i> , 2008)
<i>Providencia rustigianii</i>	Cefuroxime Meropenem	<i>bla</i> _{AmpC} , <i>bla</i> _{ACT} , <i>bla</i> _{CMY} , <i>bla</i> _{FOX} , <i>bla</i> _{GCI} , <i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{PER-1} , <i>bla</i> _{VEB-1} , <i>bla</i> _{OXA} , <i>bla</i> _{KPC-2} , <i>bla</i> _{IMI-1} , <i>bla</i> _{SME-1} , <i>bla</i> _{IMP} , <i>bla</i> _{VIM} , <i>bla</i> _{CcrA} , <i>bla</i> _{IND-1} , <i>bla</i> _{L1} , <i>bla</i> _{CAU-1} , <i>bla</i> _{GOB-1} , <i>bla</i> _{FEZ-1} , <i>bla</i> _{CphA} , <i>bla</i> _{Sfh-1}	(BUSH; JACOBY, 2010)
	Nitrofurantoína	<i>nsf</i> _A , <i>nfs</i> _B	(SANDEGREN <i>et al.</i> , 2008)
	Tetraciclina	<i>tet</i> _A , <i>tet</i> _B	(VILA; MARTÍ; SÁNCHEZ- CÉSPEDES, 2007)
	Ciprofloxacino	<i>gyr</i> _A , <i>gyr</i> _B , <i>par</i> _C , <i>par</i> _E ,	(JOHNNING <i>et al.</i> , 2015)
	Cloranfenicol	<i>cml</i> _A , <i>flo</i> _R	(SCHWARZ <i>et al.</i> , 2004)

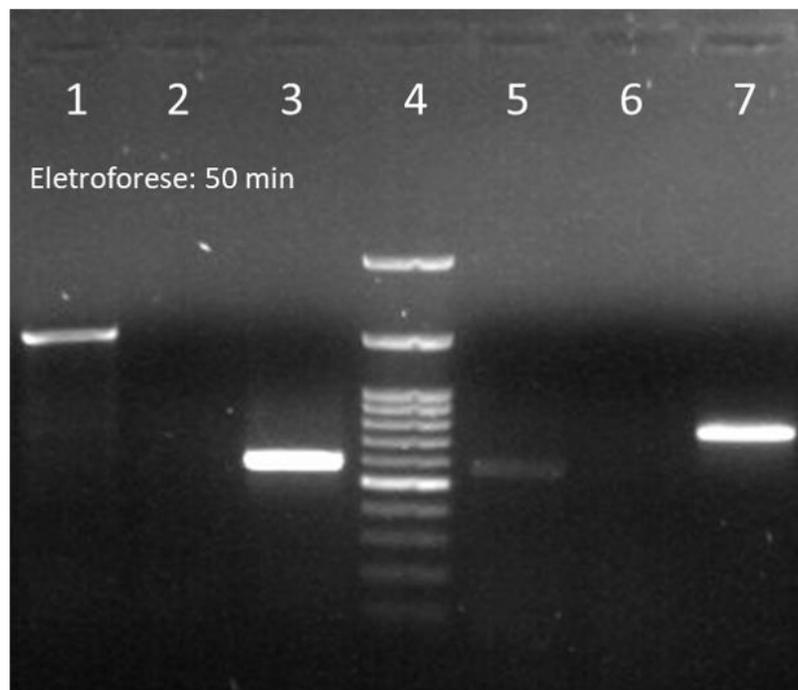
<i>Enterobacter gergoviae</i>	Cefuroxime Aztreonam Meropenem	<i>bla</i> _{AmpC} , <i>bla</i> _{ACT} , <i>bla</i> _{CMY} , <i>bla</i> _{FOX} , <i>bla</i> _{GCI} , <i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{PER-1} , <i>bla</i> _{VEB-1} , <i>bla</i> _{OXA} , <i>bla</i> _{KPC-2} , <i>bla</i> _{IMI-1} , <i>bla</i> _{SME-1} , <i>bla</i> _{IMP} , <i>bla</i> _{VIM} , <i>bla</i> _{CcrA} , <i>bla</i> _{IND-1} , <i>bla</i> _{L1} , <i>bla</i> _{CAU-1} , <i>bla</i> _{GOB-1} , <i>bla</i> _{FEZ-1} , <i>bla</i> _{CphA} , <i>bla</i> _{Sfh-1}	(BUSH; JACOBY, 2010) (VILA; MARTÍ; SÁNCHEZ- CÉSPEDES, 2007) (JOHNNING <i>et al.</i> , 2015) (SCHWARZ <i>et al.</i> , 2004)
	Tetraciclina	<i>tet</i> _A , <i>tet</i> _B	
	Ciprofloxacino	<i>gyr</i> _A , <i>gyr</i> _B , <i>par</i> _C , <i>par</i> _E	
	Cloranfenicol	<i>cml</i> _A , <i>flor</i>	
<i>Bacillus cereus</i>	Ampicilina	<i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{TEM-2} , <i>bla</i> _{SHV-1}	(BUSH; JACOBY, 2010) (GUPTA <i>et al.</i> , 2003)
	Clindamicina	<i>erm</i> _B	
<i>Bacillus pulmillus</i>	Clidamicina	<i>erm</i> _B	(GUPTA <i>et al.</i> , 2003)
<i>Bacillus subtilis</i>	Clidamicina	<i>erm</i> _B	(GUPTA <i>et al.</i> , 2003)

Baseado nas classes de antimicrobianos para os quais alguns microrganismos isolados se mostraram resistentes (Quadro 1) e nos possíveis genes de resistência associados a estes microrganismos (Quadro 2), bem como na disponibilidade dos genes no laboratório de biologia molecular da Univille, foram pesquisados os genes *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{NDM-1} para todos os bacilos Gram-negativos, e os genes *bla*_{oxa-48-like}, *bla*_{kpc}, *bla*_{IMP} e *bla*_{VIM} para os microrganismos que apresentaram resistência ou resultado intermediário à carbapenêmicos.

O microrganismo *Vibrio* spp. resultou negativo na PCR destinada ao gene ribossomal 16S rRNA, ou seja, não amplificou, indicando que o DNA extraído não se mostrava viável, ou com qualidade aceitável, para o prosseguimento das demais análises genotípicas. Sendo assim, não foi possível realizar a investigação dos genes de resistência aos antimicrobianos.

Os microrganismos avaliados não apresentaram positividade para os genes de resistência investigados; entretanto, conforme demonstrado na Figura 10, *Pseudomonas* spp. e *Enterobacter* spp. apresentaram amplicons de tamanho inesperados. *Pseudomonas* spp. resultou na identificação de uma banda de tamanho inespecífico na pesquisa realizada para o gene *bla*_{CTX-M}, enquanto *Enterobacter* spp. demonstrou banda de tamanho inespecífico para o gene *bla*_{SHV}.

Figura 10: Eletroforese realizada para pesquisa do gene *bla*_{CTX-M} no microrganismo *Pseudomonas* spp. (posições 1 a 3) e do gene *bla*_{SHV} no microrganismo *Enterobacter* spp (posições 5 a 7).



1 – Amplicon de tamanho inesperado gerado a partir de cepa de *Pseudomonas* spp. (MT CE-1-25/1); 2 – Controle negativo; 3 – Controle positivo (585 pb) gerado a partir de cepa padrão *Klebsiella pneumoniae*; 4 – Marcador de tamanho molecular (100 pb Ladder, Fermentas, Burlington, Canadá); 5 – Amplicon de tamanho inesperado gerado a partir de cepa de *Enterobacter* spp. (MT BE-2-25/5); 6 – Controle negativo; 7 – Controle positivo (795 pb) gerado a partir de cepa padrão *Klebsiella pneumoniae*.

Os resultados mostrados na Figura 10 evidenciam que os isolados *Pseudomonas* spp. e *Enterobacter* spp. não contêm os genes de interesse pesquisados. Entretanto, a presença de bandas inespecíficas para ambos os microrganismos é um resultado que merece mais investigação por meio de sequenciamento genético, a fim de descobrir se o resultado apresentado se trata de

uma variante do gene pesquisado, tendo em vista que os primers utilizados realizaram hibridização no DNA bacteriano, o que indica que a sequência nucleotídica é provavelmente similar.

Não foi possível realizar a pesquisa de genes de resistência nos microrganismos Gram-positivos isolados devido a limitações de tempo e insumos necessários.

O estudo de Devarajan *et al.* (2017), realizado na Suíça, República Democrática do Congo e Índia, avaliou amostras de sedimento aquático de regiões que recebem efluentes hospitalares e regiões que recebem efluentes parcialmente tratados de estações de tratamento de águas, em regiões de clima temperado e de clima tropical. O estudo pesquisou a presença dos genes *bla_{SHV}*, *bla_{CTX-M}*, *bla_{NDM}*, *bla_{VIM-1}* e *bla_{VIM-2}*. O gene *bla_{SHV}* foi identificado em 3, 8 e 13% e o gene *bla_{CTX-M}* foi identificado em 47, 35 e 12% dos isolados das três diferentes regiões avaliadas da Suíça, República Democrática do Congo e Índia, respectivamente.

Na pesquisa realizada por Griffin *et al.* (2019) em amostras de solo e sedimento aquático na região costeira do Estados Unidos, foi constatada a presença de uma ampla variedade de genes de resistência a antimicrobianos. Os genes encontrados foram: *tet_B*, *tet_C*, *tet_L*, *tet_M*, *tet_O*, *tet_W*, *amp_C*, *van_A*, *erm_B*, *mec_A*, *bla_{SHV}*, *bla_{PSE}*, *flor*, *aad_{A2}*. Todas as áreas avaliadas no estudo apresentaram a presença de pelo menos um gene de resistência.

Em um estudo desenvolvido na China, em uma região de estuário, com amostras coletadas de águas superficiais, águas profundas e sedimento, foi evidenciada a presença de alguns genes de resistência a antimicrobianos, sendo eles: *tet_B*, *tet_C*, *tet_M*, *tet_O*, *tet_W* (CHEN *et al.*, 2013). Embora os genes encontrados sejam de uma classe diferentes aos genes pesquisados no presente estudo, vale destacar que a presença de genes de resistência no ambiente é ampla e diversa.

No Brasil, estudos nessa área são recentes e estão crescendo nos últimos anos.

O estudo de Conte *et al.* (2020) avaliou a presença de genes de resistência a antimicrobianos na bactéria *Aeromonas* spp., presente em águas residuais e efluentes hospitalares e domésticos, na região de Curitiba, Paraná. O estudo encontrou a presença dos genes *bla_{CTX-M}*, *bla_{TEM}* e *bla_{GES}*.

No Rio de Janeiro foi desenvolvido um estudo em que se avaliou a presença de genes de carbapenemases em águas de rio e lagoa. O estudo evidenciou a disseminação de diferentes genes (*bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{OXA-370}* e *bla_{GES-16}*) em dois importantes ambientes aquáticos (ARAUJO *et al.*, 2016).

Como demonstrado, estudos acerca da presença de genes de resistência a antimicrobianos no ambiente têm evidenciado que a disseminação desses genes é crescente e o meio ambiente tem se tornado, de fato, um grande reservatório de genes de resistência, o que torna os seres humanos expostos a eles em ambientes diferentes de hospitais.

7- CONCLUSÃO

Foi possível o isolamento e identificação de uma gama variável de microrganismos Gram-negativos e também o isolamento de alguns microrganismos Gram-positivos.

Nosso estudo demonstrou a presença de resistência a antimicrobianos em cepas bacterianas isoladas de sedimento de manguezal, evidenciada através de análise fenotípica. Entretanto, a análise com vistas à identificação de alguns genes associados às resistências encontradas não foi capaz de determinar o gene responsável.

Os resultados encontrados indicam que as áreas estudadas apresentam microbioma apresentando resistências a antimicrobianos que merecem estudos mais aprofundados.

A disseminação de resistências a antimicrobianos no meio ambiente é um problema de saúde pública real, que precisa ser avaliado e trabalhado por meio de políticas públicas que foquem especialmente em tratamento de águas residuais, de efluentes e no uso racional e descarte correto de medicamentos.

REFERÊNCIAS

- AKBAR, A. *et al.* Isolation and Characterization of Biotechnologically Potent *Micrococcus luteus* Strain From Environment. **Pakistan Journal of Zoology**, v. 46, n. 4, p. 967-973, mai. 2014.
- AMINOV, R. I. The role of antibiotics and antibiotic resistance in nature. **Environmental Microbiology**, v. 11, n. 12, p. 2970–2988, 1 dez. 2009.
- ANVISA; AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Módulo 5: Tecnologias em Serviços de Saúde: Descrição dos Meios de Cultura Empregados nos Exames Microbiológicos. In: **Microbiologia clínica para o controle de infecção relacionada à assistência à saúde**. Brasília: Anvisa, 2013. Disponível em: <http://ccihadm.med.br/legislacao/Microbiologia_clinica_ANVISA_Meios_de_cultura.pdf>. Acesso em: 28 ago. 2019.
- ANVISA; AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Farmacopeia Brasileira**. v. 1. 6ª ed. Brasília: 2019. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 8 nov. 2020.
- ANVISA. Módulo 3: Resistência Microbiana - Mecanismos e Impacto Clínico. In: **Antimicrobianos - Base Teóricas e Uso Clínico**, p. 1–4, 2007.
- ARAUJO, C. F. M. *et al.* Detection of Carbapenemase Genes in Aquatic Environments in Rio de Janeiro, Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 7, p. 4380-4383, 2016.
- BARATTO, C. M.; MEGIOLARO, F. Comparação de diferentes protocolos de extração de dna de bactérias para utilização em RAPD-PCR. **Unoesc e Ciência**, v. 3, n. 1, p. 121–130, 2012.
- BARUZZI, F. *et al.* Antimicrobial compounds produced by *Bacillus* spp. and applications in food. **Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances**, p. 1102-1111, 2011.
- BATCHELOR, M.; HOPKINS, K.; THREFALL, E.J. *et al.* blaCTX-M Genes in Clinical Salmonella Isolates Recovered from Humans in England and Wales from 1992 to 2003. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 4, p. 1319–1322, 2005.
- BAUER, A. W., *et al.* Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, n. 4, april, p. 493–496, 1966.
- BESHIRU, A. *et al.* Detection of antibiotic resistance and virulence genes of *Vibrio* strains isolated from ready-to-eat shrimps in Delta and Edo States, Nigeria. **Journal of Applied Microbiology**, p. 17-36, 3 fev. 2020.
- BHATTACHARYYA, A. *et al.* Anthropogenic influence shapes the distribution of antibiotic resistant bacteria (ARB) in the sediment of Sundarban estuary in India. **Science of The Total Environment**, v. 647, p. 1626–1639, 10 jan. 2019.

BLAIR, J. M. A. *et al.* Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 42–51, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>.

BORTOLOTTI, K. DA C. S. *et al.* Microbiological quality of natural waters on the resistance profile of heterotrophic bacteria to antimicrobials. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 23, n. 4, p. 717–725, 1 jul. 2018.

BRADFORD, P. A. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 4, p. 933-51, 2001.

BUSH, K.; JACOBY, G. A. Updated Functional Classification of β -Lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 3, p. 969-976, 2010.

BURMEISTER, A. R. **Evolution, Medicine, and Public Health**, v. 1, p. 193-194, 2015.

CALERO-CÁCERES, W. *et al.* The occurrence of antibiotic resistance genes in a Mediterranean river and their persistence in the riverbed sediment. **Environmental pollution**, v. 223, p. 384–394, abr. 2017.

CHEN, B. *et al.* Differentiating anthropogenic impacts on ARGs in the Pearl River Estuary by using suitable gene indicators. **Water Research**, v. 47, n. 8, p. 2811–20, 15 maio 2013.

CHEN, H. *et al.* Antibiotics in typical marine aquaculture farms surrounding Hailing Island, South China: Occurrence, bioaccumulation and human dietary exposure. **Marine Pollution Bulletin**, v. 90, n. 1–2, p. 181–187, 15 jan. 2015.

CLSI. **M045 Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria**. Wayne: PA, 2015. Disponível em: <www.clsi.org>. Acesso em: 17 out. 2020.

CLSI. **M02 Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests**. Wayne: PA, 2018a. Disponível em: <www.clsi.org>. Acesso em: 25 abr. 2021.

CLSI. **M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing A CLSI supplement for global application**. Wayne: PA, 2018b. Disponível em: <www.clsi.org>. Acesso em: 17 out. 2020.

COSTA, M. D. P.; SOUZA-CONCEIÇÃO, M.J. Composição e abundância de ovos e larvas de peixes na baía da Babitonga, Santa Catarina, Brasil. **Pan-American Journal of Aquatic Sciences**, v. 4, n. 3, p. 372-383, dez. 2009.

CONTE D. *et al.* Antimicrobial resistance in *Aeromonas* species isolated from aquatic environments in Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, dez. 2020.

CREMER, M. J. O estuário da baía da Babitonga. In: CREMER, M. J.; MORALES, P. R. D., OLIVEIRA, T. M. N. **Diagnóstico Ambiental da Baía da Babitonga**. Joinville: Editora Univille, 2006. p. 15-19.

CRYSTAL, B. **Reagentes e Princípios dos Testes Utilizados no Sistema BBL Crystal E/NF ID**. Shannon: 2004, p. 11.

CRYSTAL, B. **BBL Crystal identification systems: Rapid gram-positive ID Kit**. Dublin: 2015, p. 13.

DAVIES, J.; DAVIES, D. Origins and evolution of antibiotic resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR**, v. 74, n. 3, p. 417–33, set. 2010.

DAVIN-REGLI, A.; LAVIGNE, J. P.; PAGÈS, J. M. Enterobacter spp.: update on taxonomy, clinical aspects, and emerging antimicrobial resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 32, n. 4, 1 out. 2019.

DEVARAJAN, N. *et al.* Antibiotic resistant Pseudomonas spp. in the aquatic environment: A prevalence study under tropical and temperate climate conditions. **Water Research**, v. 115, p. 256-265, 2017.

DOI, Y.; IOVLEVA, A.; BONOMO, R.A. The ecology of extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) in the developed world. **Journal of Travel Medicine**, v. 24, n. 1 (suple-1), abr. 2017.

EVANGELISTA-BARRETO, N. S. *et al.* Aeromonas spp. isolated from oysters (Crassostrea rhizophorea) from a natural oyster bed, Ceará, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 48, n. 3, p. 129–133, 2006.

EVANGELISTA-BARRETO, N. S. *et al.* Characterization of Aeromonas species isolated from an estuarine environment. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 2, p. 452–460, jun. 2010.

FERREIRA, T. O. Effects of bioturbation by root and crab activity on iron and sulfur biogeochemistry in mangrove substrate. **Geoderma**, v. 142, n. 1–2, p. 36–46, 15 nov. 2007.

FERREIRA, T. O. *et al.* Spatial patterns of soil attributes and components in a mangrove system in Southeast Brazil (São Paulo). **Journal of Soils and Sediments**, v. 10, n. 6, p. 995–1006, 14 set. 2010.

FIGUEIREDO, S. *et al.* OXA-134, a Naturally Occurring Carbapenem-Hydrolyzing Class D-Lactamase from Acinetobacter lwoffii. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 12, p. 5372–5375, 2010.

FREIRE, M. P. *et al.* Outbreak of IMP-producing carbapenem-resistant Enterobacter gergoviae among kidney transplant recipients. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, p. 2577-2585, 19 mai. 2016.

FRIESS, D. A. Mangrove forests. **Current Biology**, v. 26, n. 16, p. 746–748, 22 ago. 2016.

FUENTEFRIA, D. B. *et al.* Pseudomonas aeruginosa: disseminação de resistência antimicrobiana em efluente hospitalar e água superficial. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, p. 470–473, 2008.

GAO, H. *et al.* Complex migration of antibiotic resistance in natural aquatic environments. **Environmental Pollution**, v. 232, n 1, p. 1-9, jan. 2018.

GEFEN-HALEVI, S. *et al.* Isolation of Genetically Unrelated bla NDM-1-Positive Providencia rettgeri Strains in Israel. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 5, p. 1642-1643, 2013.

GHOSH, A. *et al.* Culture independent molecular analysis of bacterial communities in the mangrove sediment of Sundarban, India. **Saline Systems**, v. 6, n. 1, p. 1, 17 fev. 2010.

GOMES, A. C. *et al.* Caracterização das infecções relacionadas à assistência à saúde em unidade de terapia intensiva. **Revista de Enfermagem UFPE**, v. 8, n. 6, p. 1577–85, 2014.

GONZÁLEZ-CANDELAS, F. *et al.* The Evolution of Antibiotic Resistance. In: TIBAYRENC, M. **Genetics and Evolution of Infectious Diseases**. [s.l.] Elsevier Inc., 2017. p. 257–284.

GRIFFIN, D. W. *et al.* The presence of antibiotic resistance genes in coastal soil and sediment samples from the eastern seaboard of the USA. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 191, n. 2, p. 300, 28 jun. 2019.

GROSE, A. V; HILLEBRANT, C. C.; CREMER, M. J. Diversidade e abundância sazonal da avifauna em duas planícies de maré no estuário da baía da Babitonga, norte de Santa Catarina. **Iheringia, Série Zoologia**, Porto Alegre, v. 103, n. 1, p. 5–11, 2013.

GUPTA, A. *et al.* A New Bacteroides Conjugative Transposon That Carries an *ermB* Gene. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 11, p. 6455-6463, 2003.

HAMSCHER, G. *et al.* Different behavior of tetracyclines and sulfonamides in sandy soils after repeated fertilization with liquid manure. **Environmental toxicology and chemistry**, v. 24, n. 4, p. 861–8, abr. 2005.

HAYASHI, H. *et al.* Molecular analysis of jejunal, ileal, caecal and recto-sigmoidal human colonic microbiota using 16S rRNA gene libraries and terminal restriction fragment length polymorphism. **Journal of Medicine Microbiology**, v. 54, p. 1093-1101, 2005.

HU, Y. *et al.* Whole-genome sequence of a multidrug-resistant clinical isolate of *Acinetobacter lwoffii*. **Journal of Bacteriology**, v. 193, n. 19, p. 5549-5550, out. 2011.

IBHARIM, N. A. *et al.* Mapping mangrove changes in the Matang Mangrove Forest using multi temporal satellite imageries. **Ocean & Coastal Management**, v. 114, p. 64–76, 1 set. 2015.

JENSEN, J.; JELLINGE, M. E. Severe septic shock and cardiac arrest in a patient with *Vibrio metschnikovii*: A case report. **Journal of Medical Case Reports**, v. 8, n. 1, p. 348, 20 dez. 2014.

JOHNNING, A. *et al.* Mutações de resistência em *gyrA* e *parC* são comuns em comunidades de *Escherichia* de ambientes aquáticos contaminados e não contaminados por fluoroquinolona. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. 1355, 2015.

KARAM, G. *et al.* Antibiotic strategies in the era of multidrug resistance. **Critical care**, v. 20, n. 1, p. 136, 2016.

KATHIRESAN, K.; BINGHAM, B. L. Biology of mangroves and mangrove Ecosystems. **Advances in Marine Biology**, v. 40, p. 81–251, 1 jan. 2001.

KINNEY, C. A. *et al.* Survey of Organic Wastewater Contaminants in Biosolids Destined for Land Application. **Environmental Science & Technology**, v. 40, n. 23, p. 7207–7215, dez. 2006.

KNAPP, C. W. *et al.* Indirect evidence of transposon-mediated selection of antibiotic resistance genes in aquatic systems at low-level oxytetracycline exposures. **Environmental Science and Technology**, v. 42, n. 14, p. 5348–5353, 15 jul. 2008.

KOREISHI, A. F.; SCHECHTER, B. A.; KARP, C. L. Ocular Infections Caused by *Providencia rettgeri*. **Ophthalmology**, v. 113, n. 8, p. 1463–1466, 1 ago. 2006.

KRUG, L. A.; LEÃO, C.; AMARAL, S. **Dinâmica espaço-temporal de manguezais no Complexo Estuarino de Paranaguá e relação entre decréscimo de áreas de manguezal e dados sócio-econômicos da região urbana do município de Paranaguá - Paraná.** In: XIII Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto, 2007 **Anais...** Florianópolis: INPE, abr. 2007. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/235920249_Dinamica_espaco-temporal_de_manguezais_no_Complexo_Estuarino_de_Paranagua_e_relacao_entr_e_decrescimo_de_areas_de_manguezal_e_dados_socio-economicos_da_regiao_urbana_do_municipio_de_Paranagua_-_Parana>. Acesso em: 23 out. 2020

LATIF, A. *et al.* A rare case of *Shewanella* septicemia: Risk factors, environmental associations and management. **BMJ Case Reports**, v. 12, n. 9, p. e230252, 1 set. 2019.

- LEE, S. Y. *et al.* Ecological role and services of tropical mangrove ecosystems: a reassessment. **Global Ecology and Biogeography**, v. 23, n. 7, p. 726–743, 1 jul. 2014.
- LINDE, H. J. *et al.* *Vibrio metschnikovii*, a rare cause of wound infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 10, p. 4909–4911, 1 out. 2004.
- LIVERMORE, D. M. Defining an extended-spectrum β -lactamase. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14 Suppl 1, n., p. 3-10, 2008.
- LIVERMORE, D. M. β -lactamases in laboratory and clinical resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 8, n. 4, p. 557-84, 1995.
- MARQUIOTI, C. M. J.; LANES, L. C.; CASTRO, G. F. P. Uso irracional de antibióticos na infância: contribuição do profissional farmacêutico para a promoção da saúde. **Revista Transformar**, v. 0, n. 7, p. 179–193, 30 nov. 2015.
- MARTI, E.; VARIATZA, E.; BALCAZAR, J. L. The role of aquatic ecosystems as reservoirs of antibiotic resistance. **Trends in Microbiology**, v. 22, n. 1, p. 36-41, jan. 2014.
- MARTÍNEZ, J. L.; BAQUERO, F. Emergence and spread of antibiotic resistance: Setting a parameter space. **Upsala Journal of Medical Sciences**, v.119, n. 2, p. 68-77, mar. 2014.
- MENDES, R. E. *et al.* Rapid detection and identification of metallo- β -lactamase encoding genes by multiplex real-time pcr assay and melt curve analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 2, p. 544-547, 2007.
- MERCK, 2018. **76448 Marine Broth 2216**. Disponível em: <<https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma-Aldrich/Datasheet/2/76448dat.pdf>>. Acesso em: 10 abr. 2021.
- MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Áreas prioritárias para conservação, uso sustentável e repartição de benefícios da biodiversidade brasileira**. 1. ed. Brasília: 2007.
- MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Atlas dos manguezais do Brasil**. 1. ed. Brasília: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, 2018. p. 176.
- MONTEIRO, J. *et al.* Rapid detection of carbapenemase genes by multiplex real-time PCR. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, p. 906-909, 2012.
- MONTEIRO, J.; SANTOS, A.F.; ASENSI, M.D.; PEIRANO, G.; GALES, A.C. First report of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 1, p. 333–334, 2009.
- NEOGEN. 2020. **Mannitol Salt Agar**. Disponível em: <<https://www.neogen.com/solutions/microbiology/mannitol-salt-agar/>>. Acesso em: 08 mai. 2020.

NOOR UDIN, G. *et al.* Identification and Antimicrobial Resistance of Bacteria Isolated from Probiotic Products Used in Shrimp Culture. **Journal Plos One**, v. 10, n. 7, p. e0132338, 18 fev. 2015.

OBERLÉ, K. *et al.* Evidence for a complex relationship between antibiotics and antibiotic-resistant *Escherichia coli*: from medical center patients to a receiving environment. **Environmental Science & Technology**, v. 46, n. 3, p. 1859–68, 7 fev. 2012.

One Health Commission, 2018. **What is One Health?** Disponível em: <https://www.onehealthcommission.org/en/why_one_health/what_is_one_health/>. Acesso em: 23 de janeiro de 2021.

OURIQUES, M. M. **Caracterização de biofilmes produzidos por micro-organismos isolados de sedimentos de manguezal da baía Babitonga.** Dissertação (Mestrado em Saúde e Meio Ambiente) - Programa de Pós Graduação em Saúde e Meio Ambiente, Universidade da Região de Joinville. Joinville, p. 39 – 40.

PAGANI, E. F.; PFUTZENREÜTER, A. H. Regularização fundiária: estudo de caso na “Praia do Lixo” localizada no município de São Francisco do Sul/SC. **Periódico Técnico e Científico Cidades Verdes**, [s.l.], v. 8, n. 17, 28 mar. 2020.

PAGNIEZ, H.; BERCHE, P. Opportunistic infections caused by *Shewanella*, new emergent bacteria. **Medecine et Maladies Infectieuses**, v. 35, n. 4, p. 186-191, 1 abr. 2005.

PANG, Z. *et al.* Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 177-192, 1 jan. 2019.

PEI, R. *et al.* Effect of River Landscape on the sediment concentrations of antibiotics and corresponding antibiotic resistance genes (ARG). **Water Research**, v. 40, n. 12, p. 2427–2435, 1 jul. 2006.

PEREIRA, C. S. *et al.* Caracterização de *Aeromonas* spp isoladas de neonatos hospitalizados. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 2, p. 179–182, mar. 2008.

POIREL, L. *et al.* Characterization of DIM-1, an Integron-Encoded Metallo-Lactamase from a *Pseudomonas stutzeri* Clinical Isolate in the Netherlands. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 6, p. 2420–2424, 2010.

POIREL, L. *et al.* Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 70, n. 1, p. 119–123, 2011.

RAMAMURTHY, T. *et al.* *Vibrio fluvialis*: An emerging human pathogen. **Frontiers in Microbiology**, v.5, n. 91, mar. 2014.

ROBINSON, T.P. *et al.* Antibiotic Resistance is the Quintessential One Health. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 10, p. 377–380, 2016.

ROMAÑACH, S. S. *et al.* Conservation and restoration of mangroves: Global status, perspectives, and prognosis. **Ocean & Coastal Management**, v. 154, p. 72–82, 15 mar. 2018.

SANDEGREN, L. *et al.* Nitrofurantoin resistance mechanism and fitness cost in *Escherichia coli*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 62, n. 3, p. 495-503, 2008.

SANDNER-MIRANDA, L. *et al.* The genomic basis of intrinsic and acquired antibiotic resistance in the genus *Serratia*. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. MAY, p. 828, 11 maio 2018.

SANTOS, G. *et al.* Study of the Enterobacteriaceae Group CESP (*Citrobacter*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Providencia*, *Morganella* and *Hafnia*): A Review. In: MENDÉZ-DIÁZ, A. **The battle against microbial pathogens: basic science, technological advances and educational programs**. [s.l]: Formatex, 2015. Disponível em: <<https://www.researchgate.net/publication/297730985>>. Acesso em: 4 out. 2020.

SANTOS, S. L. F. *et al.* Desenvolvimento de uma cartilha educativa sobre coloração de gram em microbiologia no ensino superior. **Revista Expressão Católica Saúde**, v. 1, n. 1, p. 67-74, jun. 2016.

SCHWARZ, S. *et al.* Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 28, n. 5, p. 519-542, 2004.

SILVA, E. F. B. *et al.* Uso de probióticos na produção de pós-larvas de camarão-rosa. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, n. 6, p. 869-874, 2012.

SHANKS, R. M. Q. *et al.* An Eye to a Kill: Using Predatory Bacteria to Control Gram-Negative Pathogens Associated with Ocular Infections. **Plos One**, v. 8, n. 6, p. 66723, 2013.

SZEKERES, E. *et al.* Abundance of antibiotics, antibiotic resistance genes and bacterial community composition in wastewater effluents from different Romanian hospitals. **Environmental Pollution**, v. 225, p. 304–315, 2017.

TSHISEVHE, V. S. *et al.* Outbreak of carbapenem-resistant *Providencia rettgeri* in a tertiary hospital. **South African Medical Journal**, v. 107, n. 1, p. 31–33, 1 jan. 2017.

VALÁRIKOVÁ, J. *et al.* Potential pathogenicity and antibiotic resistance of aquatic *Vibrio* isolates from freshwater in Slovakia. **Folia Microbiologica**, v. 65, n. 6, p. 545-555, nov. 2020.

VANEECHOUTTE, M. *et al.* Identification of *Acinetobacter* genomic species by amplified ribosomal DNA restriction analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 1, p. 11–15, jan. 1995.

VIEIRA, C. V. *et al.* Caracterização morfosedimentar e setorização do complexo estuarino da Baía da Babitonga. **Boletim Paranaense de Geociências**, v. 62–63, p. 85–105, 2008.

VILA, J.; MARTÍ, S.; SÁNCHEZ-CÉSPEDES, J. Porinas, bombas de efluxo e multirresistência em *Acinetobacter baumannii*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.59 n. 6, p. 1210-1215, 2007.

WATTS, J. E. M. *et al.* The rising tide of antimicrobial resistance in aquaculture: Sources, sinks and solutions. **Marine Drugs**, v.15, n.16, 1 jun. 2017.

WEILL, F.X.; DEMARTIN, M.; TANDE, D. *et al.* SHV-12-Like Extended-Spectrum--Lactamase-Producing Strains of *Salmonella enterica* Serotypes Babelsberg and Enteritidis Isolated in France among Infants Adopted from Mali. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 6, p. 2432–2437, 2004.

WELLINGTON, E. M. *et al.* The role of the natural environment in the emergence of antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 13, n. 2, p. 155–165, fev. 2013.

World Health Organization, 2017. **One Health**. Disponível em: <<https://www.who.int/features/qa/one-health/en/>>. Acesso em: 23 de janeiro de 2021.

WRIGHT, G. D.; POINAR, H. Antibiotic resistance is ancient: implications for drug discovery. **Trends in Microbiology**, v. 20, n. 4, p. 157–159, abr. 2012.

WU, Y. M. *et al.* *Serratia marcescens* meningitis: Epidemiology, prognostic factors and treatment outcomes. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 46, n. 4, p. 259–265, ago. 2013.

YONG, D.; TOLEMAN, MA.; GISKE, C.G; CHO, H.S.; SUNDMAN, K.; LEE, K. *et al.* Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.53, n. 12, p. 544-547, 2009.

AUTORIZAÇÃO

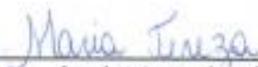
Nome do autor: Maria Tereza Dalla Vecchia

RG: 5.626.763

Título da Dissertação: DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE
A ANTIMICROBIANOS DE BACTÉRIAS ISOLADAS DA BAÍA BABITONGA

Autorizo a Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE, através da
Biblioteca Universitária, disponibilizar cópias da dissertação de minha autoria.

Joinville, 29 de junho de 2021.



Assinatura do aluno