

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Microbiologia Paulo de Goés

SAMANTHA DOS SANTOS TUFIC

COLONIZAÇÃO INTESTINAL POR *Escherichia coli* MULTIRRESISTENTE EM
VIAJANTES ATENDIDOS EM UMA CLÍNICA DE MEDICINA DE VIAGENS DO RIO
DE JANEIRO

RIO DE JANEIRO

2019



Samantha dos Santos Tufic

COLONIZAÇÃO INTESTINAL POR *Escherichia coli* MULTIRRESISTENTE EM
VIAJANTES ATENDIDOS EM UMA CLÍNICA DE MEDICINA DE VIAGENS DO RIO
DE JANEIRO

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
(Microbiologia), Instituto de Microbiologia
Paulo de Góes da Universidade Federal do
Rio de Janeiro, como parte dos requisitos
necessários à obtenção do título de Mestre em
Ciências Biológicas (Microbiologia)

Orientadoras: Beatriz Meurer Moreira
Káris Maria de Pinho Rodrigues

RIO DE JANEIRO
2019

CIP - Catalogação na Publicação

T914c Tufic, Samantha dos Santos
Colonização intestinal por *Escherichia coli*
multirresistente em viajantes atendidos em uma
clínica de medicina de viagens do Rio de Janeiro /
Samantha dos Santos Tufic. -- Rio de Janeiro, 2019.
117 f.

Orientadora: Beatriz Meurer Moreira.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do
Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia Paulo de
Góes, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia,
2019.

1. Colonização por multirresistente. 2. viagem.
3. *Escherichia coli*. 4. ESBL e carbapenemases. 5.
destino de viajantes. I. Moreira, Beatriz Meurer ,
orient. II. Título.



UFRJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro

Instituto de Microbiologia Paulo de Góes

Coordenação de Ensino de Pós-Graduação

**ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DO PROGRAMA EM CIÊNCIAS
(MICROBIOLOGIA) PARA A CONCESSÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS (MICROBIOLOGIA)**
REALIZADA EM: 22 de maio de 2019

CANDIDATA: SAMANTHA DOS SANTOS TUFIC

BANCA EXAMINADORA: Prof.^a Dr.^a Marinella Silva Laport (Presidente da Banca)
Prof.^a Dr.^a Vânia Lúcia Carreira Merquior (Membro da Banca)
Prof.^a Dr.^a Simone Aranha Nouer (Membro da Banca)
Prof.^a Dr.^a Tatiana de Castro Abreu Pinto (Membro da Banca / Revisora)

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: “Colonização intestinal por *Escherichia coli* multirresistente em viajantes atendidos em uma clínica de medicina de viagens do Rio de Janeiro”.

LOCAL: Anfiteatro do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da UFRJ
HORA DE INÍCIO: 13:00 horas

Em sessão pública, após a exposição de cerca de 60 minutos, o (a) candidato (a) foi arguido (a) oralmente pelos membros da Banca, tendo demonstrado suficiência de conhecimento e capacidade de sistematização no tema de sua Dissertação “Colonização intestinal por *Escherichia coli* multirresistente em viajantes atendidos em uma clínica de medicina de viagens do Rio de Janeiro”, sendo **Aprovado** (a) por unanimidade pelos membros da Banca que conferiram os seguintes graus:

Prof. ^a Dr. ^a Marinella Silva Laport (Presidente da Banca)	Grau <u>10,0</u>	Conceito... <u>A</u>
Prof. ^a Dr. ^a Vânia Lúcia Carreira Merquior (Membro da Banca)	Grau <u>10,0</u>	Conceito... <u>A</u>
Prof. ^a Dr. ^a Simone Aranha Nouer (Membro da Banca)	Grau <u>10,0</u>	Conceito... <u>A</u>
Prof. ^a Dr. ^a Tatiana de Castro Abreu Pinto (Membro da Banca / Revisora)	Grau <u>10,0</u>	Conceito... <u>A</u>
	Grau <u>10,0</u>	Conceito... <u>A</u>

Na forma regulamentar, foi lavrada a presente Ata que é assinada pelos membros da Banca, e pelo (a) candidato (a).

Orientadora: Beatriz Meurer Moreira
Prof.^a Dr.^a Beatriz Meurer Moreira
Vânia Lúcia Carreira Merquior
Prof.^a Dr.^a Vânia Lúcia Carreira Merquior
(Membro da Banca)

Coordenadora: Agnes Marie Sá Figueiredo
Prof.^a Dr.^a Agnes Marie Sá Figueiredo

Rio de Janeiro, 22 de maio de 2019.

Marinella Silva Laport
Prof.^a Dr.^a Marinella Silva Laport
(Presidente da Banca)
Simone Aranha Nouer
Prof.^a Dr.^a Simone Aranha Nouer
(Membro da Banca)
Tatiana de Castro Abreu Pinto
Prof.^a Dr.^a Tatiana de Castro Abreu Pinto
(Membro da Banca / Revisora)

Candidata: Samantha dos Santos Tufic
Samantha dos Santos Tufic

*Dedico esse trabalho aos meus pais, Conceição e Marcus,
que sempre me apoiaram a todo momento e sempre me
deram forças e me ensinaram a nunca desistir dos meus
sonhos mesmo que para isso eu tivesse que sair da minha
cidade natal*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e Nossa Senhora que sempre me fortaleceram durante todos esses anos de luta e saudades até a conclusão desse trabalho.

Agradeço aos meus pais, Conceição e Marcus, que me deram forças para persistir nos meus sonhos e metas, mesmo que para isso eu tivesse que sair da minha cidade natal, Manaus e ficar longe deles. Essa realização não é apenas minha, mas também deles que mesmo diante de tantas saudades riram comigo, que diante de tristezas e dificuldades que tivemos na nossa família durante esse tempo, mesmo assim mandavam forças e tentaram me acalmar dizendo que estava tudo bem. Eu conheço muito meus pais e eles me conhecem demais, eu entendia quando eles estavam tristes e eles entendiam quando eu estava triste, mas nós sempre nos amparávamos e nos amparamos até hoje, mesmo com a distância, mesmo com a saudade.

Ao meu noivo, Luiz Garutti, que me apoiou sempre, que me amparou a todo momento, que me aguentou porque a vida de pós-graduação não é fácil, sempre esteve do meu lado nos momentos de dificuldades, tristeza, e também de alegria, nós sabemos o quanto a distância é ruim, mas nós vencemos mais uma vez.

Agradeço as várias vezes que minha cadelinha, Lady (*in memoriam*), me alegrou durante tanto tempo, desde 2003 até 2018, desde a minha adolescência, até os períodos de estudo para a seleção do mestrado, ela, sem dúvida, foi minha companheira e sei que ainda está nos acompanhando onde quer que ela esteja.

A família Santos e família Tufic pelo apoio e compreensão.

À minha melhor amiga, Karine, que sempre esteve do meu lado, me apoiando e me dando palavras de alegria e de força, amizade já dura 25 anos.

A todos que fizeram parte da minha trajetória acadêmica na Universidade Federal do Amazonas (UFAM), em especial a Débora Braz (naquela época professora da UFAM) que fez o primeiro contato com a professora Beatriz, me apresentando indiretamente para a minha futura orientadora.

Agradeço ainda às grandes funcionárias que encontrei pelo caminho antes da entrada no mestrado, como a farmacêutica Rossicleia Lins que durante o meu estágio no Laboratório de Bacteriologia na Fundação de Medicina Tropical (FMT-HVD) me mostrou quão lindo microbiologia pode ser, ela sem dúvida é uma inspiração de profissional e também de pessoa, sempre demonstrando o grande amor que sente

pela bacteriologia e à farmacêutica Yonne Chehuan pela grande pessoa e profissional, me deu oportunidades de aprender a área de análises clínicas, foi nesse período que soube que havia sido selecionada no Mestrado em Microbiologia.

Agradeço também a todos os funcionários dos laboratórios de bacteriologia e análises clínicas da FMT-HVD.

À Valdemira, prima de minha mãe, que me recebeu em sua casa, sem nem ao menos me conhecer, uma fazendo companhia para a outra, sem dúvida foi essencial na minha estadia no Rio de Janeiro.

À minha orientadora Beatriz Moreira que mesmo sem me conhecer diretamente, aceitou me orientar nessa minha trajetória. E no decorrer desses dois anos sempre me ensinou e me orientou da melhor forma possível, claro que sempre tem aquele momento de ansiedade e ela sempre tentou me acalmar. Agradeço a professora Káris Rodrigues que me auxiliou a todo momento nas análises dos dados. As duas sempre colocaram o amor e dedicação no nosso projeto.

À Coordenação do Programa de Pós-graduação em Ciências (microbiologia) pelo apoio.

A todos os viajantes que consentiram participar do estudo, sem eles nada disso seria realizado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

A todos os funcionários, professores e alunos de pós-graduação e de iniciação científica do laboratório no qual faço parte. Em especial as pessoas que me ajudaram com ensinamentos e palavras de carinho e amor, nesses dois anos no L IMM, são pessoas que sem dúvida não irei esquecer, estão no meu coração, são eles: Danielle Rezende, João Vitor, Herisson Yoshiki, Luís Guilherme, Patrícia Rocha, Ana Souza, Jupira, Valéria Brígido, Gabriela Caramano e Lucas Vilar.

E por fim aos meus entes queridos *in memoriam* meus avós Rosa Tufic, Pedro Tufic e José Duarte, meus tios Maria Alice, Telêmaco, José Francisco, Carlos Augusto e Maurício que mesmo não estando, hoje, do meu lado, estão sem dúvida nenhuma comemorando onde quer que estejam.

“Sem sonhos, a vida não tem brilho. Sem metas, os sonhos não têm alicerces. Sem prioridades, os sonhos não se tornam reais. Sonhe, trace metas, estabeleça prioridades e corra riscos para executar seus sonhos. Melhor é errar por tentar do que errar por se omitir”

Augusto Cury

RESUMO

Viagens são um fator importante para a aquisição de bactérias multirresistentes (MR), principalmente que produzem beta-lactamases de espectro estendido (ESBL), carbapenemases e que carregam genes que determinam resistência plasmidial às fluorquinolonas (PMQR). Os fatores de risco relacionados à aquisição desses microrganismos são região de destino, uso de antimicrobianos, e ocorrência de diarreia durante as viagens. O objetivo do presente estudo foi determinar a frequência de aquisição de colonização por *Escherichia coli* MR por viajantes atendidos no Centro de Medicina dos viajantes da UFRJ (CIVES), incluindo amostras produtoras de ESBL, carbapenemases, carreadoras de genes que codificam PMQR e resistência plasmidial à polimixina (*mcr*). O estudo foi realizado de 2015 a 2018 em que viajantes acima de 18 anos atendidos no CIVES foram convidados a participar no estudo. Um questionário comportamental foi aplicado e os participantes foram orientados a coletar espécime de fezes com auxílio de *swab* antes da viagem e após seu retorno. O espécime foi enviado ao laboratório de microbiologia e introduzido em meio STGG. Alíquotas foram distribuídas em ágar MacConkey (MCA), MCA contendo ceftriaxona e caldo TSB contendo disco de ertapenem. A identificação das amostras de *E. coli* foi feita por espectrômetro de massas MALDI-TOF. A partir do crescimento em MCA contendo ceftriaxona, foi feito o teste fenotípico para detecção de ESBL. Genes que codificam ESBL, carbapenemases, PMQR e *mcr* foram detectados por PCR. Foi realizado teste de susceptibilidade aos antimicrobianos de duas amostras por participante, uma antes e outra após o retorno, classificando-as em MR, bem como tipificação por amplificação aleatória de DNA polimórfico (RAPD). Para todas as amostras foram determinados os filogrupos. Foram também investigadas variáveis associadas à aquisição de amostra de *E. coli* MR ou produtora de ESBL. De 224 participantes, foram incluídos 153 (68%), sendo a maioria do sexo feminino, com idade média de 38 anos. A frequência de aquisição de *E. coli* produtora de ESBL nas viagens foi de 20%, e de *E. coli* MR de 28%, sendo o subcontinente Sudeste Asiático com as maiores frequências de aquisição. A maioria das aquisições foi de *E. coli* produtora de *bla*_{CTX-M15} e em apenas uma amostra foi detectado o gene *bla*_{OXA-48}. As amostras de retorno apresentaram-se mais resistentes, quando comparadas com amostras pré-viagem, à gentamicina, ampicilina, cefalosporinas e sulfametoxazol+trimetoprim. A maioria das amostras foi caracterizada como do filogrupo A ou C, seguido de B1 e B2. A tipagem por RAPD evidenciou 103 perfis, três contendo duas amostras cada um, e 100 perfis diferentes o que demonstrou a presença de uma diversidade de perfis dentre as amostras da microbiota intestinal dos viajantes. Na análise das outras variáveis, a aquisição de *E. coli* produtora de ESBL após a viagem foi associada com viagem a turismo ($p= 0,020$) e região de destino ($p= 0,003$). A aquisição de *E. coli* MR foi associada com a região de destino ($p= 0,007$). Os viajantes brasileiros adquiriram colonização por *E. coli* MR durante viagens em frequência similar aos viajantes que partem de países desenvolvidos.

Palavras-chave: Colonização por multirresistente, viagem, *Escherichia coli*, ESBL, destino de viajantes, carbapenemases

ABSTRACT

Travelling is an important factor for acquisition of multidrug-resistant (MR) bacteria, specially extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) and carbapenemase producing bacteria and those carrying genes associated with plasmid mediated fluorquinolone resistance (PMQR). The risk factors related to acquisition of these microorganisms are the destination region, usage of antimicrobial agents, and occurrence of diarrhea during travel. The aim of this study was to determine the frequency of acquisition of colonization by MR *Escherichia coli* by travelers attended at Centro de Medicina dos Viajantes of UFRJ (CIVES), including isolates producing ESBL, carbapenemases, carrying PMQR and plasmid mediated polymyxin resistance (*mcr*) genes. The study was performed between 2015 and 2018 and travelers over 18 years of age attended at CIVES were invited to participate in the study. A comportamental questionnaire was applied and the participants were oriented to collect a anal stool specimen with a cotton swab before travel and upon return. Stool samples were sent to microbiology laboratory and stored into STGG media. Aliquots were plated onto plain Mac Conkey agar (MCA), MCA supplemented with ceftriaxone, and trypticase soy broth containing ertapenem disk. Identification of isolates as *E. coli* was performed by MALDI-TOF mass spectrometry. Cultures in MCA supplemented with ceftriaxone were used for ESBL-producing testing. The ESBL gene, carbapenemases and PMQR and *mcr* were detected by PCR. Two isolates per participant, one pre-travel and one upon return, were selected for antimicrobial susceptibility tests (isolates were classified as MR) and typing by random amplification of polymorphic DNA (RAPD). Phylogroups were determined for all isolates. In addition, we investigated the variables associated with acquisition of MR or ESBL producing *E. coli* isolates. We included 153 (68%) of 224 participants, most of them female; the mean age was 38 years. The highest frequencies of acquisition were in the Southeast Asia subcontinent. Most ESBL encoding genes were *bla_{CTX-M15}* and in only one isolate the *bla_{OXA-48}* was detected. The frequency of acquisition of ESBL-producing *E. coli* in travels was 20%, and MR *E. coli* was 28%. The isolates obtained after travel were more resistant than the isolates obtained before travel to gentamicin, ampicillin, cephalosporins and sulfamethoxazole+trimethoprim. Most isolates belonged to phylogroups A or C, followed by B1 and B2. RAPD typing discriminated 103 profiles, three of them containing two isolates, and 100 other different profiles evidencing a diversity of clonal types within the samples of travelers intestinal microbiota. The analysis of other variables showed that acquisition of colonization of ESBL producing *E. coli* after travel was associated with tourism travel ($p=0.020$) and destination area ($p=0.003$). Acquisition of MR *E. coli* was associated with destination area ($p=0.007$). Brazilian travelers acquired MR *E. coli* during travellings in similar frequency when compared to travelers from developed countries.

Keywords: Multidrug-resistant colonization, travel, *Escherichia coli*, ESBL, travelers destination, carbapenemase

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Fluxograma das principais etapas de trabalho das amostras dos viajantes 37
- Figura 2** - Perfis de fragmentos de DNA amplificados por RAPD das amostras MR com seu par respectivo ou antes da viagem ou após o seu retorno 63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Aquisição de bactéria produtora de ESBL por viajantes que se dirigiram a países fora da América do Sul descrita em estudos publicados a partir de 2010 (continua).....	27
Tabela 2 - Aquisição de bactéria produtora de carbapenemases por viajantes que se dirigiram a países fora da América do Sul	29
Tabela 3 - Aquisição de bactéria portadoras de genes <i>qnr</i> e <i>mcr</i> por viajantes que se dirigiram a países fora da América do Sul.	30
Tabela 4 - Frequência de resistência a antimicrobianos não-betalactâmicos dentre amostras produtoras de ESBL adquiridas após viagens.	31
Tabela 5 - Aquisição de bactéria resistente por viajantes que se dirigiram à América do Sul com especificação ou não sobre Brasil	32
Tabela 6 – Iniciadores utilizados para amplificação de sequências de DNA correspondentes a genes que codificam betalactamases de espectro estendido na PCR multiplex	43
Tabela 7 - Iniciadores utilizados para amplificação de fragmentos dos genes que codificam betalactamases de espectro estendido de grupos CTX-M na PCR simplex	44
Tabela 8 - Iniciadores utilizados para amplificação de fragmentos de genes que codificam betalactamases do tipo AmpC plasmidial	45
Tabela 9 – Iniciadores utilizados para amplificação de fragmentos de genes que codificam betalactamases do tipo carbapenemases	46
Tabela 10 - Iniciadores utilizados para a detecção dos genes <i>qnrVC</i> , <i>qnrC</i> , <i>qnrB</i> , <i>qnrS</i> , <i>qnrA</i> , <i>qnrD</i> , <i>aac(6⁺)-Ib</i> e <i>qepA</i>	48
Tabela 11 - Iniciadores utilizados para amplificação de fragmento dos genes <i>mcr-1</i> ao <i>mcr-5</i>	49
Tabela 12 - Lista de genes ou fragmento utilizados para a tipificação quanto ao grupo filogenético.....	50

Tabela 13 - Descrição das principais características de 224 viajantes	52
Tabela 14 - Descrição das principais características da viagem	53
Tabela 15 - Descrição das principais características dos viajantes incluídos e excluídos.....	54
Tabela 16 – Variáveis observadas nos participantes do estudo durante a viagem ..	55
Tabela 17 - Presença de <i>E. coli</i> produtora de ESBL e <i>E. coli</i> MR na microbiota intestinal dos viajantes antes da viagem e após o seu retorno.....	56
Tabela 18 - Frequência de aquisição de <i>E. coli</i> produtora de ESBL de acordo com a região de destino	56
Tabela 19 - Frequência de aquisição de <i>E. coli</i> MR de acordo com a região de destino	57
Tabela 20 - Comparação da frequência de resistência antes da viagem e após o retorno do viajante	58
Tabela 21 - Genes que codificam ESBL identificados em viajantes na consulta pré-viagem a após retorno	59
Tabela 22 - Genes que codificam beta-lactamases do tipo CTX-M encontrados após a viagem de acordo com a região de destino	60
Tabela 23 - Grupos filogenéticos caracterizados nas amostras de <i>E. coli</i> antes da viagem e após o retorno	60
Tabela 24 - Perfis considerados iguais e diferentes de acordo com a produção de ESBL antes e após as viagens	61
Tabela 25 - Análise do uso de antimicrobianos antes da viagem e sua relação com a detecção da colonização por <i>E. coli</i> produtora de ESBL e <i>E. coli</i> MR pré-viagem dos participantes	63
Tabela 26 - Análise de associações entre variáveis e aquisição de colonização por amostra de <i>E. coli</i> produtora de ESBL ou <i>E. coli</i> MR	64

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Descrição dos países correspondentes aos continentes de destino dos viajantes.....	36
Quadro 2 - Antimicrobianos utilizados na classificação das amostras multirresistentes	41

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AIEC	<i>E. coli</i> aderente - invasiva
AMC	amoxicilina/ácido clavulânico
AMI	amicacina
AMP	ampicilina
ATCC	do inglês, <i>American Type Culture Collection</i>
CAZ	ceftazidima
CFO	cefoxitina
CFZ	cefazolina
CIM	concentração inibitória mínima
CIP	ciprofloxacino
CIVES	Centro de Informações em Saúde do Viajante
CLSI	do inglês, <i>Clinical & Laboratory Standards Institute</i>
CPM	cefepima
CRO	ceftriaxona
CRX	cefuroxima
CTX	cefotaxima
DAEC	<i>E. coli</i> aderência difusa
DHFR	enzima diidrofolato redutase
EAEC	<i>E. coli</i> enteroagregativa
EDTA	ácido etilodiamino-tetra-acético
EHEC	<i>E. coli</i> enterohemorrágica
EIEC	<i>E. coli</i> enteroinvasiva
EPEC	<i>E. coli</i> enteropatogênica
ERT	ertapenem
ESBL	beta-lactamase de espectro estendido
ETEC	<i>E. coli</i> enterotoxigênica
ExPEC	<i>E. coli</i> patogênica extra-intestinal
FOS	fosfomicina
GEN	gentamicina
GlpT	glicerol-3-fosfato
HCCA	α -ciano-4-hidroxicinâmico

IRAS	infecções relacionadas a assistência em saúde
ITU	infecção do trato urinário
LEE	locus da ilha de patogenicidade do apagamento de enterócitos
LIMM	Laboratório de Investigação em Microbiologia Médica
LPS	lipopolissacarídeo
MALDI-TOF-MS	do inglês, <i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight</i>
MBL	metalo-carbapenemase
MCA	ágar MacConkey
MNEC	<i>E. coli</i> associada a meningite neonatal
MR	multirresistente
MurA	N-acetilglicosamina enolpiruvil transferase citosólica
NIT	nitrofurantoína
PABA	ácido para-aminobenzoico
PBP	proteína de ligação a penicilina
PCR	do inglês, <i>polymerase chain reaction</i>
PMQR	do inglês, <i>plasmid mediated quinolone resistance</i>
RAPD	do inglês, <i>random amplified polymorphic DNA</i>
RND	divisão de nodulação por resistência
STGG	do inglês, <i>skim-milk, tryptone, glucose and glycerin</i>
SUT	sulfametoxazol-trimetoprim
TSA	ágar triptona soja
TSB	caldo triptona soja
UhpT	sistema de transporte de hexose-monofosfato
UPEC	<i>E. coli</i> uropatogênica
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Características e classificação de <i>Escherichia coli</i>	1
1.1.1	Grupos patogênicos ou patotipos de <i>E. coli</i>	1
1.2	Resistência aos antimicrobianos: um desafio mundial	4
1.2.1	Antimicrobianos beta-lactâmicos.....	5
1.2.1.1	Resistência aos antimicrobianos beta-lactâmicos mediada por beta-lactamases de espectro estendido.....	6
1.2.1.1.1	Beta-lactamases de espectro estendido do tipo CTX-M	7
1.2.1.2	Resistência aos antimicrobianos beta-lactâmicos mediada por AmpC plasmidial ou cefalosporinases	8
1.2.1.3	Resistência aos antimicrobianos beta-lactâmicos mediada por carbapenemases.....	9
1.2.2	Antimicrobianos quinolonas	11
1.2.2.1	Resistência às fluorquinolonas.....	12
1.2.3	Antimicrobiano colistina	13
1.2.3.1	Resistência à colistina.....	13
1.2.4	Antimicrobiano nitrofurantoína	14
1.2.4.1	Resistência a nitrofurantoína.....	15
1.2.5	Antimicrobiano aminoglicosídeos.....	16
1.2.5.1	Resistência aos aminoglicosídeos	16
1.2.6	Antimicrobiano sulfametoxazol e trimetoprim.....	17
1.2.6.1	Resistência às sulfonamidas e trimetoprim	18
1.2.7	Antimicrobiano fosfomicina	19
1.2.7.1	Resistência à fosfomicina	19
1.3	Disseminação da resistência aos antimicrobianos	20
1.3.1	Microbiota intestinal e suas mudanças frente ao uso de antimicrobianos, viagens e diarreia dos viajantes	21
1.3.2	Os viajantes e a disseminação da resistência.....	23
1.3.3	Pesquisa da disseminação da resistência através das viagens internacionais.....	24
1.3.4	Aquisição de bactérias multirresistentes após viagens	26
1.3.4.1	Aquisição de Enterobacteriaceae multirresistente em viajantes que se dirigem para a América do Sul.....	31
2	JUSTIFICATIVA	33
3	OBJETIVOS	34
3.1	Objetivo geral	34
3.2	Metas	34
4	MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1	Desenho do estudo	35
4.2	Definições adotadas no estudo	35
4.3	Fluxograma do trabalho	36
4.4	Processamento do espécime fecal para pesquisa de <i>E. coli</i>	37
4.4.1	Isolamento do microrganismo	37
4.4.2	Semeadura em meio de ágar MacConkey	38
4.4.3	Semeadura em meio ágar MacConkey contendo ceftriaxona.....	38
4.4.4	Crescimento em caldo contendo ertapenem.....	38
4.4.5	Identificação do microrganismo.....	39
4.5	Testes fenotípicos para detecção de resistência	40
4.5.1	Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos	40

4.5.2	Produção de beta-lactamases de espectro estendido	40
4.5.3	Definições de amostra multirresistente	41
4.6	Liberação do DNA bacteriano e eletroforese.....	41
4.7	Pesquisa de genes que codificam beta-lactamases	42
4.7.1	Beta-lactamases de espectro estendido do tipo CTX-M	42
4.7.2	Identificação das variantes enzimáticas dos grupos CTX-M	43
4.7.3	Beta-lactamases do tipo AmpC plasmidial	44
4.7.4	Beta-lactamases do tipo carbapenemase	45
4.8	Identificação dos genes que codificam resistência às fluorquinolonas	47
4.9	Identificação de genes que codificam resistência transferível à colistina	48
4.10	Tipificação das amostras quanto ao grupo filogenético	49
4.11	Tipificação das amostras por amplificação randômica do DNA.....	50
4.12	Análise Estatística	50
4.13	Aspectos éticos.....	51
5	RESULTADOS	52
5.1	Perfil dos participantes e da viagem: questionário pré-viagem	52
5.2	População do estudo	53
5.3	Dados do questionário pós-viagem	54
5.4	Análise microbiológica	55
5.4.1	Frequência de aquisição de <i>E. coli</i> produtora de ESBL e multirresistente ...	55
5.4.2	Genes que codificam beta-lactamases de espectro estendido detectados entre viajantes.....	59
5.5	Tipificação de amostras	60
5.5.1	Quanto ao grupo filogenético	60
5.5.2	Diversidade de genótipos de <i>fingerprinting</i>	60
5.6	Análise de variáveis associadas à aquisição de amostra de <i>E. coli</i> multirresistente ou <i>E. coli</i> produtora de ESBL.....	63
6	DISCUSSÃO	65
6.1	Perfil dos participantes do estudo e da viagem: questionário pré-viagem	65
6.2	Dados de inclusão e exclusão	66
6.3	Dados do questionário pós-viagem	67
6.4	Análise microbiológica	67
6.4.1	Frequência de aquisição de <i>E. coli</i> produtora de ESBL e <i>E. coli</i> multirresistente	67
6.4.2	Beta-lactamases de espectro estendido	70
6.5	Tipificação de amostras	71
6.5.1	Quanto ao grupo filogenético	71
6.5.2	Diversidade de genótipos de <i>fingerprinting</i>	72
6.6	Análise de variáveis associadas a aquisição de <i>E. coli</i> multirresistente ou <i>E. coli</i> produtora de ESBL.....	72
7	CONCLUSÕES.....	74
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75
9	ANEXOS	91

1 INTRODUÇÃO

1.1 Características e classificação de *Escherichia coli*

A espécie *Escherichia coli* é membro da família Enterobacteriaceae e do gênero *Escherichia*. Fazem parte deste gênero outras cinco espécies: *E. albertii*, *E. blattae*, *E. fergusonii*, *E. hermannii* e *E. vulneris* (Bopp *et al.*, 2015). Todas as espécies do gênero *Escherichia* são bactérias gram-negativas, oxidase negativas, sendo algumas móveis e tendo como característica flagelos peritríquios. Membros da família Enterobacteriaceae são anaeróbios facultativos, ou seja, crescem em aerobiose e anaerobiose, fermentam a glicose, sendo a maioria das amostras de *E. coli* fermentadoras da lactose (Trabulsi *et al.*, 2008; Bopp *et al.*, 2015).

Amostras de *E. coli* revelam uma grande diversidade, e considerável versatilidade metabólica, com capacidade de colonizar vários hospedeiros na forma de bactérias comensais compondo a microbiota intestinal de humanos e animais (Kaper *et al.*, 2004; Pitout, 2012). Além disso, há uma variedade de linhagens de *E. coli* patogênicas com a capacidade de causar infecções no trato gastrointestinal e fora desse sistema, como infecção do trato urinário (ITU), da corrente sanguínea e do sistema nervoso central (Pitout, 2012; Vila *et al.*, 2016; Alizade, 2018).

De todas as espécies de Enterobacteriaceae, *E. coli* é a que tem maior relevância médica, sendo a mais frequentemente recuperada do intestino delgado da maioria dos mamíferos (Poirel *et al.*, 2018). Quando há modificação da microbiota intestinal do hospedeiro, imunossupressão, ou quando o microrganismo é introduzido em outros tecidos, *E. coli* pode causar infecção (Croxen *et al.*, 2013; Bopp *et al.*, 2015).

1.1.1 Grupos patogênicos ou patotipos de *E. coli*

As cepas patogênicas de *E. coli* são reunidas nos grupos *E. coli* patogênica extraintestinal (ExPEC) e *E. coli* intestinal ou diarreiogênica, conforme a doença ocorre fora ou dentro do trato gastrointestinal respectivamente. De acordo com métodos de tipagem molecular é possível observar uma diversidade entre as cepas de cada grupo, o que motiva a realização de estudos para desvendar a evolução e transmissão desses microrganismos (Bopp *et al.*, 2015).

Os patotipos de *E. coli* apresentam uma tendência a serem caracterizados como grupos clonais, ou seja, possuem antígenos compartilhados, como O, na porção

do lipopolissacarídeo (LPS) e H, quando relacionado a flagelos que definem sorogrupos ou sorotipos (Kaper *et al.*, 2004; Robins-Browne *et al.*, 2016).

Dentre as linhagens patogênicas intestinais encontram-se *E. coli* enteropatogênica (EPEC), enterotoxigênica (ETEC), enteroinvasora (EIEC), enterohemorrágica (EHEC), enteroagregativa (EAEC), difusamente aderente (DAEC) e aderente - invasiva (AIEC) (Kaper *et al.*, 2004; Trabulsi *et al.*, 2008; Croxen *et al.*, 2013; Sahl *et al.*, 2013; Bopp *et al.*, 2015).

EPEC foi o primeiro patotipo descoberto, caracterizado por sorotipos de *E. coli* causadores de diarreia infantil nos países em desenvolvimento, sendo uma importante causa de morte prematura nessa faixa etária (Robins-Browne, 1987; Robins-Browne *et al.*, 2016). Amostras desse patotipo são caracterizadas pela presença do locus da ilha de patogenicidade do apagamento de enterócitos (LEE), não são produtoras de enterotoxinas ou de toxina Shiga, além de não serem invasoras. A expressão do LEE está associada à formação de lesões distintas na superfície de células epiteliais intestinais através da ligação íntima das bactérias com essas células, causando modificações no citoesqueleto, o que acarreta no rápido início da diarreia, aumento da secreção intestinal, bem como a redução da absorção de íons e solutos (Kaper *et al.*, 2004; Croxen *et al.*, 2013; Bopp *et al.*, 2015; Singh e Aijaz, 2016).

ETEC causa diarreia aquosa, podendo variar de doença leve e autolimitada a doença grave, sendo a maior causa de diarreia dos viajantes. Amostras desse patotipo têm capacidade de produzir enterotoxinas termolábeis e termoestáveis, além de possuir um conjunto de fatores de colonização para a sua aderência ao epitélio intestinal (Kaper *et al.*, 2004; Croxen *et al.*, 2013). ETEC é uma importante causa de morte em países em desenvolvimento principalmente em crianças, podendo acometer adultos (Bopp *et al.*, 2015).

EHEC tem como principal reservatório o trato intestinal bovino e os primeiros surtos registrados estavam associados ao consumo de hambúrgueres mal cozidos (Kaper *et al.*, 2004). Amostras desse patotipo são frequentemente adquiridas na comunidade através de alimentos ou água contaminados (Riley, 2014). A característica principal desse patotipo é a produção de toxina Shiga codificada por fagos, conhecida como verotoxina, que possibilita a interrupção da síntese proteica, causando as manifestações da doença que podem ser desde uma diarreia leve a

moderada, ou até manifestações mais graves, como a colite hemorrágica, além do desenvolvimento da síndrome urêmica hemolítica e insuficiência renal (Croxen *et al.*, 2013; Sahl *et al.*, 2013; Bopp *et al.*, 2015; Robins-Browne *et al.*, 2016).

EAEC causa frequentemente diarreia persistente em crianças em países em desenvolvimento e países desenvolvidos, podendo acometer adultos, incluindo viajantes (Huang e Dupont, 2004; Kaper *et al.*, 2004; Bopp *et al.*, 2015; Robins-Browne *et al.*, 2016). As amostras desse patotipo não secretam enterotoxinas e têm a capacidade de adesão aos enterócitos em um padrão conhecido como autoagregativo, ou seja, as bactérias aderem umas às outras de forma semelhante a “tijolo empilhado” ou na forma de um biofilme espesso (Nataro e Kaper, 1998; Kaper *et al.*, 2004).

Os sorotipos EIEC invadem as células do cólon e produzem diarreia aquosa e sanguinolenta, por um mecanismo patogênico semelhante ao do gênero *Shigella* (Bopp *et al.*, 2015). A diarreia causada pela EIEC ocorre devido à invasão e penetração de bactérias nos enterócitos, acarretando a sua destruição. Essas amostras se ligam à mucosa do intestino grosso e invadem as células por endocitose (Gomes *et al.*, 2016).

DAEC tem como principal característica causar um padrão difuso de aderência a monocamadas de células intestinais que sofrem um efeito citopático caracterizado pelo desenvolvimento de longas extensões celulares, que envolvem as bactérias aderentes (Kaper *et al.*, 2004).

O patotipo AIEC não está associado com diarreia, mas sim ao desenvolvimento da doença de Crohn, que é uma enfermidade inflamatória crônica intestinal (Robins-Browne *et al.*, 2016).

Os sorotipos pertencentes a ExPEC constituem parte da microbiota intestinal de uma pequena porção da população saudável, colonizando esse nicho de forma assintomática, sendo capazes de ter acesso eventual a locais fora do intestino, colonizando-os e causando infecções (Köhler e Dobrindt, 2011). Algumas linhagens patogênicas de ExPEC possuem mais fatores de virulência que as possibilitam causar infecções extraintestinais através da colonização em outros tecidos (Robins-Browne *et al.*, 2016). Dentre as linhagens patogênicas extraintestinais podem ser encontrados os patotipos *E. coli* uropatogênica (UPEC) e o associado com meningite e sepse (MNEC).

As estirpes de UPEC são patogênicas para o trato urinário. Estas estirpes são as principais causadoras de ITU adquirida na comunidade, e carregam vários fatores de virulência codificados tanto no cromossomo quanto em plasmídeos (Trabulsi *et al.*, 2008; Bopp *et al.*, 2015). As estirpes de MNEC são importantes causadores de meningite neonatal, associada com alta morbidade e mortalidade (Bopp *et al.*, 2015).

As cepas típicas de *E. coli* pertencente a determinado patotipo intestinal podem ser caracterizadas por um ou mais fatores de virulência. Porém, para os patotipos extraintestinais, muitos são os fatores de virulência que podem ser encontrados relacionados à patogenicidade da doença, e muitas podem ser as combinações desses fatores (Köhler e Dobrindt, 2011; Lu *et al.*, 2016).

Essa compreensão sobre os patotipos vem se transformando com a descoberta de formas híbridas de *E. coli* patogênicas intestinais e extraintestinais que carregam um aparato de fatores de virulência mais diverso. No estudo de Lu *et al.* (2016), por exemplo, foram estudadas amostras de *E. coli* recuperadas de 116 marmotas de regiões remotas da China, isoladas de qualquer atividade humana. O resultado da análise do genoma completo das amostras mostrou que, de acordo com a presença dos fatores de virulência, as amostras patogênicas encontradas na microbiota desses animais eram diferentes das amostras patogênicas detectadas em humanos. As amostras patogênicas de *E. coli* animais eram híbridas, diferentemente daquelas isoladas de humanos. A conclusão dos autores foi de que, na sua origem evolutiva, as cepas patogênicas de *E. coli* híbridas perdem genes de virulência desnecessários e ganham novos, formando os tipos específicos de patogenicidade que classificamos e nomeamos.

1.2 Resistência aos antimicrobianos: um desafio mundial

Os antimicrobianos exercem um importante papel na saúde pública mundial, sendo utilizados em várias doenças infecciosas. Porém, sua utilização levou ao surgimento e disseminação da resistência a antimicrobianos (Vila *et al.*, 2016). Este fenômeno é um desafio mundial, já que está associado a alta morbidade e mortalidade (Akova, 2016) e por isso é considerado uma das principais ameaças para a saúde pública (Vittecoq *et al.*, 2016). A resistência a múltiplos fármacos, ou multirresistência, em bactérias gram-positivas e gram-negativas, diminui a eficácia do tratamento dessas infecções, devido a presença de bactérias multirresistentes (MR) (Frieri *et al.*, 2017). E de acordo com a lista de bactérias resistentes com prioridade em pesquisa e

desenvolvimento de novos antimicrobianos divulgada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) estão incluídas na categoria crítica de urgência bactérias dos gêneros *Acinetobacter*, *Pseudomonas* e várias espécies da família Enterobacteriaceae, como *Klebsiella*, *E. coli*, *Serratia* e *Proteus*.

O termo ESCAPE caracteriza as iniciais de determinadas bactérias que de alguma forma causam infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) (Rice, 2008). Dentre essas bactérias estão destacadas: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium difficile*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e aquelas da família Enterobacteriaceae, na qual se inclui *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus* spp. e *Enterobacter* spp. (Peterson, 2009).

Os microrganismos pertencentes à família Enterobacteriaceae estão entre os principais agentes de infecções comunitárias e IRAS, revelam grande capacidade de se disseminar entre os humanos e uma grande facilidade de aquisição de resistência através da transferência horizontal de genes (Nordmann *et al.*, 2011).

E. coli, dentre os microrganismos gram-negativos pertencentes à família Enterobacteriaceae, é um dos mais frequentes agentes de infecção da corrente sanguínea e de ITU (Vila *et al.*, 2016), que podem se manifestar de maneira simples ou até de maneira grave, como agentes portadores de uma variedade de mecanismos de resistência (Akova, 2016).

E. coli é um importante reservatório de genes de resistência, já que está presente na microbiota de animais e humanos, entrando em contato com muitos microrganismos da microbiota intestinal onde pode realizar transferência horizontal de genes de virulência e de resistência com outros microrganismos (Vila *et al.*, 2016; Poirel *et al.*, 2018).

A aquisição de uma cepa de *E. coli* virulenta e/ou MR se dá através de mecanismos variados como contato direto entre animais e a população, contato com excreções animais ou através da cadeia alimentar (Poirel *et al.*, 2018).

A seguir são apresentados os mecanismos de ação, resistência e principais representantes dos antimicrobianos beta-lactâmicos, fluorquinolonas, colistina, nitrofurantoína, aminoglicosídeos, sulfametoxazol+trimetoprim e fosfomicina.

1.2.1 Antimicrobianos beta-lactâmicos

Os antimicrobianos beta-lactâmicos possuem um sistema de anel reativo, conhecido como anel beta-lactâmico formado por uma amida cíclica (Fernandes *et al.*,

2013). Estes antimicrobianos exercem efeito bactericida através da inibição da síntese de parede celular de bactérias, que se inicia com a ligação às enzimas envolvidas nessa síntese, as proteínas de ligação à penicilina (PBP), e consequente bloqueio da ligação cruzada de unidades de peptidoglicana, inibindo formação de ligação peptídica (Ghuysen, 1991; Drawz e Bonomo, 2010; Rice, 2012; Fernandes *et al.*, 2013; Shaikh *et al.*, 2015). Em seguida a essa inibição, ocorre a degradação ativa da camada de peptidoglicano por autolisinas e consequente morte bacteriana (Tomasz *et al.*, 1970). Essas autolisinas são enzimas associadas à membrana que clivam as ligações das cadeias de peptidoglicana, tornando-as importantes na manutenção da forma celular (Höltje, 1998).

A peptidoglicana é uma rede de cadeias de carboidratos unidas por ligações peptídicas, constituindo uma única macromolécula que envolve a célula. Essa camada tem a função de proteger as bactérias da pressão externa, além de fornecer um suporte para ancoragem de outras moléculas de superfície (Vollmer *et al.*, 2008; Philippe *et al.*, 2015).

Os antimicrobianos beta-lactâmicos podem ser divididos em cinco grupos, todos possuindo um anel beta-lactâmico em comum, caracterizando o nome da classe desses antimicrobianos. São eles: penicilinas, cefalosporinas, cefamicinas, monobactâmicos e carbapenemas. A resistência aos beta-lactâmicos nas bactérias gram-negativas se deve principalmente à destruição do antimicrobiano através da produção de enzimas chamadas de beta-lactamases, capazes de inativar o mesmo pela ligação ao anel beta-lactâmico e sua consequente hidrólise (Ambler, 1980; Pitout e Laupland, 2008; Rice, 2012).

1.2.1.1 Resistência aos antimicrobianos beta-lactâmicos mediada por beta-lactamases de espectro estendido

As enzimas do tipo beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) hidrolisam a maioria dos antimicrobianos beta-lactâmicos, como as penicilinas, cefalosporinas de terceira e quarta geração e monobactâmicos. ESBLs não possuem a capacidade de hidrolisar as cefamicinas e os carbapenemas, podendo ser inibidas pelo ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam (Pitout e Laupland, 2008; Barguigua *et al.*, 2011; Shaikh *et al.*, 2015; Alizade, 2018).

As ESBL pertencem à classe molecular A de Ambler e subgrupo 2be da classificação funcional de Bush–Jacoby–Medeiros, o que as caracteriza como beta-lactamases do grupo 2b (como TEM-1, TEM-2 e SHV-1), sendo “e” indicativo de espectro estendido (Ambler, 1980; Bradford, 2001; Paterson e Bonomo, 2005; Falagas e Karageorgopoulos, 2009; Rocha *et al.*, 2016).

As enzimas ESBL foram inicialmente observadas em amostras clínicas em 1980. As ESBL mais prevalentes inicialmente eram derivadas principalmente de grupos de beta-lactamases do tipo TEM e SHV por meio de mutações ou modificações genéticas que produziram fenótipo do tipo espectro estendido (Bradford, 2001; Falagas e Karageorgopoulos, 2009; Oliveira *et al.*, 2009; Barguigua *et al.*, 2011; Alizade, 2018).

Os genes que codificam as ESBL estão frequentemente localizados em plasmídeos com alta capacidade de mobilização. Esses plasmídeos podem carrear genes de resistência adicionais contra outras classes de antimicrobianos mais recentemente desenvolvidas (Barguigua *et al.*, 2011; Ray *et al.*, 2018).

A frequência de produção de enzimas do tipo ESBL varia e vem aumentando em todos os gêneros da família Enterobacteriaceae (Falagas e Karageorgopoulos, 2009; Biehl *et al.*, 2016), sendo mais encontradas em *K. pneumoniae* e *E. coli* (Oliveira *et al.*, 2009; Shahid *et al.*, 2011; Rocha *et al.*, 2016; Sujatha *et al.*, 2017; Alizade, 2018).

Mais de 300 subtipos de ESBL já foram registrados. Dentre os tipos mais comumente encontrados estão CTX-M, TEM, OXA e SHV (Haller *et al.*, 2018). Porém, outras famílias ou subtipos foram associados ao fenótipo de espectro estendido, tais como: PER, VEB, BES, GES, TLA e OFS (Bradford, 2001; Paterson e Bonomo, 2005; Zhao e Hu, 2013; Alizade, 2018).

1.2.1.1.1 Beta-lactamases de espectro estendido do tipo CTX-M

As enzimas do tipo CTX-M, também conhecidas como cefotaximases, devido à melhor hidrólise da cefotaxima se comparado à ceftazidima, assim como a maioria das enzimas do tipo ESBL, são adquiridas através de plasmídeos de uma determinada linhagem filogenética, que estão aumentando em frequência e impacto clínico (Rawat e Nair, 2010; Zhao e Hu, 2013; Shaikh *et al.*, 2015; Rocha *et al.*, 2016).

A primeira descoberta das enzimas do tipo CTX-M foi no ano de 1989

(Bauernfeind *et al.*, 1990); porém, essas enzimas ainda não apresentavam, naquela época, uma ampla disseminação, como as do tipo TEM e SHV (Cantón *et al.*, 2012). A disseminação da enzima CTX-M teve início na década de 2000 quando houve uma dispersão e evolução acelerada dessas enzimas, tornando-se a mais detectada em *E. coli* (Lahlaoui *et al.*, 2014).

As beta-lactamases do tipo CTX-M são originárias de genes cromossômicos presentes em um microrganismo ambiental da família Enterobacteriaceae, *Kluyvera* spp. (Bush e Jacoby, 2010). A transferência dessa ESBL para microrganismos de importância médica ocorreu através de plasmídeos conjugativos e transposons (Shaikh *et al.*, 2015).

Mais de 150 variantes de CTX-M são encontradas na classe molecular A, grupo 2be, compostas por seis grupos ou linhagens: CTX-M 1, CTX-M 2, CTX-M 8, CTX-M 9 e CTX-M 25 e KLUC (Mathers *et al.*, 2015). Cada grupo difere do outro por $\geq 10\%$ nos resíduos de aminoácidos (Bonnet, 2004; Pitout e Laupland, 2008; D'Andrea *et al.*, 2013; Lahlaoui *et al.*, 2014; Shaikh *et al.*, 2015; Rocha *et al.*, 2016). Cada grupo das enzimas do tipo CTX-M estão relacionadas com uma espécie de *Kluyvera* (Lahlaoui *et al.*, 2014).

ESBLs do tipo CTX-M apresentam ampla disseminação na Europa e na América do sul (Radice *et al.*, 2002; D'Andrea *et al.*, 2013; Rocha *et al.*, 2016). Essas ESBL são consideradas as mais prevalentes no mundo (Barguigua *et al.*, 2011; Shahid *et al.*, 2011; D'Andrea *et al.*, 2013; Zhao e Hu, 2013; Sujatha *et al.*, 2017).

Cepas epidêmicas carreadoras de CTX-M foram descritas, especialmente *E. coli* e *K. pneumoniae*, mas outras espécies de enterobactérias também são carreadoras dessa enzima (Pitout, 2012; D'Andrea *et al.*, 2013). A maioria das vezes em que essas enzimas foram identificadas na comunidade ocorreu em amostras de *E. coli* causadoras de ITU (Paterson e Bonomo, 2005; Rawat e Nair, 2010).

1.2.1.2 Resistência aos antimicrobianos beta-lactâmicos mediada por AmpC plasmidial ou cefalosporinases

A beta-lactamase do tipo AmpC foi observada primeiramente codificada no cromossomo de bactérias gram-negativas como *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens* e *P. aeruginosa*, que poderiam produzir a enzima em grandes quantidades, por mutação no promotor ou regulador gênico ou por indução relacionada à exposição a beta-lactâmicos, proporcionando resistência a oximino e

metóxi-cefalosporinas e monobactâmicos (Sanders, 1987; Philippon *et al.*, 2002; Harris, 2015).

As beta-lactamases do tipo AmpC são classificadas no grupo 1 de Bush-Jacoby, e são também conhecidas como cefalosporinas do grupo C de Ambler. Têm poder de hidrolisar as penicilinas, as cefalosporinas de primeira geração e aztreonam, além de hidrolisar as cefamicinas; diferentemente das ESBL, não são inibidas pelo ácido clavulânico ou por outros inibidores de beta-lactamases (Jacoby, 2009; Moxon e Paulus, 2016).

A partir de 1989, os genes que codificam beta-lactamases do tipo AmpC transferíveis, codificados por plasmídeos, se tornaram conhecidos (Philippon *et al.*, 2002; Walther-Rasmussen e Høiby, 2002). A expressão dessa enzima, quando mediada por plasmídeo, confere hiperprodução de AmpC em *E. coli*, *Klebsiella* e *Salmonella enteritidis* (Jacoby, 2009).

Os tipos de enzimas AmpC plasmidial mais encontradas são FOX, ACC, LAT, MIR, ACT, MOX, CMY, DHA, sendo o tipo CMY o de maior prevalência entre os microrganismos no mundo (Jacoby, 2009). Atualmente, em *E. coli* e *K. pneumoniae*, as beta-lactamases do tipo AmpC mais encontradas são CMY e DHA (Pfeifer *et al.*, 2010; Poirel *et al.*, 2018).

1.2.1.3 Resistência aos antimicrobianos beta-lactâmicos mediada por carbapenemases

Os antimicrobianos carbapenemas são utilizados no tratamento de infecções graves causadas por bacilos gram-negativos MR, principalmente os produtores de ESBL e beta-lactamases do tipo AmpC (Wadekar *et al.*, 2013; Haller *et al.*, 2018; Mohsen *et al.*, 2018). O aumento da utilização de carbapenemas foi um fator importante na disseminação de bactérias produtoras de carbapenemases. Essas beta-lactamases inativam grande parte dos antimicrobianos beta-lactâmicos (Queenan e Bush, 2007; Marsik e Nambiar, 2011; Jean *et al.*, 2015), resultando em resistência às penicilinas, cefalosporinas de primeira a última geração, carbapenemas e aztreonam, o que restringe de forma importante as opções de tratamento (Haller *et al.*, 2018).

A resistência aos carbapenemas nas enterobactérias que causam infecções graves é considerada um desafio no âmbito clínico (Tängdén e Giske, 2015), restando como opções para tratamento antimicrobianos potencialmente tóxicos, como

polimixina B e colistina (Wadekar *et al.*, 2013; Chaudhary *et al.*, 2018), ou com maior risco de desenvolvimento de resistência durante o tratamento, o que acontece com a fosfomicina (Ellington *et al.*, 2006; Souli *et al.*, 2011). As principais bactérias da família Enterobacteriaceae encontradas com esse tipo de resistência são *E. coli* e *K. pneumoniae*, principalmente no âmbito das IRAS (Tängdén e Giske, 2015).

Levando em consideração a estrutura molecular das carbapenemases, essas enzimas podem ser divididas em 2 grandes grupos: serino-carbapenemases (grupo A e grupo D), com uma porção serina no sítio ativo, e metalo-betalactamases (MBL, grupo B) com a principal característica de possuir íon zinco no seu sítio ativo (Queenan e Bush, 2007; Rolain *et al.*, 2010; Jean *et al.*, 2015; Nandy *et al.*, 2015; Haller *et al.*, 2018). As enzimas pertencentes a esse último grupo podem ser inibidas pelo EDTA, diferente de outras beta-lactamases (Queenan e Bush, 2007; Wadekar *et al.*, 2013; Amandeep Kaur e Singh, 2017).

A carbapenemase encontrada mais comumente é KPC, do grupo A, a mais frequente em amostras de *Klebsiella* spp., mas que também pode ocorrer em outras bactérias gram-negativas. A primeira detecção desta carbapenemase foi no ano de 1996 nos EUA; microrganismos produtores dessa enzima se disseminaram amplamente em poucos anos (Nordmann *et al.*, 2011; Haller *et al.*, 2018). Dentre as carbapenemases do grupo D estão as enzimas do tipo OXA, primeiramente detectado em organismos não fermentadores tais como *A. baumannii* e *P. aeruginosa*, possui um fraco poder de hidrólise dos carbapenemas. Possui uma preocupação com sua capacidade de maneira rápida alterar e expandir seu espectro de atividade (Codjoe e Donkor, 2017). Dessa classe a variante OXA-48 é a mais comum e é difundida em espécies da família Enterobacteriaceae, principalmente *K. pneumoniae* na Turquia, Oriente Médio, Norte da África e Europa (Ma *et al.*, 2015).

Dentre os tipos de MBL descritos, os mais comuns são IMP, VIM e NDM, e outros considerados endêmicos são SIM, GIM e SPM (Jean *et al.*, 2015; Nandy *et al.*, 2015).

As enzimas do tipo IMP foram encontradas, em 1991, localizadas em plasmídeos conjugativos de amostras de *P. aeruginosa* (Watanabe *et al.*, 1991). Em relação à enzima VIM, os primeiros relatos de bactéria carregando o gene que codifica a enzima VIM foi em 1996 na França (Poirel *et al.*, 2000). Desde então, os genes que

codificam para as demais variantes de VIM têm sido encontrados em amostras de *P. aeruginosa* e de muitas espécies da família Enterobacteriaceae (Jean *et al.*, 2015).

Em 2009, foram descritas as primeiras amostras de *K. pneumoniae* e *E. coli* produtoras da enzima NDM-1 (nome advindo da cidade onde teria surgido, New Delhi metalo-beta-lactamase). As amostras detectadas foram isoladas a partir de espécime clínico obtido de um paciente hospitalizado na Suécia depois de voltar de Nova Delhi (Yong *et al.*, 2009). Foi identificado que essas amostras resistentes já estavam presentes no subcontinente indiano, incluindo Índia, Paquistão, Bangladesh e Sri Lanka (Nordmann, 2014).

A enzima SPM-1, também do grupo das MBL, foi descrita pela primeira vez em 2002 a partir de amostra clínica de *P. aeruginosa* isolada de paciente admitido em hospital localizado em São Paulo (Toleman *et al.*, 2002). Em 2002, a enzima GIM foi encontrada em plasmídeos não transferíveis também em *P. aeruginosa* na Alemanha e posteriormente encontrado em algumas espécies de Enterobacteriaceae (Rieber *et al.*, 2012).

1.2.2 Antimicrobianos quinolonas

Em 1962 foi introduzido o primeiro antimicrobiano da classe das quinolonas, o ácido nalidíxico. A partir de 1980 foi adicionado à molécula de quinolona um átomo de flúor no carbono 6, caracterizando a segunda geração de quinolonas, sendo agora chamadas de fluorquinolonas (Ruiz, 2003; Fàbrega *et al.*, 2009; Cheng *et al.*, 2013; Yan *et al.*, 2017). Subseqüentes modificações na molécula foram realizadas para a formação de novos antimicrobianos dessa classe, resultando na terceira e quarta gerações das quinolonas (Oliphant e Green, 2002; Ruiz, 2003; Zhang *et al.*, 2017).

Alguns exemplos de fluorquinolonas são norfloxacin, ciprofloxacina, levofloxacina e moxifloxacina. Estes fármacos atuam contra uma variedade de bactérias patogênicas gram-positivas e gram-negativas, ocorrendo grande uso desses antimicrobianos mundialmente (Aldred *et al.*, 2014; Redgrave *et al.*, 2014).

O mecanismo de ação das quinolonas é inibir a síntese do DNA bacteriano, interferindo na manutenção da topologia cromossômica, tendo como alvos as enzimas bacterianas DNA girase e topoisomerasas IV. O antimicrobiano atua na formação do complexo quinolona-enzima-DNA, ficando bloqueada a maquinaria de replicação do DNA, que leva à inibição da sua síntese e morte bacteriana (Oliphant e Green, 2002; Drlica *et al.*, 2008; Aldred *et al.*, 2014).

A função principal da DNA girase e das topoisomerasas é permitir que determinada molécula de DNA de fita dupla passe por outra, ocorrendo depois sua religação na forma original (Fàbrega *et al.*, 2009). Com a ligação das quinolonas nos seus alvos não haverá, assim, atuação dessas enzimas no DNA bacteriano.

1.2.2.1 Resistência às fluorquinolonas

Em conjunto à ampla utilização das fluorquinolonas, houve crescente resistência a esses antimicrobianos, encontrada na maioria das espécies que são tratadas por esta classe de medicamentos (Dalhoff, 2012; Aldred *et al.*, 2014; Nüesch-Inderbinnen *et al.*, 2015; Yan *et al.*, 2017). A resistência a esses antimicrobianos tornou-se comum em amostras da família Enterobacteriaceae (Strahilevitz *et al.*, 2009), sendo mais frequente em amostras ExPEC (Herrera-León *et al.*, 2016).

Os mecanismos principais para a resistência cromossômica às fluorquinolonas decorrem de mutações nos genes que codificam as enzimas DNA-girase e DNA topoisomerase IV e a superexpressão dos sistemas de bombas de efluxo que possibilitam o transporte ativo das quinolonas para fora da célula (Ruiz, 2003; Hooper e Jacoby, 2015; Yan *et al.*, 2017).

Há também a resistência mediada por plasmídeos, conhecida pela sigla PMQR (do inglês *plasmid mediated quinolone resistance*) (Jacoby *et al.*, 2014; Yan *et al.*, 2017). No primeiro relato de PMQR, foi descrito o gene *qnr*, encontrado em uma amostra de *K. pneumoniae* (Martínez-Martínez *et al.*, 1998)

Proteínas Qnr incluem famílias de pequenas proteínas de pentapeptídeos repetidos codificadas por *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS*, *qnrE* e *qnrVC* (Jacoby *et al.*, 2014; Albornoz *et al.*, 2017). Essas proteínas têm a função de proteger as enzimas alvo da atividade das fluorquinolonas (Nüesch-Inderbinnen *et al.*, 2015; Aldred *et al.*, 2014; Herrera-León *et al.*, 2016).

Outro mecanismo de resistência relacionado ao PMQR é a modificação de aminoglicosídeos e algumas quinolonas, como ciprofloxacina e norfloxacina, por uma enzima chamada de aminoglicosídeo acetiltransferase, AAC (6')-Ib-cr, que inativa o antimicrobiano e perde sua atividade (Robicsek *et al.*, 2006). Além das bombas de efluxo de quinolonas mediadas por plasmídeos QepA e OqxAB que diminuem a concentração intracelular desses antimicrobianos (Hansen *et al.*, 2007; Yamane *et al.*, 2007).

1.2.3 Antimicrobiano colistina

Com o agravamento da crise mundial de saúde relacionada à resistência a antimicrobianos, surgiram microrganismos com pouca ou nenhuma susceptibilidade aos tratamentos disponíveis, principalmente em infecções causadas por bactérias gram-negativas. Dessa forma surgiu a necessidade de utilização de antimicrobianos de última escolha, como a colistina (Lim *et al.*, 2010; Wadekar *et al.*, 2013; Chaudhary *et al.*, 2018; Vardakas *et al.*, 2018).

Em 1940, a colistina foi descoberta; porém sua utilização na clínica teve início apenas no final da década de 1950. Por muito tempo, entre 1970 e 1990, a colistina não era utilizada frequentemente, devido à sua nefrotoxicidade e neurotoxicidade, e também devido ao surgimento de outros antimicrobianos menos tóxicos como os beta-lactâmicos (Lim *et al.*, 2010).

A colistina é um antimicrobiano da classe das polimixinas, com amplo espectro de ação contra bactérias gram-negativas (Falagas e Karageorgopoulos, 2009; Lim *et al.*, 2010; Javan *et al.*, 2015; Bitrus *et al.*, 2018). A colistina é também conhecida como polimixina E, sendo incluída no grupo das polimixinas mais utilizadas, juntamente com a polimixina B (Liu *et al.*, 2016; Bitrus *et al.*, 2018).

A colistina tem efeito bactericida através da ligação com a membrana externa, LPS de bactérias gram-negativas, pela interação eletrostática e deslocamento de cátions, como cálcio (Ca^+) e magnésio (Mg^{2+}), do LPS, resultando na instabilidade na membrana e perda de conteúdo celular com consequente morte bacteriana (Falagas e Kasiakou, 2005; Lim *et al.*, 2010; Javan *et al.*, 2015).

Além da ação através da ligação direta com o LPS, a colistina possui atividade antiendotoxina potente, ou seja, há uma ação contra a porção do lipídeo A da molécula de LPS de bactérias gram-negativas, resultando em neutralização da endotoxina desses microrganismos (Falagas e Kasiakou, 2005; Javan *et al.*, 2015).

1.2.3.1 Resistência à colistina

O mecanismo de resistência cromossômico às polimixinas é através da modificação do lipídeo A, diminuindo a afinidade de ligação do antimicrobiano ao lipídeo A. Esse efeito ocorre devido a alterações na membrana externa produzidas por sistemas reguladores de dois componentes que incluem *pmrAB* e *phoPQ*, além

do regulador negativo *mgrB* encontrado em *K. pneumoniae* (Kempf *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2016; Bitrus *et al.*, 2018).

Há também a resistência mediada por plasmídeo, codificada por genes *mcr* (Monaco *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2016; Bitrus *et al.*, 2018). A proteína MCR-1, codificada pelo gene *mcr-1*, é membro da família da enzima fosfoetanolamina transferase. A resistência ocorre devido à transferência de fosfoetanolamina para o lípido A, resultando na diminuição da afinidade do alvo por diminuição da carga negativa do LPS (Liu *et al.*, 2016; Walkty *et al.*, 2016). O gene *mcr-1* foi descrito em bactérias da família Enterobacteriaceae a partir de amostras obtidas de animais, produtos animais, humanos e do ambiente em vários países nos cinco continentes (Wang *et al.*, 2017; Yin *et al.*, 2017). Até o ano de 2018, mais sete variantes da proteína MCR foram descritas: MCR-2 - MCR-8, todas isoladas a partir de origens agrícolas, com exceção do *mcr-8* que foi isolado de suíno e humanos (Yin *et al.*, 2017; Wise *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2018).

Em *E. coli* tem sido descrita a presença simultânea de genes *mcr* e genes que codificam a produção de ESBL e de carbapenemases, em amostras obtidas de infecções humanas e carne de frango. Essa coexistência compromete quase todas as opções de tratamento (Gao *et al.*, 2016; Walkty *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2017).

1.2.4 Antimicrobiano nitrofurantoína

A nitrofurantoína é um composto sintético que pertence ao grupo dos nitrofuranos e foi introduzida na prática clínica em 1952 (Shah e Wade, 1989; Munoz-Davila, 2014). Desde então, esse antimicrobiano é prescrito para o tratamento da ITU inferior, possuindo ação contra bactérias gram-positivas e gram-negativas que são patógenos do trato urinário (Huttner *et al.*, 2015).

Com a descoberta de novos antimicrobianos como os da classe dos beta-lactâmicos na década de 1970, a utilização da nitrofurantoína foi diminuída, retornando de forma intensa nos anos 2000, devido ao aumento da resistência a fármacos alternativos (Huttner *et al.*, 2015).

A nitrofurantoína é reduzida a metabólitos intermediários reativos através da ação das flavoproteínas ou nitrorredutases intracelulares bacterianas, que interagem com proteínas e o DNA, ocorrendo a inativação ou alteração das proteínas ribossômicas bacterianas e outras macromoléculas relacionadas, e a inativação do metabolismo aeróbico. Como consequência, fica interrompida a síntese do DNA, RNA,

a síntese proteica e o metabolismo de carboidratos (Shah e Wade, 1989; McOsker e Fitzpatrick, 1994; Moura *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2018).

As enzimas do tipo nitrorredutases podem ser de dois tipos: as que não possuem sensibilidade ao oxigênio (Tipo I), codificada pelos genes *nfsA* e *nfsB*, e as que possuem sensibilidade ao oxigênio (Tipo II), fazem parte das nitrorredutases em *E. coli*, as do tipo I, com pouca sensibilidade ao oxigênio (Zhang *et al.*, 2018).

1.2.4.1 Resistência a nitrofurantoína

A eficácia da nitrofurantoína já foi equivalente à do sulfametoxazol-trimtoprim, da ciprofloxacina e da amoxicilina para o tratamento de ITU inferior (Huttner *et al.*, 2015). Nesses dias há uma baixa frequência de resistência à nitrofurantoína; porém, devido a essa equivalência de eficácia com outros antimicrobianos que atualmente apresentam resistência elevada, houve um aumento no consumo de nitrofurantoína (Huttner *et al.*, 2015; Ho *et al.*, 2015, 2016).

Essa resistência ocorre principalmente por meio de mutações nos genes que codificam nitroredutases cromossômicas *nfsA* e *nfsB* (McCalla *et al.*, 1978; Whiteway *et al.*, 1998; Sandegren *et al.*, 2008), caracterizando uma resistência de alto nível, ou seja, conferindo valores de concentração inibitória mínima (CIM) elevadas da nitrofurantoína (Shakti e Veeraraghavan, 2015; Sekyere, 2018). Caso haja esse tipo de mutação, não haverá a redução do antimicrobiano, e conseqüentemente não haverá a formação de compostos intermediários tóxicos, impossibilitando a ação do antimicrobiano (Sekyere, 2018).

Há registros em ensaios laboratoriais de que uma deleção ou um conjunto de deleções no gene *ribE* aumentou os níveis de CIM em cepas mutantes, porém ainda não há registros dessas mutações em amostras clínicas (Vervoort *et al.*, 2014; Sekyere, 2018). O gene *ribE* codifica a enzima lumazina sintase, que atua na biossíntese de riboflavina, que é necessária para a produção do principal cofator das enzimas nitroredutases NfsA e NfsB, chamado de mononucleotídeo de flavina (Whiteway *et al.*, 1998)

Outro mecanismo de resistência a nitrofurantoína são as bombas de efluxo do OqxAB, codificada pelo gene *oqxAB*, mediado por plasmídeos (Hansen *et al.*, 2007). Essa bomba de efluxo pertence à família da divisão de nodulação por resistência (RND). Em *E. coli* a aquisição desse gene pode mediar resistência à nitrofurantoína ao ponto de influenciar no tratamento clínico (Ho *et al.*, 2016).

1.2.5 Antimicrobiano aminoglicosídeos

O antimicrobiano estreptomicina foi o primeiro da classe dos aminoglicosídeos a ser descoberto, em 1944 (Schatz e Waksman, 1944). Os aminoglicosídeos possuem efeito bactericida, com espectro de ação contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, micobactérias e protozoários, porém com potência maior contra agentes da família Enterobacteriaceae, podendo agir em sinergia com outros antimicrobianos (Kotra *et al.*, 2000; Durante-Mangoni *et al.*, 2009; Krause *et al.*, 2016).

Os antimicrobianos dessa classe são estreptomicina, tobramicina, neomicina e gentamicina derivados de outros microrganismos como *Streptomyces* spp. e *Micromonospora* spp. e os antimicrobianos sintetizados *in vitro* como amicacina, netilmicina, arbecacina e isepamicina, dentre outros (Durante-Mangoni *et al.*, 2009).

O mecanismo de ação dos aminoglicosídeos ocorre através da ligação, com alta afinidade, a porção aminoacílico (Sítio A) do RNA ribossômico 16S (rRNA) dentro do ribossomo 30S das bactérias, causando a inibição da síntese proteica e interrompendo a integridade celular bacteriana (Kotra *et al.*, 2000; Krause *et al.*, 2016). Isso ocorre através da indução da ruptura de pontes de magnésio entre lipolissacarídeos adjacentes (Shakil *et al.*, 2007). Porém os membros dessa classe podem ter diferentes especificidades quanto à ligação no sítio A do rRNA 16S (Hermann, 2007; Krause *et al.*, 2016).

Essa interação promove uma tradução incorreta, devido à leitura alterada do códon na entrega da transferência aminoacil do RNA (Krause *et al.*, 2016). O resultado é a síntese errônea de proteínas, ou a falha da agregação dos aminoácidos provenientes dessa síntese, o que pode causar danos à membrana celular bacteriana (Davis, 1987; Krause *et al.*, 2016).

1.2.5.1 Resistência aos aminoglicosídeos

Os mecanismos de resistência relacionados aos aminoglicosídeos são a diminuição da concentração do antimicrobiano, sua modificação ou inativação pela ação de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos, mutações no sítio A da porção 16S na subunidade 30S do rRNA ou modificações no alvo do antimicrobiano que são realizadas pela ação das metiltransferases (Magnet e Blanchard, 2005; Hermann, 2007; Shakil *et al.*, 2007; Doi *et al.*, 2016; Garneau-Tsodikova e Labby, 2016).

A diminuição da concentração do antimicrobiano se deve a mudanças na permeabilidade da membrana externa, diminuição do transporte da membrana interna e à presença de bombas de efluxo (Shakil *et al.*, 2007).

As enzimas modificadoras de aminoglicosídeos são, em sua maioria, codificadas em plasmídeos relacionados com outros genes de resistência, e têm como função principal a modificação química dos grupamentos amino ou hidroxila encontrados ao redor do núcleo do aminoglicosídeo, sendo divididos em três classes principais de acordo com o tipo de modificação, seja ela acetilação, fosforilação ou adenilação, caracterizando o nome das enzimas como acetiltransferases, fosfotransferases e nucleotidiltransferases, respectivamente (Shaw *et al.*, 1993; Ramirez e Tolmasky, 2010; Garneau-Tsodikova e Labby, 2016; Krause *et al.*, 2016).

A modificação do sítio alvo pode ocorrer através das mutações no ribossomo ou pelas modificações ribossômicas realizadas por enzimas específicas. Mutações na subunidade 30S podem ocorrer; porém, não são comuns, proporcionando uma maior resistência a aminoglicosídeos (Doi *et al.*, 2016).

As enzimas que modificam o sítio A localizado na porção 16S ribossômico são as 16S rRNA metiltransferases, naturalmente produzidas por actinomicetos, que possuem função de modificar os resíduos nucleotídicos específicos do rRNA com a finalidade de bloquear a ligação dos aminoglicosídeos ao seu alvo (Cundliffe, 1989; Doi e Arakawa, 2007; Doi *et al.*, 2016; Garneau-Tsodikova e Labby, 2016; Krause *et al.*, 2016).

Como a maioria dos genes de resistência, os genes que codificam as 16S rRNA metiltransferases podem ser transferidos a outras espécies bacterianas através da captação de plasmídeos e outros. Os principais genes que codificam esse tipo de resistência são *armA*, encontrado em *K. pneumoniae* (Galimand *et al.*, 2003), e *rmtA*, encontrado em *P. aeruginosa* (Yokoyama *et al.*, 2003). Porém já foram descritos outros, tais como *rmtB*, *rmtC*, *rmtD*, *rmtE*, *rmtF*, *rmtG*, *rmtH* e *nmpA* (Krause *et al.*, 2016; Takahashi e Igarashi, 2017).

1.2.6 Antimicrobiano sulfametoxazol e trimetoprim

As sulfonamidas e trimetoprim são antimicrobianos sintéticos que possuem a função de inibir diferentes etapas da síntese do ácido fólico, composto essencial para o crescimento bacteriano (Then, 1982; Poirel *et al.*, 2018).

As sulfonamidas são análogas estruturais do ácido para-aminobenzoico (PABA), um importante composto da via biossintética do ácido fólico (Sköld, 2001); sendo assim, inibem competitivamente a enzima diidropteroato sintase, que catalisa a condensação do PABA e pirofosfato de diidropteridina que forma o ácido diidropteroico, precursor do ácido fólico propriamente dito (Sköld, 2000, 2001; Smith e Powell, 2000).

O antimicrobiano trimetoprim pertence ao grupo de compostos diaminopirimidina, considerado um análogo estrutural do ácido fólico. Seu mecanismo de ação se dá através da inibição da enzima diidrofolato redutase (DHFR) que reduz diidrofolato a tetraidrofolato (Then, 1982; Sköld, 2001).

No final dos anos 1960, iniciou-se a utilização da combinação sinérgica de sulfonamidas com trimetoprim, sendo caracterizada a sulfonamida com potencial bacteriostático aumentado (Then, 1982; Smith e Powell, 2000; Poirel *et al.*, 2018).

1.2.6.1 Resistência às sulfonamidas e trimetoprim

Os mecanismos de resistência mais encontrados relacionados às sulfonamidas e trimetoprim são as mutações que modificam os genes que codificam as enzimas que são alvo dos antimicrobianos como a diidropteroato sintase, no caso das sulfonamidas e DHFR no caso do trimetoprim. Pode ser também através da aquisição de genes *sul* e genes *dfr*, sendo o primeiro gene codificador de outras enzimas diidropteroato sintase que não sofrem a ação das sulfonamidas e o segundo gene um codificador de enzimas DHFR que não sofrem a ação do trimetoprim (Poirel *et al.*, 2018; van Duijkeren *et al.*, 2018).

Há três variantes do genes *sul* já observadas em bactérias gram-negativas caracterizadas pelo desencadeamento de resistência de alto nível, sendo conhecidas como *sul1*, *sul2* e *sul3* (Recchia e Hall, 1995; van Duijkeren *et al.*, 2018; Poirel *et al.*, 2018). Os genes *sul1* e *sul2* são disseminados em amostras de *E. coli* obtidas a partir de várias espécies de animais, sendo o gene *sul1* encontrado em integrons de classe 1 (Recchia e Hall, 1995) e o gene *sul2* associado com genes de resistência a estreptomicina (Swedberg e Sköld, 1980). O gene *sul3* foi encontrado primeiramente em 2003, em plasmídeos conjugativos de amostras de *E. coli* isoladas de porcos na Suíça (Perreten e Boerlin, 2003).

Os genes *dfr* são classificados de acordo com sua estrutura nos grupos *dfrA* e *dfrB*. Cada grupo depende da quantidade de aminoácidos que compõe a enzima

DHFR codificada; o grupo *dfrA* codifica enzima DHFR com 152 a 189 aminoácidos e o grupo *dfrB*, apenas 78 aminoácidos (van Duijkeren *et al.*, 2018).

1.2.7 Antimicrobiano fosfomicina

Este antimicrobiano foi descoberto em 1969, produzido por espécies de *Streptomyces* spp., derivado do ácido fosfórico (Hendlin *et al.*, 1969; Falagas *et al.*, 2016). A fosfomicina é um dos antimicrobianos utilizados no tratamento de ITU caracterizadas como não-complicadas (Falagas *et al.*, 2018). Possui efeito bactericida, sendo ativo contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, como *P. aeruginosa*, e amostras de Enterobacteriaceae produtora de ESBL ou carbapenemases (Falagas *et al.*, 2010; Souli *et al.*, 2011).

O mecanismo de ação desse antimicrobiano é a inativação da etapa inicial da biossíntese da camada peptidoglicana da parede celular bacteriana, interferindo com a formação do precursor do peptidoglicano UDP ácido N-acetilmurâmico (UDPMurNAc), ou seja, ocorre a inibição da enzima que catalisa essa formação, N-acetilglicosamina enolpiruvil transferase citosólica (MurA). Ao impedir a formação do precursor, ocorre perda da integridade da camada de peptidoglicana, lise e morte celular (Hendlin *et al.*, 1969; Kahan *et al.*, 1974; Falagas *et al.*, 2010; Sastry e Doi, 2016; Falagas *et al.*, 2016, 2018).

A fosfomicina faz uso de dois mecanismos de transporte para entrar em contato com o interior da célula bacteriana: um sistema constitutivo de absorção de glicerol-3-fosfato (GlpT) e um sistema de transporte de hexose-monofosfato (UhpT) (Zhanel *et al.*, 2016). O mecanismo de transporte de GlpT é encontrado na maioria das cepas sensíveis (Silhavy *et al.*, 1976; Sastry e Doi, 2016) e o sistema UhpT, induzido pela glicose-6-fosfato, é utilizado como forma alternativa (Kahan *et al.*, 1974).

1.2.7.1 Resistência à fosfomicina

O espectro de ação deste antimicrobiano é amplo, incluindo bactérias gram-positivas e negativas, e cepas menos susceptíveis à tigeciclina e colistina; porém, já foi observado que os microrganismos desenvolvem rapidamente resistência à fosfomicina quando este antimicrobiano é utilizado em monoterapia (Ellington *et al.*, 2006; Souli *et al.*, 2011).

A resistência à fosfomicina desenvolve-se rapidamente por mutações cromossômicas nos genes que codificam sistemas de captação usados como meio de entrada do antimicrobiano na célula bacteriana (Tsuruoka *et al.*, 1978; Falagas *et al.*, 2016).

Essas mutações ocorrem nos genes estruturais ou nos seus reguladores que codificam os transportadores de membrana GlpT e UhpT, que possuem função de transportar glicerol e outros carboidratos necessários para funções metabólicas e virulência de bactérias (Falagas *et al.*, 2018). Outra mutação ocorre no alvo da fosfomicina, a enzima MurA, gerando a substituição de aminoácidos (Falagas *et al.*, 2016).

Outro mecanismo de resistência frequente são as enzimas modificadoras de fosfomicina, as metaloenzimas e enzimas do tipo quinase, que podem ser adquiridas em genes codificados em plasmídeos. As enzimas Fos são metaloenzimas, pertencentes à superfamília da glioxalase, que inativam a fosfomicina através da sua conjugação com a molécula glutationa ou com outro nucleófilo (Zhanel *et al.*, 2016). As principais metaloenzimas são FosA, FosB e FosX. As enzimas do tipo quinases são as FomA e FomB (Silver, 2017; van Duijkeren *et al.*, 2018).

1.3 Disseminação da resistência aos antimicrobianos

A resistência a antimicrobianos em organismos patogênicos para o ser humano tornou-se um problema mundialmente estabelecido, resultando em graves consequências em ambientes clínicos, como no tratamento de doenças infecciosas, e também em ecossistemas ambientais (Courvalin, 2005; Martínez e Baquero, 2014; Shaikh *et al.*, 2015; Frieri *et al.*, 2017).

O uso de antimicrobianos na medicina humana, veterinária e na agricultura, seja na horticultura ou aquicultura, contribui para o aumento e a disseminação da resistência (Yezli e Li, 2012; Shaikh *et al.*, 2015; Qiao *et al.*, 2018). Essa utilização exerce pressão seletiva, determinando que uma linhagem resistente tenha vantagem competitiva sobre outras no mesmo nicho (Riley, 2014). Assim, linhagens resistentes se tornam cada vez mais bem sucedidas.

A maior frequência das viagens internacionais também contribui consideravelmente para a ocorrência desse fenômeno, pois facilita o carreamento de bactérias resistentes e com elas os elementos genéticos móveis contendo genes de resistência para regiões longínquas (Arcilla *et al.*, 2014, 2017). Além das viagens a

turismo ou a trabalho, tem-se também a importação de alimentos, como frango cru e carne, relacionados com disseminação de bactérias MR (Warren, Ensor, *et al.*, 2008; Botelho *et al.*, 2015), como a introdução de estirpes produtoras de CTX-M em alimentos importados, que podem colonizar a microbiota e causar ITU (Warren, Harvey, *et al.*, 2008).

A disseminação de bactérias resistentes para humanos, seja a partir das diversas fontes ambientais ou animais, podendo ocorrer por contato direto ou através da ingestão de produtos alimentares como carnes (Mulder *et al.*, 2018; Muloi *et al.*, 2018) ou lavouras contaminadas via água ou solo (Lazarus *et al.*, 2015), podendo facilitar a transferência de bactérias resistentes e seus determinantes de resistência (Lipsitch *et al.*, 2002; Chang *et al.*, 2015; Muloi *et al.*, 2018).

Outro cenário relacionado com a disseminação da resistência são os clones dominantes que causam ITU na comunidade. Essas infecções ocorrem como surtos com esses genótipos, observando-se uma distribuição local ou global de determinadas linhagens mais resistentes (Yamaji *et al.*, 2018).

Outro importante fator de disseminação de genes de resistência ou bactérias MR são as águas costeiras com influxo de esgoto. Essas águas poluídas atuam tanto como reservatórios quanto como facilitadoras do carreamento dessas bactérias tornando esses ambientes aquáticos potenciais veículos de bactérias resistentes para aqueles que frequentam as praias (Montezzi *et al.*, 2015).

1.3.1 Microbiota intestinal e suas mudanças frente ao uso de antimicrobianos, viagens e diarreia dos viajantes

A microbiota intestinal é composta por um ecossistema com alta complexidade e extremamente denso e diverso (Gerritsen *et al.*, 2011; Candela *et al.*, 2015). Esses microrganismos são caracterizados como membros residentes, aqueles que compõem a microbiota de forma permanente e aqueles que compõem de forma transiente ou transitório, introduzidos pelo ambiente (Gerritsen *et al.*, 2011).

Essa diversidade de espécies na microbiota intestinal é muito importante e tem a função de proteção e sustentação do equilíbrio microbiano (Qin *et al.*, 2010; Sommer *et al.*, 2017). A microbiota intestinal em equilíbrio funciona como uma barreira contra a colonização por microrganismos potencialmente patogênicos entéricos (Sullivan *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2017).

Muitos fatores podem influenciar na composição da microbiota intestinal incluindo exposições ambientais, higiene, fatores culturais, como a dieta de determinada região, e uso de antimicrobianos (Lozupone *et al.*, 2012). As alterações na composição da microbiota intestinal e diminuição da diversidade bacteriana estão relacionados com o estado chamado disbiose, esse estado de disbiose da microbiota está associado com o surgimento de diversas doenças, como obesidade, síndrome do intestino irritável e doença inflamatória do intestino (Youmans *et al.*, 2015).

A antibioticoterapia afeta não apenas as bactérias patogênicas, mas influencia também os microrganismos comensais presentes na microbiota normal do intestino (Jernberg *et al.*, 2010). As consequências do uso de antimicrobianos para a microbiota são várias, como: desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos pela microbiota residente e a potencial transferência de genes para outras bactérias, a expansão das bactérias patogênicas nessa microbiota, a diminuição e a perda da diversidade microbiana transitória ou residente, perda do número de espécies microbianas, aumento da propensão à infecções e risco de recorrência (Ianiro *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2017).

Os estudos relacionados às viagens mostram que nessa situação ocorrem modificações nos padrões de resistência das bactérias presentes na microbiota intestinal (Gaarslev e Stenderup, 1985; Bengtsson-Palme *et al.*, 2015). Nas viagens, o microbioma dos viajantes entra em contato com vários cenários como a dieta, infecções, estresse, antimicrobianos, caso o viajante utilize e uma nova forma de ecossistema, assim como o contato dele com outros indivíduos (Riddle e Connor, 2016).

A consequência da aquisição de colonização intestinal por microrganismos MR por parte dos viajantes é que a microbiota se torna um reservatório, podendo levar à infecção do hospedeiro, transmissão horizontal a outras pessoas e transferência dos genes de resistência a outras bactérias (Woerther *et al.*, 2013; Lübbert *et al.*, 2015).

Os estudos sobre acompanhamento individual de viajantes após o retorno demonstram que a aquisição é considerada transitória (Kennedy e Collignon, 2010; Tängdén *et al.*, 2010; Paltansing *et al.*, 2013; Lübbert *et al.*, 2015; Riddle e Connor, 2016). Essa transitoriedade dura até até 6 meses (Hassing *et al.*, 2015; Ruppé *et al.*, 2015), porém, durante esse tempo, essa bactéria pode entrar em contato com outros indivíduos (Kantele *et al.*, 2015).

A maioria dos viajantes que retornam com bactérias MR são portadores assintomáticos, sendo o microrganismo eliminado em algumas semanas ou poucos meses. Porém, uma pequena parte desses viajantes pode desenvolver uma infecção e tornar-se carreador sintomático, ao mesmo tempo que essas cepas podem ser transmitidas a outras pessoas, membros da família ou aqueles com contato próximo, podendo o microrganismo chegar ao ambiente hospitalar (Kantele *et al.*, 2015; Ruppé *et al.*, 2015; Kuenzli, 2016; Ruppé *et al.*, 2018).

1.3.2 Os viajantes e a disseminação da resistência

As viagens e o viajante possuem um papel importante para a disseminação de bactérias resistentes, já que microrganismos MR, uma vez importados e disseminados em um determinado local, não são observados, apenas são notados quando começam a causar danos. Quando isso acontece, a capacidade de descobrir e solucionar ou minimizar os danos causados é diferente para cada país ou continente (Okeke e Edelman, 2001).

Muitos são os casos de introdução e transmissão internacional de microrganismos resistentes como *S. aureus* resistente à metilina, *Streptococcus pneumoniae*, *Mycobacterium tuberculosis* e enterobactérias, como é o caso de *E. coli* produtora de ESBL e produtora de carbapenemases (Okeke e Edelman, 2001; Zhou *et al.*, 2014). Muitos estudos acerca de viajantes demonstraram a aquisição de bactérias MR nessas viagens (Wilson, 2003).

As viagens internacionais são consideradas fontes de colonização quando indivíduos se deslocam de países com baixas frequências de carreamento de *E. coli* produtora de ESBL para locais com altas frequências (Murray *et al.*, 1990; Woerther *et al.*, 2013). Essa aquisição ocorre por diferentes fatores como a comida local, água ou a própria transmissão nosocomial e a pressão seletiva dos antimicrobianos (Hassing *et al.*, 2015; Murray e Blyth, 2017).

Um exemplo relacionado com a introdução de enterobactérias produtoras de carbapenemases em um novo local foi o caso da NDM-1, impulsionado pelo uso de antimicrobianos e disseminado rapidamente por viagens internacionais em todos os continentes (Barlam e Gupta, 2015). Esse problema teve início em 2007 quando um sueco de origem indiana viajou para a Índia no final desse mesmo ano e por ter apresentado um abscesso foi internado em hospital local, medicado com antimicrobianos e uma nova cirurgia foi realizada. Quando o indivíduo retornou ao seu

país, culturas de amostras fecais foram realizadas sendo recuperadas amostras de *K. pneumoniae* e *E. coli* produtoras de uma metalo-beta-lactamase, em 2009 caracterizada como NDM-1 (Yong *et al.*, 2009; Wilson e Chen, 2012).

Muitos dos casos que se seguiram foram de pacientes da América do Norte, Europa e Austrália previamente colonizados com bactérias produtoras de NDM hospitalizados anteriormente no subcontinente indiano (Nordmann *et al.*, 2011), incluindo emergências e turistas submetidos a cirurgia estética e outros procedimentos (van der Bij e Pitout, 2012).

Outra carbapenemase que teve sua disseminação acelerada pelas viagens foi KPC, encontrada principalmente em *K. pneumoniae*. A sua introdução em várias regiões do mundo ocorreu devido ao carreamento por paciente internacional (Rogers *et al.*, 2011). O primeiro caso de *K. pneumoniae* resistente a carbapenema e produtor de KPC-1 foi detectado em 1996 na Carolina do Norte, nos EUA.

O primeiro caso de amostra de *K. pneumoniae* produtora de KPC na América do Sul ocorreu em Medellín, na Colômbia, em um paciente que veio de Israel para ser submetido a um transplante de fígado (Lopez *et al.*, 2011). Amostras de *K. pneumoniae* produtora de KPC provenientes da França e de Israel têm uma ligação epidemiológica e genética com a linhagem americana, pois a primeira detecção de *K. pneumoniae* produtora de KPC fora dos EUA foi na França. Esses clones eram semelhantes aos encontrados nos EUA, o que evidencia o quanto a transferência e o carreamento das cepas são feitos por via intercontinental (Perez e Van Duin, 2013) e o quanto as viagens fizeram e fazem parte da disseminação de microrganismos resistentes.

A primeira descrição da carbapenemase do tipo OXA-48 foi na Turquia em 2001 (Poirel *et al.*, 2004). O primeiro foco de transmissão foi no norte da África e muitos pacientes colonizados oriundos de países na África e da Turquia se deslocaram para a Europa, ocasionando uma transferência intercontinental desta carbapenemase (Poirel, Ros, *et al.*, 2011; López-Cerero e Almirante, 2014). Muitos dos casos que se seguiram envolveram pacientes que foram anteriormente hospitalizados e tratados em países do Oriente Médio e do norte da África (Seiffert *et al.*, 2014).

1.3.3 Pesquisa da disseminação da resistência através das viagens internacionais

O transporte aéreo e terrestre vem crescendo consideravelmente nos últimos anos, o que possibilita a viagem de pessoas para diferentes países e continentes de

maneira rápida, seja como turistas, imigrantes, refugiados ou trabalhadores migrantes (van der Bij e Pitout, 2012), além de viajantes que vão para determinado local com o objetivo de tratamento médico internacional (Rogers *et al.*, 2011). Tem ocorrido um aumento significativo no número de viajantes, inclusive partindo do Brasil, que embarcam em viagens a longo prazo e ao redor do mundo (Rodrigues e Moreira, 2018).

Os viajantes possuem uma importância no “ecossistema” mundial de resistência aos antimicrobianos, o que é justificado pela sua atuação no carregamento de bactérias de uma região para outra em todo o mundo (Kantele *et al.*, 2015). A disseminação de amostras de Enterobacteriaceae MR relacionada a viagens internacionais tornou-se mais evidente a partir de 2007 (Paltansing *et al.*, 2013).

Vários fatores podem desencadear risco de aquisição de bactérias resistentes em viagens, tais como: viagens para locais com maior frequência de bactérias MR, doenças intestinais, como a diarreia dos viajantes e outras gastroenterites, além da utilização de antimicrobianos.

Os viajantes com destino para países em desenvolvimento desempenham um importante papel na disseminação de resistência a antimicrobianos, pois adquirem bactérias MR em sua microbiota intestinal, que são carregadas durante as viagens e introduzidas em seus países de origem (Vila, 2015). Essa aquisição pode acontecer através do contato com alimentos, água ou indivíduos do próprio local, podendo ser facilitada através da exposição a antimicrobianos (Hassing *et al.*, 2015; Murray e Blyth, 2017; van der Bij e Pitout, 2012).

Viagens internacionais para áreas e países com alta endemicidade de bactérias MR, onde há uso de antimicrobianos, ou ainda países em desenvolvimento, de baixa renda e com saneamento precário, são fatores importantes para que viajantes tornem-se portadores de bactérias produtoras de ESBL (von Wintersdorff *et al.*, 2014; Yaita *et al.*, 2014; Vila, 2015; Ruppé *et al.*, 2018)

A aquisição de colonização por bactérias produtoras de ESBL tem sido descrita em intensidade variável. Por exemplo, em viagem para o sul da Ásia, a frequência de aquisição varia de 46 a 85%, e no Sudeste Asiático é cerca de 70%. Após permanência no Oriente Médio ou Norte da África, a colonização ocorre em 13% a 44%, ou ainda na América Latina, em 0% a 31%. Em locais com baixa aquisição de bactérias resistentes, como na Europa ou na América do Norte, a aquisição de

bactérias produtoras de ESBL é estimada em menos de 10% dos viajantes (Woerther *et al.*, 2013; Barreto Miranda *et al.*, 2016; Vading *et al.*, 2016; Ruppé *et al.*, 2018).

Além da região geográfica, a ocorrência de gastroenterite e diarreia dos viajantes, a presença de doença intestinal crônica e a utilização de antimicrobianos durante a viagem são considerados fatores de risco que predispõem à aquisição de amostras de Enterobacteriaceae produtoras de ESBL (Hassing *et al.*, 2015; Kantele *et al.*, 2015; Vila, 2015; Ruppé *et al.*, 2018). A diarreia dos viajantes acontece quando há ingestão de alimentos contaminados, podendo ocorrer numa incidência de 10% a 40% dependendo do hospedeiro (Langford e Schwartz, 2018).

1.3.4 Aquisição de bactérias multirresistentes após viagens

A principal bactéria da família Enterobacteriaceae adquirida durante viagens em regiões endêmicas é *E. coli* com resistência a antimicrobianos, principalmente as produtoras de ESBL (Peirano *et al.*, 2017).

Muitas regiões, como Sudeste Asiático, Mediterrâneo Oriental e Pacífico Ocidental são caracterizadas por elevada prevalência de carreamento comunitário de Enterobacteriaceae MR, em sua maioria *E. coli* (Woerther *et al.*, 2013; Hassing *et al.*, 2015).

O tipo de ESBL mais comumente encontrado na microbiota de viajantes saudáveis que retornaram de regiões de risco é CTX-M, principalmente CTX-M15, presente em 54 a 80% dos indivíduos que se tornam colonizados por ESBL. Esse fenômeno pode estar relacionado à boa adaptação dos genes que codificam essa ESBL em *E. coli* e à sua disseminação principalmente em países em desenvolvimento (van der Bij e Pitout, 2012; Peirano *et al.*, 2011, 2017; Ruppé *et al.*, 2018). Os principais estudos que avaliaram a aquisição de bactérias produtoras de ESBL estão citados na Tabela 1.

Tabela 1 - Aquisição de bactéria produtora de ESBL por viajantes que se dirigiram a países fora da América do Sul descrita em estudos publicados a partir de 2010 (continua)

Região de origem	Região de aquisição	Bactéria resistente encontrada	N (%) de viajantes que adquiriram	Total no local de aquisição (total no estudo)	Referência
Suécia	África	<i>E. coli</i> ; CTX-M 15	1 (4)	25 (100)	Tängdén <i>et al.</i> , 2010
	Ásia	<i>E. coli</i> ; CTX-M 15, 9, 14, 27	10 (32)	31	
	Índia	<i>E. coli</i> ; CTX-M 15	7 (88)	8	
	Oriente Médio	<i>E. coli</i> ; CTX-M 15, 9	4 (29)	14	
	América do Norte/Central	Nenhuma	0	8	
Austrália	Europa	<i>E. coli</i> ; CTX-M 9	5 (23)	21 (102)	Kennedy e Collignon, 2010
	América do Norte	<i>E. coli</i> ; CTX-M 9, TEM, SHV	3 (30)	10	
	Ásia/Pacífico	<i>E. coli</i> ; CTX-M 1, 9, TEM, SHV, pAmpC	29 (51)	56	
	China / Hong Kong / Taiwan / Coreia	<i>E. coli</i> ; CTX-M 9	11 (68)	16	
Suécia	Japão	Nenhuma	0	7	Östholm-Balkhed <i>et al.</i> , 2013
	África	<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> ; CTX-M 15,14,1,3, SHV, pAmpC	28 (27)	101 (231)	
	Ásia	<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> ; CTX-M 15,14,27,53, SHV, pAmpC	26 (44)	58	
	Subcontinente indiano	<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> ; CTX-M 15,14, TEM, pAmpC	10 (71)	14	
	Austrália/Oceania/América do Norte/ Europa	Nenhuma	0	33	
Holanda	Sudeste Asiático	E; CTX-M 1,3,15,32, CTX-M 9,2,8/25, SHV, pAmpC	37 (33)	110 (370)	Paltansing <i>et al.</i> , 2013
	Leste da Ásia		22 (66)	33	
	Sul da Ásia		18 (72)	25	
	Ásia Central		1 (33)	3	
	Norte da África		4 (40)	10	
	África Central		17 (30)	56	
	África do Sul		3 (11)	26	
	Oriente Médio		2 (13)	15	
	América Central/Caribe		7 (25)	28	
	Holanda	Sul da Ásia	E; CTX-M 1,2,9	6 (21)	
Subcontinente indiano		E; CTX-M 1,9,8/25	20 (64)	31	
Norte da África		E; CTX-M 1,9,8/25	5 (31)	16	
África do Sul		E; CTX-M 1,8/25	5 (29)	17	
Sul da Europa		E; CTX-M 2	1 (16)	6	
América Central		Nenhuma	0	4	
Alemanha	Índia	E; CTX-M 15	59 (86)	68 (170)	Kuenzli <i>et al.</i> , 2014
	Butão		11 (78)	14	
	Nepal		31 (79)	39	
	Sri Lanka		17 (34)	49	
	África do Norte	<i>E. coli</i> ; CTX-M15,3,27, SHV5	5 (12)	40 (457)	
Espanha	Leste da África	Nenhuma	-	40	Sole <i>et al.</i> , 2014
	África Ocidental	<i>E. coli</i> ; CTX-M15	10 (16)	63	
	África Central	<i>E. coli</i> ; CTX-M15,27	3 (21)	14	
	África do Sul	<i>E. coli</i> ; CTX-M15,9	2 (22)	9	
	América Central	<i>E. coli</i> ; CTX-M15,14, SHV5	4 (9)	41	
	Sul da Ásia	<i>E. coli</i> ; CTX-M15,14, SHV5,12,27	51 (36)	142	
	Sudeste asiático	<i>E. coli</i> ; CTX-M15,14, SHV12	3 (7)	40	
França	África Sub-saariana	<i>E. coli</i> ; CTX-M 1, pAmpC	89 (48)	182 (574)	Ruppé <i>et al.</i> , 2015
	Ásia		114 (73)	155	

E: enterobactéria; pAmpC: beta-lactamase do tipo AmpC plasmidial; N: número

Tabela 1 continuação - Aquisição de bactéria produtora de ESBL por viajantes que se dirigiram a países fora da América do Sul descrita em estudos publicados a partir de 2010

Região de origem	Região de aquisição	Bactéria resistente encontrada	N (%) de viajantes que adquiriram	Total no local de aquisição (total no estudo)	Referência
Alemanha	Índia	<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> ; CTX-M 15, 27, SHV-12	14 (93)	15 (191)	Lübbert <i>et al.</i> , 2015
	Ásia (outros países)	<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> ; CTX-M 15, 55, 14,27,SHV-12	18 (23)	76	
	África	<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> ; CTX-M15, 55, 14	18 (23)	78	
	América Central/Caribe	<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> ; CTX-M 15	1 (6)	15	
	Sul da Europa	<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> ; CTX-M 15	1 (12)	8	
Finlândia	América do Norte	Nenhuma	0	2	Kantele <i>et al.</i> , 2015
	Sul da Ásia	E; CTX-M 1,9, TEM	28 (45)	61 (430)	
	Sudeste Asiático		33 (32)	101	
	Leste Ásia		2 (33)	6	
	Norte da África/ Oriente Médio		4 (33)	12	
Alemanha	África subsaariana		23 (11)	193	Barreto Miranda <i>et al.</i> , 2016
	América do Norte/ Europa/ Austrália	Nenhuma	0	17	
	Subcontinente indiano	<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> ; CTX-M 1,9, SHV	6 (40)	96 (211)	
Japão	Sudeste da Ásia continental	<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> ; CTX-M 1,9, SHV	23 (58)	55	Mizuno <i>et al.</i> , 2016
	África	<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> ; CTX-M 1, TEM	9 (34)	27	
	Ásia	E; CTX-M 15, 14, 27	29 (60)	48 (135)	
Suíça	África Sub-saariana	E; CTX-M 15, 14, 27	11 (25)	43	Vading <i>et al.</i> , 2016
	Norte da África/Oriente Médio	E; CTX-M 15	11 (52)	21	
	Oceania	E; CTX-M 27	1 (33)	3	
	América Central	Nenhuma	0	6	
	Sudeste Asiático	<i>E. coli</i> ; CTX-M 1, 9, CMY II	13 (19)	68 (188)	
Canadá	Subcontinente indiano	<i>E. coli</i> ; CTX-M 1, 9, CMY II, SHV	30 (49)	61	Peirano <i>et al.</i> , 2017
	Norte da África	<i>E. coli</i> ; CTX-M 1, 9, SHV	11 (44)	25	
	Turquia	<i>E. coli</i> ; CTX-M 1	2 (9)	21	
	Índia	<i>E. coli</i> ; CTX-M 15, TEM 26, 52, SHV 2, 5	66	90 (116)	
Holanda	Nepal	<i>E. coli</i> ; CTX-M 15	2	9	Arcilla <i>et al.</i> , 2017
	Paquistão/Bangladesh	<i>E. coli</i> ; CTX-M 15	2	2	
	Sri Lanka	Nenhuma	0	8	
	Sul da Ásia	<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> ; CTX-M 15	136 (75)	181 (2001)	
	Ásia Central e Oriental		41 (48)	84	
	Ásia Ocidental		12 (42)	28	
	Norte da África		34 (41)	81	
	Sudeste da Ásia		200 (37)	540	
	América Central/Caribe		24 (27)	86	
	África Central e Oriental		57 (27)	205	
França	África Ocidental		20 (18)	106	Lorme <i>et al.</i> , 2018
	África do Sul		7 (6)	116	
	América do Norte, Europa e Oceania		1 (5)	17	
	África Sub-saariana	E; CMY-2, 42, DHA	10 (20)	195 (574)	
	Ásia	E; CMY-2, 6, 2m, 42, 42m	14 (29)	184	

E: enterobactéria; pAmpC: beta-lactamase do tipo AmpC plasmidial; N:número

A viagem internacional também é fator de risco para aquisição de amostras produtoras de carbapanemases (Sole *et al.*, 2014; van der Bij e Pitout, 2012). Porém a proporção de viajantes que retornam com bactérias produtoras de ESBL é maior do que aqueles que retornam com bactérias produtoras de carbapanemases (Paltansing *et al.*, 2013; Kuenzli *et al.*, 2014; Hassing *et al.*, 2015; Arcilla *et al.*, 2017; Ruppé *et al.*, 2018). Os estudos relacionados a aquisição de bactérias produtoras de carbapanemases estão listados na Tabela 2.

Tabela 2 - Aquisição de bactéria produtora de carbapanemases por viajantes que se dirigiram a países fora da América do Sul

Região de origem	Região de aquisição	Bactéria resistente encontrada	N (%) de viajantes que adquiriram	Total no local de aquisição (total no estudo)	Referência
Alemanha	Índia	<i>E. coli</i> ; NDM-1	1 (2)	68 (170)	Kuenzli <i>et al.</i> , 2014
França	Índia	<i>E. coli</i> ; OXA-181, NDM-1	3 (5)	57 (574)	Ruppé <i>et al.</i> , 2015
Holanda	Egito/EUA	<i>E. coli</i> ; OXA-48	1 (8)	12 (1695)	Reuland <i>et al.</i> , 2016
Holanda	Indonésia/Myanmar	<i>E. coli</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> ; OXA-244, NDM-1, IMI-2	3 (1)	226 (2001)	van Hattem <i>et al.</i> , 2016
	Turquia/Grécia	<i>K. pneumoniae</i> ; OXA-48	1 (6)	16	
	China/Tailândia/Vietnã	<i>E. coli</i> ; NDM-1	1 (0,5)	192	

N: número

As viagens internacionais também podem estar associadas à aquisição de bactérias carreadoras de genes *qnr*, de resistência plasmidial às fluorquinolonas (von Wintersdorff *et al.*, 2014). Quanto aos genes *mcr*, de resistência transferível à colistina, viajantes internacionais podem atuar como portadores, transferindo bactérias com o gene para os países de onde partiram, podendo transferir genes e expandir novos microrganismos MR por meio das fronteiras (Nakayama *et al.*, 2018). Os estudos relacionados à aquisição desses outros genes de resistência como *qnr* e *mcr*, e as frequências de resistência a antimicrobianos não beta-lactâmicos, estão demonstrados na Tabela 3 e Tabela 4, respectivamente.

Tabela 3 - Aquisição de bactéria portadoras de genes *qnr* e *mcr* por viajantes que se dirigiram a países fora da América do Sul.

País de origem	Região de aquisição	Bactéria resistente encontrada	N (%) de viajantes que adquiriram	Total no local de aquisição (total no estudo)	Referência
Alemanha	Sul da Ásia	E; <i>qnrB</i> , <i>qnrS</i>	28	28 (122)	von Wintersdorff <i>et al.</i> , 2014
	Subcontinente indiano		29	31	
	Norte da África		12	16	
	África do Sul		11	17	
	Europa/América		9	16	
Holanda	Tailândia e Vietnã	E; <i>mcr-1</i>	3	Não informado (122)	von Wintersdorff <i>et al.</i> , 2016
	Indonésia		1		
Suíça	Tanzânia		1		Vading <i>et al.</i> , 2016
	Sudeste Asiático	<i>E. coli</i> ; <i>qnrS</i> e <i>B. aac(6')-Ib-CR</i>	9	15 (67)	
	Subcontinente indiano	<i>E. coli</i> ; <i>qnrS</i> e <i>B. aac(6')-Ib-CR</i>	23	36	
	Norte da África	<i>E. coli</i> ; <i>qnrS</i> e <i>B</i>	2	12	
	Turquia	-	-	2	
	Tailândia	<i>E. coli</i> ; <i>mcr-1</i>	1	Não informado	
Holanda	Tailândia, Vietnã, Camboja, Laos	<i>E. coli</i> ; <i>mcr-1</i>	1 (0,8)	125 (2001)	Arcilla <i>et al.</i> , 2017
	Tunísia		1	Não informado	
	China		2 (3)	67	
Japão	Vietnã	<i>E. coli</i> ; <i>mcr-1</i>	3 (15)	19 (175)	Nakayama <i>et al.</i> , 2018

E: enterobactéria; *qnr*: genes que codificam resistência às quinolonas; *mcr*: genes que codificam resistência a colistina.

Tabela 4 - Frequência de resistência a antimicrobianos não-betalactâmicos dentre amostras produtoras de ESBL adquiridas após viagens.

Total de amostras ESBL	% de amostras resistentes ao antimicrobiano indicado entre amostras produtoras de ESBL no estudo						Referência
	CIP	GEN	AMI	SUT	NIT	FOS	
113	36	35	-	67	29	-	Paltansing <i>et al.</i> , 2013
68	31	41	2	70	7	3	Östholm-Balkhed <i>et al.</i> , 2013
118	41	-	5	49	2	1	Kuenzli <i>et al.</i> , 2014
58	43	17	2	83	-	16	Lübbert <i>et al.</i> , 2015
67	40	30	8	58	-	-	Vading <i>et al.</i> , 2016
70	82	58	6	85	-	-	Peirano <i>et al.</i> , 2017
277	77	19	5	53	-	10	Lorme <i>et al.</i> , 2018

ESBL: betalactamase de espectro estendido; CIP: ciprofloxacino; GEN: gentamicina; AMI: amicacina; SUT: sulfametoxazol+trimetoprim (cotrimoxazol); NIT: nitrofurantoína; FOS: fosfomicina

1.3.4.1 Aquisição de Enterobacteriaceae multirresistente em viajantes que se dirigem para a América do Sul

Poucos estudos avaliaram a aquisição de microrganismos resistentes em viajantes que tiveram como seu destino a América do Sul, ou fornecem dados sobre aquisição no Brasil. Estes estudos são citados na Tabela 5. Outros estudos avaliaram a aquisição de Enterobacteriaceae produtora de ESBL por viajantes internacionais com destino para a América do Sul, sem especificação do país, porém em nenhum deles foi encontrada amostra produtora de ESBL após o retorno desses viajantes para a região de origem (Kantele *et al.*, 2015; Blyth *et al.*, 2016).

Tabela 5 - Aquisição de bactéria resistente por viajantes que se dirigiram à América do Sul com especificação ou não sobre Brasil

Bactéria resistente ou marcador de resistência encontrado	Região de origem	Região de aquisição	N viajantes que adquiriram (% de aquisição)	Total para AS ou Brasil (total no estudo)	Referência
<i>E. coli</i> ; GEN, CIP ou CEFA de 3º geração E; ESBL	Austrália	AS ou México	3 (60)	5 (102)	Kennedy e Collignon, 2010
	Holanda	AS	2 (6)	32 (370)	Paltansing <i>et al.</i> , 2013
<i>E. coli</i> ; CTX-M 15, 2, pAmpc	Suécia	AS	5 (17)	29 (231)	Östholm-Balkhed <i>et al.</i> , 2013
<i>E. coli</i> ; CTX-M 15,14 E; ESBL, CMY-2, DHA	Espanha	AS	4 (9)	43 (457)	Sole <i>et al.</i> , 2014
	França	Brasil	15 (34)	44 (574)	Ruppé <i>et al.</i> , 2015
<i>E. coli</i> ; CTX-M 1 E; ESBL	Alemanha	AS	3 (14)	21 (211)	Barreto Miranda <i>et al.</i> , 2016
	Japão	AS	3 (33)	9 (135)	Mizuno <i>et al.</i> , 2016
<i>E. coli</i> ;mcr-1 E; ESBL	Holanda	AS	2 (1)	180 (2001)	Arcilla <i>et al.</i> , 2016
	Holanda	Brasil	2 (8)	25 (2001)	Arcilla <i>et al.</i> , 2017

GEN: gentamicina; CIP: ciprofloxacina; CEFA: cefalosporina; E: enterobactéria; ESBL: beta-lactamase de espectro estendido; pAmpC: beta-lactamase do tipo AmpC plasmidial; AS: América do Sul

Como fica evidente, o incremento das viagens internacionais aéreas e terrestres fomentou a interação entre populações distantes. Um efeito dessa interação foi a disseminação de resistência aos antimicrobianos, que ocorre por meio da aquisição de colonização intestinal ou infecção por microrganismos resistentes ou que carregam genes de resistência. Esse é um assunto que precisa ser melhor explorado em viajantes que partem do Brasil.

2 JUSTIFICATIVA

Os estudos mostram a relevância das viagens internacionais em relação à aquisição de colonização intestinal por microrganismo resistente. Esses estudos têm sido realizados por viajantes que partem de países desenvolvidos, tais como França, Holanda, Alemanha, Japão, dentre outros. Até os dias atuais, não houve publicação sobre viajantes que partem do Brasil tendo como destino outros países. No entanto, são muitos os viajantes que partem do Brasil para viagens internacionais (Rodrigues e Moreira, 2018). O destino desses viajantes frequentemente inclui regiões para as quais são descritas elevadas frequências de aquisição de bactérias da família Enterobacteriaceae MR. A resistência a antimicrobianos é um problema grave no Brasil, estando disseminada entre pacientes admitidos em hospitais, na comunidade e no meio ambiente. A descrição do impacto de viagens nesse cenário seria enriquecedora para o conhecimento e controle da resistência no Brasil e no mundo.

E. coli é um microrganismo presente na microbiota intestinal e com grande capacidade de adquirir genes de resistência. A pesquisa de colonização por *E. coli* resistente tem sido uma ferramenta útil para indicar a aquisição de marcadores de resistência por viajantes. A existência de uma clínica para aconselhamento de viajantes afiliada à Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) fornece uma oportunidade única para a investigação desse problema.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Determinar a frequência de aquisição de colonização por *Escherichia coli* MR por viajantes atendidos no Centro de Medicina dos viajantes da UFRJ (CIVES), incluindo amostras produtoras de ESBL, carbapenemases, carreadoras de genes que codificam PMQR e resistência plasmidial à polimixina (*mcr*).

3.2 Metas

Organizar uma coleção de amostras de *E. coli* provenientes da microbiota intestinal de viajantes antes da partida para viagens e após seu retorno;

Determinar a susceptibilidade aos antimicrobianos, produção de ESBL, de carbapenemases, presença de genes que codificam resistência plasmidial a fluorquinolonas e polimixina;

Classificar as amostras como MR de acordo com os perfis de resistência;

Determinar a aquisição de bactéria resistente por meio da comparação das amostras de *E. coli* presentes antes e depois da viagem;

Classificar as amostras de acordo com o grupo filogenético e as multirresistentes por meio da amplificação aleatória de DNA polimórfico (RAPD);

Explorar potenciais associações de destino, uso de agentes antimicrobianos e a ocorrência de diarreia durante a viagem com colonização por amostra de *E. coli* produtora de ESBL e MR.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Desenho do estudo

O recrutamento dos viajantes foi realizado durante o período de 2015 a 2018. Viajantes com mais de 18 anos de idade atendidos em um dos postos do Centro de Informações em Saúde para Viajante (CIVES) no Rio de Janeiro da UFRJ foram convidados a participar no estudo.

O CIVES é o primeiro serviço especializado em medicina de viagem criado na América Latina e no Brasil, implantado em março de 1997 na UFRJ. O CIVES presta atendimentos individuais para viajantes, além de consultorias a empresas e para tropas brasileiras enviadas em missões no exterior (Martins et al., 2005).

Depois do fornecimento das informações, o participante foi orientado a coletar espécime de fezes com auxílio de um *swab* anal antes da viagem. Após o retorno, os viajantes foram contactados para responder algumas questões sobre destino, duração da viagem, ocorrência de sintomas intestinais, uso de agentes antimicrobianos e hospitalização, conforme o questionário disponível no Anexo 1 e Anexo 2 (questionário após o retorno), e um novo *swab* anal foi coletado dentro de uma semana depois do retorno. O espécime foi enviado ao Laboratório de Investigação em Microbiologia Médica (LIMM) no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, no Centro de Ciências da Saúde na UFRJ para seu processamento. A identificação da amostra foi feita através de um código.

No presente estudo, foi investigada a aquisição de colonização por *E. coli* produtora de ESBL e MR por meio da comparação entre a sua presença antes e depois da viagem. Foram também investigadas potenciais variáveis associadas a essa aquisição. Essas variáveis foram idade, sexo, escolaridade, doenças de base, e destino da viagem, entre outras.

4.2 Definições adotadas no estudo

As regiões de destino correspondem à África subssariana, Sudeste Asiático, Subcontinente indiano, América do Sul com turismo de altitude, América do Sul sem turismo de altitude, África do Norte, Ilhas do pacífico, Oceania, Europa, Ásia, América do Norte, América Central, Ásia Central e Oriente Médio. Para os participantes que visitaram mais de uma região de destino foi considerada a aquisição na região em que

o mesmo permaneceu por um período de tempo maior. Os países correspondentes a cada região estão listados no Quadro 1 abaixo:

Quadro 1 - Descrição dos países correspondentes aos continentes de destino dos viajantes

Região de destino	Países
África subsaariana	Angola, África do sul, Benin, Botswana, Cabo verde, Congo, Costa do Marfim, Etiópia, Gana, Guiné Bissau, Ilhas Maurícius, Madagascar, Malawi, Moçambique, Namíbia, Níger, Nigéria, Quênia, República Centro Africana, Ruanda, São Tomé e Príncipe, Senegal, Sudão, Swazilândia, Tanzânia, Togo, Uganda, Zâmbia, Zanzibar, Zimbábue
Sudeste Asiático	Cambódia, Laos, Mianmar, Tailândia, Vietnã
Subcontinente indiano	Índia
América do Sul turismo de altitude	Bolívia, Chile, Peru
América do Sul	Amazônia Legal, Argentina, Brasil, Colômbia, Equador, Venezuela
África do Norte	Egito, Marrocos
Ilhas do Pacífico	Filipinas, Indonésia, Papua Nova Guiné
Oceania	Austrália, Nova Zelândia
Europa	Alemanha, Espanha, França, Inglaterra, Polónia, Portugal,
Ásia	Butão, China, Cingapura, Coreia do Sul, Japão, Malásia, Nepal, Turquia, Timor Leste
América do Norte	Estados Unidos, México
América Central	Costa Rica, Cuba, Haiti, Honduras, Panamá
Ásia Central	Uzbequistão
Oriente Médio	Afganistão, Emirados Árabes, Irã, Israel, Líbano, Qatar

Para computar aquisição de amostra de *E. coli* produtora de ESBL ou MR foram considerados apenas os viajantes que apresentavam amostra de *E. coli* sem evidência de produção de ESBL e cujo antibiograma não evidenciou perfil compatível com MR na amostra antes da viagem. Os viajantes cuja amostra de *E. coli* obtida antes da viagem foi produtora de ESBL e MR não foram incluídos no cálculo de frequência de aquisição.

4.3 Fluxograma do trabalho

A seguir está demonstrado o fluxograma do trabalho nas principais etapas do estudo (Figura 1).

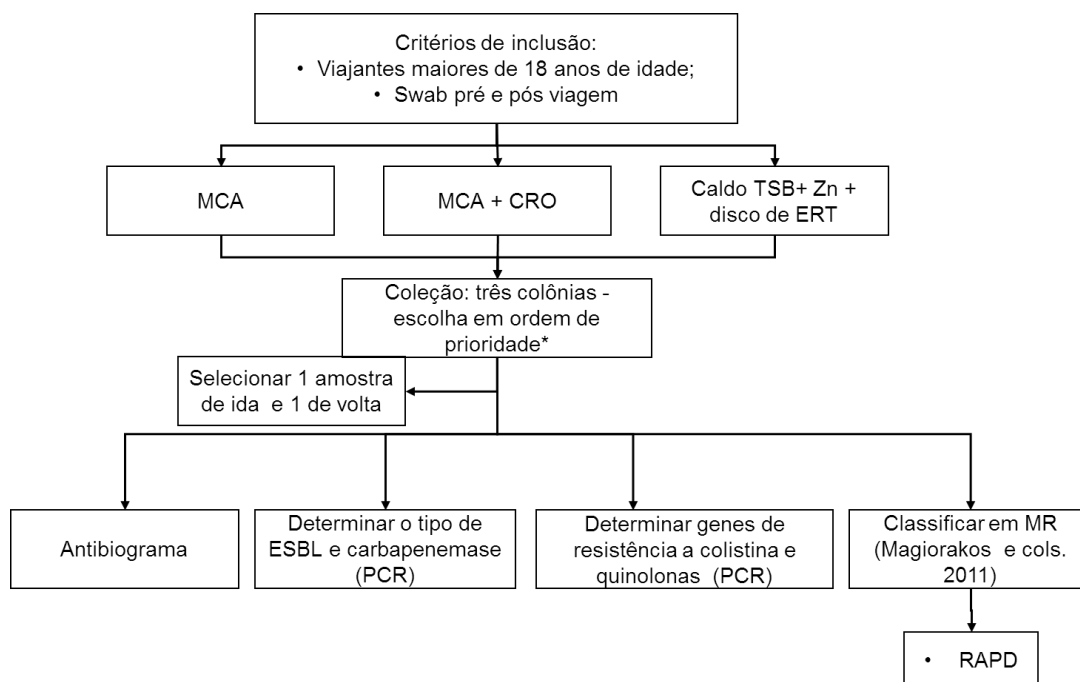


Figura 1 - Fluxograma das principais etapas de trabalho das amostras dos viajantes

*Ordem de prioridade: foram selecionadas as amostras que cresceram em meio ágar MacConkey contendo ceftriaxona e nas quais a produção de ESBL foi confirmada por visualização da distorção do halo em teste de dupla difusão; quando não houve crescimento, as três colônias foram selecionadas do meio sem antimicrobiano. MCA: meio de ágar MacConkey; CRO: ceftriaxona; TSB: caldo tripton de soja; Zn: zinco; ERT: ertapenem; ESBL: beta-lactamase de espectro estendido; MR: multirresistente. RAPD: tipificação da amostra por meio de amplificação randômica polimórfica do DNA.

4.4 Processamento do espécime fecal para pesquisa de *E. coli*

No L IMM, a ponta do *swab* contendo o espécime a ser analisado foi transferida para um microtubo contendo 1mL da solução *skim milk* (leite desnatado), tripton, glicose, e glicerina (STGG). O frasco contendo STGG e a ponta do *swab* (STGG-S) foram agitados em vórtex para liberação dos microrganismos aderidos ao *swab* e alíquotas dessa solução foram utilizadas nas etapas seguintes de identificação e isolamento de *E. coli*, conforme descrito a seguir. O restante do STGG-S foi armazenado a -20°C para análises adicionais de repetição ou confirmação.

4.4.1 Isolamento do microrganismo

Alíquotas do meio STGG contendo o *swab* anal foram novamente passadas no vórtex e posteriormente semeadas em três diferentes sistemas, a fim de possibilitar o

crescimento da bactéria e obter indicativos da presença de resistência a antimicrobianos beta-lactâmicos e carbapenemas, como descrito nos itens subsequentes.

4.4.2 Semeadura em meio de ágar MacConkey

Alíquota de 20 µL foi semeada pela técnica de esgotamento em placa contendo ágar MacConkey (MCA), promovendo o crescimento de enterobactérias sem pressão seletiva de antimicrobianos. As culturas foram incubadas a 35 ± 2 °C por 18 a 24 horas e identificadas.

Após identificação de colônias de *E. coli*, as mesmas foram isoladas em ágar triptona de soja (TSA). Quando foi confirmada a presença de *E. coli* (como descrito adiante) as amostras foram transferidas para um microtubo contendo 1mL de *skim milk* a 10% (p/v) e glicerol a 10% (v/v) e armazenadas a -20°C para compor a coleção.

4.4.3 Semeadura em meio ágar MacConkey contendo ceftriaxona

Outra alíquota de 20 µL foi semeada em placa com MCA contendo ceftriaxona (CRO, 2µg/ mL), para pesquisa de *E. coli* produtora de ESBL. As culturas foram incubadas a 35 ± 2 °C por 18 a 24 horas e identificadas em seguida.

As colônias confirmadas como *E. coli* e consideradas suspeitas de produção de ESBL foram submetidas ao teste fenotípico de produção de ESBL. As amostras positivas foram isoladas em TSA e armazenadas.

4.4.4 Crescimento em caldo contendo ertapenem

Para pesquisa de *E. coli* produtora de carbapenemases foi realizada a transferência de 50 µL da alíquota para o meio enriquecido seletivo caldo triptona de soja (TSB, do inglês *trypticase soy broth*), contendo sulfato de zinco (70µg/ mL) e um disco de ertapenem (ERT, 10µg) e a cultura foi incubada a 35 ± 2 °C por 18 a 24 horas. Quando houve turvação no caldo TSB com disco de ERT, uma alíquota de 30µL foi semeada pela técnica de esgotamento em placa contendo ágar MacConkey e incubada a 35 ± 2 °C por 18 a 24 horas e as amostras identificadas.

Colônias que foram confirmadas como *E. coli* (como descrito no item a seguir) tiveram a resistência ao carbapenema detectada através da técnica de disco difusão com ertapenem. O diâmetro do halo foi medido e interpretado conforme orientações do *Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2018). As amostras intermediárias

ou resistentes foram consideradas suspeitas de produção de carbapenemases. As amostras suspeitas de produção de carbapenemase foram isoladas em TSA e armazenadas.

4.4.5 Identificação do microrganismo

Após o término do tempo estabelecido de incubação, foram selecionadas três colônias características de *E. coli* em cada meio, ou seja, colônias apresentando formas lisas e rugosas, sendo as colônias lisas convexas e brilhantes com bordas regulares e as rugosas com aspecto e aparência grosseiras com contornos irregulares. Essas amostras foram identificadas por *matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight*, conhecido pela sigla MALDI-TOF-MS (Bruker Daltonics®).

Nessa técnica uma pequena quantidade da amostra a ser identificada foi aplicada em uma placa para MALDI-TOF-MS com o auxílio de um palito de madeira, sendo essa identificação realizada em duplicata. Em cada poço já com a amostra, foi pipetado 1 µL de ácido fórmico (Sigma®) a 70%, para extrair as proteínas, após a secagem completa, foi pipetado 1 µL de ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA, Bruker®) como matriz de calibração. Para calibração do equipamento foi aplicada amostra de *E. coli* ATCC® 25922 nos dois últimos poços da placa, sendo realizado os mesmos procedimentos que foram explicados anteriormente. Após secagem completa da placa, a mesma foi inserida no aparelho primeiramente para calibração da *E. coli* ATCC® 25922 e posterior a calibração foi feita a identificação das demais amostras. Para confirmação da identificação da espécie *E. coli* foram considerados scores maiores ou iguais a 2,3. Quando confirmada a presença de *E. coli*, as amostras foram armazenadas.

Foram armazenadas pelo menos três colônias isoladas a partir do espécime obtido antes da viagem e três colônias obtidas do espécime após o retorno por participante e por ordem de prioridade; ou seja, as amostras foram selecionadas de acordo com o seu crescimento em meio com pressão seletiva, na presença de antimicrobianos. Quando não houve crescimento nesses meios, as três colônias foram selecionadas do meio sem antimicrobiano. Para os itens que se seguem, foram selecionadas uma amostra antes e após a viagem de cada participante para o teste de susceptibilidade aos antimicrobianos e grupo filogenético. Para a técnica de RAPD foram selecionadas amostras MR e seu par respectivo.

4.5 Testes fenotípicos para detecção de resistência

4.5.1 Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos

O teste de susceptibilidade aos antimicrobianos foi realizado com duas amostras de *E. coli* de um mesmo participante, sendo uma amostra anterior e outra posterior a viagem. Em todos os casos priorizou-se as amostras que cresceram em meio com antimicrobiano, como especificado no item 4.4.3. As análises foram realizadas de acordo com as recomendações do CLSI.

As amostras previamente recuperadas como descrito anteriormente foram semeadas em placa contendo ágar TSA e incubadas em estufa por 24 horas a 35 ± 2 °C. Foi preparada suspensão com essas amostras em tubo contendo 2 mL de solução salina (NaCl) em uma concentração de 0,85% em turvação similar à da escala 0,5 de McFarland. O inóculo foi semeado com o auxílio de um *swab* estéril em uma placa contendo Ágar Mueller Hinton em quatro direções por toda a superfície, com a finalidade de obtenção de um crescimento bacteriano uniforme.

Depois da secagem da semeadura, foram aplicados os discos selecionados a uma distância mínima de 24 mm de centro a centro entre cada antimicrobiano. As culturas foram incubadas por 16 a 18 horas a 35 ± 2 °C. Após esse período, os diâmetros dos halos foram medidos e interpretados de acordo com as informações contidas no CLSI e classificadas como resistentes, intermediários ou sensíveis. O controle de qualidade do teste de susceptibilidade foi realizado com as amostras *E. coli* ATCC® 25922, *P. aeruginosa* ATCC® 27853 e *E. coli* ATCC® 35218.

Os discos de antimicrobianos utilizados no teste foram: amicacina (AMI) 30 µg, amoxicilina com ácido clavulânico (AMC) 20/10 µg, ampicilina (AMP) 10 µg, cefazolina (CFZ) 30 µg, cefepima (CPM) 30 µg, cefotaxima (CTX) 30 µg, cefoxitina (CFO) 30 µg, ceftazidima (CAZ) 30 µg, cefuroxima (CRX) 30 µg, ciprofloxacina (CIP) 5 µg, ertapenem (ERT) 10 µg, fosfomicina (FOS) 200 µg, gentamicina (GEN) 10 µg, nitrofurantoína (NIT) 300 µg, e sulfametoxazol-trimetoprim (SUT) 1,25/23,75 µg.

As amostras identificadas como *E. coli* e suspeitas de produção de ESBL foram avaliadas em testes fenotípicos, como descrito a seguir.

4.5.2 Produção de beta-lactamases de espectro estendido

As amostras suspeitas de ESBL foram submetidas à técnica de disco-aproximação (Jarlier *et al.*, 1988). Em uma placa com ágar Mueller Hinton, foi

depositado o disco contendo AMC (inibidor de beta-lactamase), no centro, e ao redor, os beta-lactâmicos CPM, CAZ e CTX, a 20 mm de distância, centro a centro. O teste foi considerado positivo quando houve distorções no halo de inibição ou a formação de uma zona fantasma entre os beta-lactâmicos e o inibidor, indicando sinergismo.

4.5.3 Definições de amostra multirresistente

A classificação das amostras como MR foi baseada no resultado do teste de susceptibilidade aos antimicrobianos (Quadro 2). Essa classificação se deu a partir da definição proposta por Magiorakos *et al.* (2011) acrescida da nitrofurantoína. As amostras foram consideradas MR quando apresentavam perfil intermediário ou de resistência a pelo menos um agente em três ou mais categorias de antimicrobianos. As amostras produtoras de ESBL foram consideradas MR automaticamente.

Quadro 2 – Antimicrobianos utilizados na classificação das amostras multirresistentes

Categoria de antimicrobiano	Agente antimicrobiano
Aminoglicosídeos	Gentamicina ou amicacina
Carbapenemas	Ertapenem
Cefalosporinas de 1 ^a e 2 ^a geração	Cefazolina ou cefuroxima
Cefalosporinas de 3 ^a e 4 ^a geração	Cefotaxima ou ceftazidima ou cefepime
Cefamicinas	Cefoxitina
Fluroquinolonas	Ciprofoxacina
Inibidores da via de folato	Sulfametoxazol-trimetoprim
Penicilinas	Ampicilina
Penicilinas + inibidor de beta-lactâmicos	Amoxicilina+ácido clavulânico
Ácidos Fosfônico	Fosfomicina
Polimixinas	Colistina
Nitrofuranos	Nitrofurantoína*

Fonte: Magiorakos e cols (2011). *Antimicrobiano não incluído na proposta de Magiorakos e cols.

4.6 Liberação do DNA bacteriano e eletroforese

Para as etapas que incluem a tipificação e pesquisa dos determinantes de resistência que foram realizados através de reações de PCR, foi utilizado o material genético bacteriano das amostras de *E. coli* previamente identificadas. As amostras foram semeadas em ágar TSA e incubadas por 18 a 24 horas a 35 ± 2 °C. A liberação do DNA bacteriano foi feita através da suspensão dessa colônia que foi transferida para um microtubo contendo 100µL de água destilada autoclavada, após a

transferência a suspensão foi agitada vigorosamente em vórtex e subsequente utilização em reações de PCR. Quando não foram utilizadas em seguida, o material foi armazenado a -20°C.

Para observação dos perfis de bandas formados para cada amostra, a eletroforese foi realizada em gel de agarose a 1% (Invitrogen®) em tampão tris-borato EDTA (TBE) 0,5X (1X – 89 mM tris, 89 mM ácido bórico e 0,05 M EDTA [pH 8,2]) corado com brometo de etídio a 0,5 µg/mL (Sigma®), por no máximo 100 volts por 45 minutos. As imagens dos géis foram obtidas com o auxílio do ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare Life Sciences®).

4.7 Pesquisa de genes que codificam beta-lactamases

4.7.1 Beta-lactamases de espectro estendido do tipo CTX-M

Em todas as amostras produtoras de ESBL, foi determinado o gene que codifica esta enzima. Foram pesquisados genes que codificam ESBL do tipo CTX-M em reação de PCR multiplex. Os iniciadores, os alvos e os tamanhos esperados dos amplicons estão descritos na Tabela 6.

A reação tem volume final de 20 µL e para cada amostra foi utilizado 10µL de Master Mix (Promega®), 1 µL de cada iniciador (10 pmol/µL), 1 µL de DNA e 3µL de água sem DNAase.

Tabela 6 – Iniciadores utilizados para amplificação de sequências de DNA correspondentes a genes que codificam betalactamases de espectro estendido na PCR multiplex

Alvo	Nome do iniciador	Sequência (5'- 3')	Tamanho do produto (pb)
<i>bla</i> _{CTX-M1,2}	CTX-1e2F	ATGTGCAGYACCGTAA	512
	CTX-1e2R	CGCTGCCGGTTTTATCSCCC	
<i>bla</i> _{CTX-M-8}	CTX-8 F	GGTGACAAAGAGARTGCAACGGAT	333
	CTX-8 R	TTACAGCCCTTCGGCGATGA	
<i>bla</i> _{CTX-M-9}	CTX-9 F	AACRCRCAGACGCTCTAC	876
	CTX-9 R	TCGAGCCGGAASGTGTAT	

Protocolo formulado pelo LIMM; Picão, 2016; pb: pares de bases

As etapas da reação foram as seguintes: etapa inicial de desnaturação de 95 °C por 10 minutos; seguida de 30 ciclos de amplificação de 95 °C por 30 segundos, 54 °C por 30 segundos e 72 °C por 45 segundos e uma etapa de extensão final de 72 °C por 10 minutos. A eletroforese foi realizada de acordo com a descrição do item 4.6. Os controles utilizados nessa reação foram *E. coli bla*_{CTX-M15} C19, *E. coli bla*_{CTX-M-8} C15 e *E. cloacae bla*_{CTX-M-9} C18.

4.7.2 Identificação das variantes enzimáticas dos grupos CTX-M

Foi realizada PCR simplex para cada amostra correspondente ao fragmento amplificado no PCR multiplex para CTX-M apresentado no item anterior. Quando confirmada a presença desse gene e discriminação do grupo de CTX-M, foi realizada a técnica de PCR utilizando os iniciadores correspondentes descritos na Tabela 7 (Wang *et al.*, 2012).

Essas sequências amplificadas foram enviadas para sequenciamento na empresa MacroGen (Coreia). Para um volume final de 25µL, foi utilizado para cada amostra 12µL de Master Mix 1 µL de cada iniciador (10 pmol/µL), 2µL de DNA e 2µL de água sem DNAase.

Tabela 7 - Iniciadores utilizados para amplificação de fragmentos dos genes que codificam betalactamases de espectro estendido de grupos CTX-M na PCR simplex

Alvo	Iniciador	Sequência (5' - 3')	Tamanho do produto (pb)
<i>bla</i> _{CTX-M-1}	CTX-1F	TGTTATTTTCGTCTCTTTTCAG	926
	CTX-1R	CATTCCCTTTCCGCTATTAC	
<i>bla</i> _{CTX-M-2}	CTX-2F	GAAGGCCGAGGGATAATAC	986
	CTX-2R	GTTGCAAGACAAGACTGAAG	
<i>bla</i> _{CTX-M-8}	CTX-8 F	CAGGAGTTTGAGATGATGAG	910
	CTX-8 R	GAGCGCTCCACATTTTTTTAG	
<i>bla</i> _{CTX-M-9}	CTX-9 F	CGTATTGGGAGTTTGAGATG	907
	CTX-9 R	TTCAACAAAACCAGTTACAG	

Wang *et al.*, 2012; pb: pares de bases

A reação para amplificação de fragmentos dos genes *bla*_{CTX-M-1} e *bla*_{CTX-M-9} foi realizada por uma etapa inicial de desnaturação de 94 °C por 3 minutos; seguida de 35 ciclos de amplificação de 94 °C por 30 segundos, 51 °C por 1 minuto e 72 °C por 2 minutos; e uma etapa de extensão final de 72 °C por 5 minutos.

A reação para amplificação dos genes *bla*_{CTX-M-2} e *bla*_{CTX-M-8} foi realizada com os seguintes parâmetros: etapa de amplificação de 94°C por 3 minutos, seguida de 35 ciclos de amplificação de 94 °C por 30 segundos, 56 °C por 1 minuto e 72 °C por 2 minutos. A eletroforese para visualização do produto amplificado foi realizada como descrito no item 4.6. Como controle, foram utilizadas as amostras *E. coli bla*_{CTX-M-15} C19, *E. coli bla*_{CTX-M-2}C14, *E. coli bla*_{CTX-M-8} C15 e *E. cloacae bla*_{CTX-M-9} C18.

4.7.3 Beta-lactamases do tipo AmpC plasmidial

Foi realizada uma reação de PCR multiplex para pesquisa de genes que codificam AmpC plasmidial para as amostras resistentes à CFO e AMC no teste de susceptibilidade aos antimicrobianos. Os iniciadores estão listados na Tabela 8 (Pérez-Pérez e Hanson, 2002). Para um volume final de 20µL, foi utilizado para cada amostra 10µL de Master Mix, 0,6µL dos iniciadores MOX, CIT e DHA F/R (20µM), 0,5 µL dos iniciadores ACC e EBC F/R (20µM), 0,4µL do iniciador FOX F/R (20µM), 1µL de DNA e 2,6µL de água sem DNAase.

Tabela 8 - Iniciadores utilizados para amplificação de fragmentos de genes que codificam betalactamases do tipo AmpC plasmidial

Alvo	Iniciador	Sequência (5'- 3')	Tamanho do produto (pb)
<i>bla_{MOX-like}</i> e <i>bla_{CMY-1-like}</i>	MOX-F	GATCGGATTGGAGAACCAGA	520
	MOX-R	ATTTCTGACCGCATTTCAT	
<i>bla_{LAT-like}</i> e <i>bla_{CMY-2-like}</i>	CIT-F	GGTTAGTTGGCCCCCTTAAA	462
	CIT-R	AGTTGAGCGAAAAGGGGATT	
<i>bla_{DHA-like}</i>	DHA-F	TAATGCTTTGATCGGCCTTG	405
	DHA-R	TGGATTGCACTTCATCTTGG	
<i>bla_{ACC-like}</i>	ACC F	AAGTATTGGGGCTTGTGCTG	346
	ACC R	TTCGCCGCAATCATCCCTAGC	
<i>bla_{MIR}</i> e <i>ACT</i>	EBC-F	TCGGTAAAGCCGATGTTGCGG	302
	EBC-R	CTTCCACTGCGGCTGCCAGTT	
<i>bla_{FOX-like}</i>	FOX-F	AACATGGGGTATCAGGGAGATG	190
	FOX-R	CAAAGCGCGTAACCGGATTGG	

Pérez-Pérez, Hanson, 2002; pb: pares de bases

A reação foi realizada com uma etapa inicial de desnaturação de 94 °C por 3 minutos; seguida de 25 ciclos amplificação de 94 °C por 30 segundos, 64 °C por 30 segundos e 72 °C por 60 segundos; e uma etapa de extensão final de 72 °C por 7 minutos. A eletroforese para visualização do produto amplificado foi realizada como descrito no item 4.6. Como controle, foram utilizadas as amostras *E. coli* PHPI-5 *bla_{CIT-like}*, *M. morgani* *DHA-1 bla_{DHA-like}*, *H. alvei* *ACC bla_{ACC-like}*, *E. coli* C600R96D *bla_{EBC-like}* e *E. coli* 200 *bla_{FOX-like}*.

4.7.4 Beta-lactamases do tipo carbapenemase

As amostras que foram intermediárias ou resistentes a ertapenem no teste de susceptibilidade foram caracterizadas quanto à presença de genes que codificam carbapenemases por meio da reação de PCR multiplex e quatro reações de PCR simplex. Os iniciadores, os alvos e os tamanhos esperados dos amplicons estão descritos na Tabela 9 (Poirel *et al.*, 2004; Hossain *et al.*, 2004; Mendes *et al.*, 2007; Poirel *et al.*, 2011).

Todas as reações de PCR tiveram um volume final de 10 µL, sendo 5 µL de Master Mix (Promega®), 1 µL de cada iniciador (10pmol/µL), 1 µL de DNA e o restante de água sem DNase.

Tabela 9 – Iniciadores utilizados para amplificação de fragmentos de genes que codificam betalactamases do tipo carbapenemases

Alvo	Iniciador	Sequência (5'- 3')	Tamanho do produto (pb)
<i>bla_{GIM}</i>	GIM F ¹	TCAATTAGCTCTTGGGCTGAC	72
	GIM R ¹	CGGAACGACCATTTGAATGG	
<i>bla_{IMP}</i>	IMP F ¹	GAATAGRRTGGCTTAAYTCTC	188
	IMP R ¹	CCAAACYACTASGTTATC	
<i>bla_{VIM}</i>	VIM F ¹	GTTTGGTCGCATACGCAAC	382
	VIM R ¹	AATGCGCAGCACCAGGATAG	
<i>bla_{SIM}</i>	SIM F ¹	GTACAAGGGATTTCGGCATCG	569
	SIM R ¹	TGGCCTGTTCCCATGTGAG	
<i>bla_{SPM}</i>	SPM-1 F ¹	CTAAATCGAGAGCCCTGCTTG	798
	SPM-1 R ¹	CCTTTTCCGCGACCTTGATC	
<i>bla_{NDM}</i>	NDM F ²	GGTTTGGCGATCTGGTTTTTC	621
	NDM R ²	CGGAATGGCTCATCACGA TC	
<i>bla_{OXA}</i>	OXA-48 F ³	TTGGTGGCATCGATTATCGG	743
	OXA-48 R ³	GAGCACTTCTTTTGTGATGGC	
<i>bla_{GES}</i>	GES F ⁴	AGCAGCTCAGATCGGTGTTG	750
	GES R ⁴	CCGTGCTCAGGATGAGTTG	
<i>bla_{KPC}</i>	KPC F ⁵	GCTACACCTAGCTCCACCTTC	762
	KPC R ⁵	TGGAGGGCCAATAGATGATT	

¹ Mendes *et al.*, 2007 ² Poirel *et al.*, 2011 ³ Poirel *et al.*, 2004 ⁴ Picão, 2016 ⁵ Hossain *et al.*, 2004; pb:pares de bases

Para os genes *bla_{GIM}*, *bla_{IMP}*, *bla_{VIM}*, *bla_{SIM}*, *bla_{SPM}*, os parâmetros de amplificação foram os que se seguem: desnaturação inicial de 94 °C por 10 minutos; seguida por uma etapa de 35 ciclos de 94 °C por 20 segundos, 53 °C por 45 segundos e 72 °C por 1 minuto; e uma etapa de extensão final de 72 °C por 5 minutos.

Para o gene *bla_{NDM}* os parâmetros foram: etapa de desnaturação inicial de 95 °C por 10 minutos; seguida por uma etapa de 35 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 54 °C por 30 segundos e 72 °C por 30 segundos; e uma etapa de extensão final de 72 °C por 10 minutos.

Para *bla_{OXA}* foi utilizada uma etapa de desnaturação inicial de 95 °C por 10 minutos; seguida por uma etapa de 35 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 54 °C por 30 segundos e 72 °C por 1 minuto; e uma etapa de extensão final de 72 °C por 10 minutos.

Para *bla_{GES}* foi realizada uma etapa de desnaturação inicial de 95 °C por 10 minutos; seguida por uma etapa de 30 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 54 °C por 30 segundos e 72 °C por 45 segundos; e uma etapa de extensão final de 72 °C por 10 minutos.

Para *bla_{KPC}* foi realizada uma etapa de desnaturação inicial de 94 °C por 10 minutos; seguida por uma etapa de 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 54 °C por 1 minuto e 72 °C por 1 minuto; e uma etapa de extensão final de 72 °C por 10 minutos.

Os controles utilizados na reação foram: *K. pneumoniae bla_{IMP-1}* C25, *P. aeruginosa bla_{SPM}* C27, *A. pittii bla_{SIM-1}* C24, *P. aeruginosa bla_{VIM}* C29, *P. aeruginosa bla_{GIM}* C28, *K. pneumoniae bla_{NDM}* C26, *K. pneumoniae bla_{KPC}* C05, *K. pneumoniae bla_{GES-16}* C02, e *Raoultella ornithinolytica bla_{OXA-48}* C01.

4.8 Identificação dos genes que codificam resistência às fluorquinolonas

Foi realizada PCR multiplex para pesquisa dos genes que conferem resistência plasmidial às fluorquinolonas nas amostras que foram consideradas intermediárias ou resistentes à CIP no teste de susceptibilidade aos antimicrobianos.

A reação para pesquisa dos genes *qnrD*, *qnrVC*, *qnrC*, *qnrB*, *qnrS*, *qnrA* teve como volume final 20 µL e consistiu de 10 µL de Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA), 0,5 µL dos iniciadores *qnrA*, *qnrS*, *qnrC*, *qnrD* (10 µM), 1 µL do iniciador *qnrB* e 1,5 µL do iniciador *qnrVC* e 1 µL de DNA. A reação para pesquisa dos genes *aac(6')-Ib* e *qepA* teve volume final de 10 µL e consistiu de 5 µL de Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA), 0,5 µL de cada iniciador, 2 µL de água sem DNAase e 1 µL de DNA. Os iniciadores, os alvos e os tamanhos esperados dos amplicons estão descritos na Tabela 10.

Tabela 10 - Iniciadores utilizados para a detecção dos genes *qnrVC*, *qnrC*, *qnrB*, *qnrS*, *qnrA*, *qnrD*, *aac(6')-Ib* e *qepA*

Gene	Iniciador	Sequência (5' - 3')	Tamanho do amplicon (bp)
<i>qnrD</i>	QnrDm-F ¹	AGGTGTAGCATGTATGGAAAAGC	691
	QnrDm-R ¹	ACATTGGGGCATTAGGCGTT	
<i>qnrA</i>	QnrAm-F ¹	AGAGGATTTCTCACGCCAGG	580
	QnrAm-R ¹	TGCCAGGCACAGATCTTGAC	
<i>qnrS</i>	QnrSm-F ¹	GCAAGTTCATTGAACAGGGT	428
	QnrSm-R ¹	TCTAAACCGTTCGAGTTCGGCG	
<i>qnrB</i>	QnrBm-F ¹	GGMATHGAAATTCGCCACTG	264
	QnrBm-R ¹	TTTGCYGYCYGCCAGTCGAA	
<i>qnrC</i>	QnrCm-F ¹	GCGAATTTCCAAGGGGCAA	135
	QnrCm-R ¹	ACCCGTAATGTAAGCAGAGCAA	
<i>qnrVC</i>	QnrVCm-F ¹	GAGYTKTATGGTTTAGAYCCTCG	72
	QnrVCm-R ¹	TGTTCTGTGTCGCCACGARCA	
<i>aac(6')-Ib</i>	Aac(6')-Ib-F ²	TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA	482
	Aac(6')-Ib-R ²	CTCGAATGCCTGGCGTGTTT	
<i>qepA</i>	QepA-F ³	GCAGGTCCAGCAGCGGGTAG	199
	QepA-R ³	CTTCCTGCCCGAGTATCGTG	

¹ Kraychete *et al.* (2016); ² Park *et al.*(2006); ³ Yamane *et al.* (2008); pb: pares de bases

As etapas da reação foram constituídas de ciclo inicial de desnaturação a 95 °C por 10 minutos, seguido por 25 ciclos de 95 °C por 45 segundos, etapa de anelamento a 58 °C por 45 segundos e alongamento a 72 °C por 15 segundos e um ciclo final de alongamento a 72 °C durante 3 minutos. A eletroforese para visualização do produto amplificado foi realizada como descrito no item 4.6, com uma preparação de gel de agarose a 2%. Os controles utilizados para essas reações foram: *E. cloacae qnrS*, *E. cloacae qnrB*, *E. coli qnrA*, *Salmonella enterica qnrC*, *S. enterica qnrD*, *Vibrio cholerae qnrVC1*, *E. coli qepA* e *K. pneumoniae aac(6')-Ib*.

4.9 Identificação de genes que codificam resistência transferível à colistina

As amostras que foram classificadas como MR e seus respectivos pares de amostras de ida ou volta foram submetidas à técnica de PCR multiplex para pesquisa dos genes *mcr 1* ao *mcr 5*. Os iniciadores, os alvos e os tamanhos esperados dos amplicons estão descritos na Tabela 11 (Rebelo *et al.*, 2018).

Cada reação consistiu de 12,5 µL do Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA), 5,5 µL de água sem DNAase, 0,5 µL de cada iniciador (10 µM) e 2 µL do DNA.

Tabela 11 - Iniciadores utilizados para amplificação de fragmento dos genes *mcr-1* ao *mcr-5*

Alvo	Nome do iniciador	Sequência (5'- 3')	Tamanho do produto (pb)
<i>mcr-1</i>	<i>mcr1_320bp_for</i>	AGTCCGTTTGTTCCTTGTGGC	320
	<i>mcr1_320bp_rev</i>	AGATCCTTGGTCTCGGCTTG	
<i>mcr-2</i>	<i>mcr2_700bp_for</i>	CAAGTGTGTTGGTTCGCAGTT	715
	<i>mcr2_700bp_rev</i>	TCTAGCCCGACAAGCATACC	
<i>mcr-3</i>	<i>mcr3_900bp_for</i>	AAATAAAAATTGTTCCGCTTATG	929
	<i>mcr3_900bp_rev</i>	AATGGAGATCCCCGTTTTT	
<i>mcr-4</i>	<i>mcr4_1100bp_for</i>	TCACTTTCATCACTGCGTTG	1.116
	<i>mcr4_1100bp_rev</i>	TTGGTCCATGACTACCAATG	
<i>mcr-5</i>	<i>MCR5_for</i>	ATGCGGTTGTCTGCATTTATC	1.644
	<i>MCR5_rev</i>	TCATTGTGGTTGTCCTTTTCTG	

Rebello *et al.*, 2018; pb: pares de bases

As etapas de reação foram constituídas de ciclo inicial de desnaturação a 94 °C por 15 minutos, seguido por 25 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, etapa de anelamento a 58 °C por 90 segundos e alongamento a 72 °C por 60 segundos e um ciclo final de alongamento a 72 °C durante 10 minutos. A eletroforese para visualização do produto amplificado foi realizada como descrito no item 4.6, com uma preparação de gel de agarose a 1,5%.

Os controles utilizados nessa reação foram: *E. coli* 2012–60–1176–27 para *mcr-1*, *E. coli* KP37 para *mcr-2*, *E. coli* 2013-SQ352 para *mcr-3*, *E. coli* DH5 α para *mcr-4* e *Salmonella* Paratyphi B dTa + 13-SA01718 para *mcr-5*.

4.10 Tipificação das amostras quanto ao grupo filogenético

Foram selecionadas uma amostra de cada participante, sendo uma correspondente a ida e outra ao retorno do mesmo participante. Para esta tipificação foi feito PCR multiplex, com os genes e fragmento de DNA listados na Tabela 12 (Clermont *et al.*, 2000, 2004, 2013).

Para um volume final de 10 μ L, foram utilizados para cada amostra 5 μ L de MasterMix (Promega®), 0,5 μ L de cada gene ou fragmento (20 pmol/ μ L) e 1 μ L de DNA. A reação foi realizada em uma etapa inicial de desnaturação a 94 °C por 4 minutos; seguida de 30 ciclos amplificação de 94 °C por 5 segundos, 57 °C por 20 segundos e uma etapa de extensão final de 72 °C por 5 minutos. A eletroforese para

visualização do produto amplificado foi realizada como descrito no item 4.6, com uma preparação de gel de agarose a 2%.

Tabela 12 - Lista de genes ou fragmento utilizados para a tipificação quanto ao grupo filogenético

Alvo	Nome do gene ou fragmento	Sequência (5' - 3')	Tamanho do amplicon (pb)
<i>chuA</i>	<i>chuA.1b</i> ¹	ATGGTACCGGACGAACCAAC	288
	<i>chuA.2</i> ¹	TGCCGCCAGTACCAAAGACA	
<i>yjaA</i>	<i>yjaA.1b</i> ¹	CAAACGTGAAGTGTCAGGAG	211
	<i>yjaA.2b</i> ¹	AATGCGTTCTCAACCTGTG	
TspE4.C2	TspE4.C2.1b ¹	CACTATTCGTAAGGTCATCC	152
	TspE4.C2.2b ²	AGTTTATCGCTGCGGGTCGC	
ArpA	<i>AceK.f</i> ¹	AACGCTATTCGCCAGCTTGC	400
	<i>ArpA.1r</i> ³	TCTCCCCATACCGTACGCTA	

¹Clermont *et al.*, 2013 ²Clermont *et al.*, 2000 ³Clermont *et al.*, 2004 pb: pares de bases

4.11 Tipificação das amostras por amplificação randômica do DNA

As amostras classificadas como MR foram submetidas à técnica de RAPD por meio de um PCR simplex utilizando o primer 1247 (AAGAGCCCGT) (Madico *et al.*, 1995). A reação teve volume final de 10 µL e para cada amostra foram utilizados 5µL de MasterMix (Promega®), 1,5µL de iniciador (10 pmol/µL), 0,5µL de MgCl₂ (50mM) e 3µL de DNA. A reação foi constituída por etapa inicial de desnaturação a 95° C por 15 minutos; seguida de 35 ciclos de amplificação de 94 °C por 1 minuto, 38 °C por 1 minuto, 72 °C por 2 minutos e uma etapa de extensão final de 72 °C por 1 minuto. A eletroforese para visualização do produto amplificado foi realizada como descrito no item 4.6, com uma preparação de gel de agarose a 1,5%.

A interpretação dos resultados dos perfis de *fingerprinting* ao RAPD foi através da inspeção visual e auxílio do programa Bionumerics versão 7.6 (Applied Maths, Belgium). Os perfis indistinguíveis ou semelhantes foram considerados clonais.

4.12 Análise Estatística

As análises estatísticas foram conduzidas utilizando-se o programa estatístico SPSS® versão 24. Foram conduzidas análises univariadas com o intuito de caracterizar a população do estudo, com a distribuição das frequências, cálculo de tendências centrais (médias). Também foram realizadas análises de associação entre

as características dos participantes e características das viagens, por meio do teste do qui-quadrado de Pearson (χ^2), ou razão da verossimilhança, e o teste exato de Fisher e ainda análise de correlação, pelo Teste de Correlação de Pearson. Foi considerado estatisticamente significativo quando o $p < 0,05$ para as análises.

4.13 Aspectos éticos

A pesquisa foi conduzida segundo as normas da Resolução N° 466/2012 e complementares do Conselho Nacional de Saúde. O projeto com CAAE 39274214.0.1001.5257, foi submetido à Plataforma Brasil para análise pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal do Rio de Janeiro e aprovado por meio do Parecer N° 936.655 de 14/01/2015 (Anexo 3). E aplicação do TCLE e todos os critérios de inclusão e exclusão.

5 RESULTADOS

5.1 Perfil dos participantes e da viagem: questionário pré-viagem

Foram recrutados 224 viajantes que responderam ao Questionário 1 relacionado aos dados pessoais do viajante. Na Tabela 13 são apresentados dados demográficos e clínicos dos viajantes. Observamos que a maioria foi do sexo feminino, tinha idade média de 38 anos, apresentava nível superior completo e não era portadora de doença de base.

Tabela 13 - Descrição das principais características de 224 viajantes

Características dos viajantes	Viajantes (%)
Sexo	
Feminino	143 (63,8)
Masculino	81(36,2)
Idade (anos)	
Média, Mediana	38, 34
Intervalo interquartil	28-47
Escolaridade	
Sem nível superior	49 (21,9)
Nível superior completo	175 (78,1)
Doença de Base	
Nenhuma	141 (62,9)
Autoimune	10 (4,5)
HAS	9 (4,0)
DM	7 (3,1)
HAS associada a DM	3 (1,3)
Imunodeficiência	2 (0,9)
Psoríase	1 (0,4)
ITU de repetição	1 (0,4)
Outras	50 (22,5)
Uso de medicamentos	
Nenhum	107 (47,8)
HAS e/ou DM	17 (7,6)
Imunossupressor	5 (2,2)
Outros	95 (42,4)
Antimicrobianos nos últimos 30 dias	
Não	217 (96,9)
Sim	7 (3,1)
Qual antimicrobiano?	
Nenhum	217 (96,9)
Penicilinas	6 (2,7)
Quinolonas	1 (0,4)

Dados são número e %, a não ser quando indicados valores diferentes; HAS: hipertensão arterial sistêmica; DM: diabetes mellitus; ITU: infecção do trato urinário

Na Tabela 14 são apresentadas as principais características da viagem. Observou-se que quase 70% das viagens foram a turismo e os principais destinos foram a África subsaariana (cerca de 45%) e a América do Sul em turismo de altitude (20%).

Tabela 14 - Descrição das principais características da viagem

Características da viagem	Viajantes n = 224 (%)
Duração da viagem (dias)	
Média, Mediana	25, 19
Intervalo interquartil	13-29
Motivo da viagem	
Turismo	152 (67,9)
Trabalho	71 (31,7)
Visitar amigos e parentes	1 (0,4)
Hospedagem	
Hotel	78 (34,8)
Acampamento	56 (25,0)
Albergue	39 (17,4)
Residência	31(13,8)
Alojamento	17 (7,6)
Outros	3 (1,4)
Região de destino	
África subsaariana	100 (44,6)
América do Sul (altitude)	47 (21,0)
América do Sul (outros)	20 (8,9)
Sudeste Asiático	19 (8,5)
Subcontinente indiano	15 (6,7)
Ásia	9 (4,0)
África do Norte	2 (0,9)
Outros*	12 (5,4)

Dados são número e %, a não ser quando indicados valores diferentes; *1 (0,4%) para América do Norte, 1 (0,4%) para América Central, 8 (3,6%) para Oceania e 2 (0,9%) para Oriente Médio

5.2 População do estudo

Todos os 224 participantes coletaram amostra de *swab* anal antes da viagem, porém, apenas 153 (68%) viajantes foram incluídos na análise de aquisição de amostra MR ou amostra produtora de ESBL. Dos 71 participantes excluídos, 65 (92%) coletaram apenas o espécime antes da viagem e em 6 não foi recuperada amostra de

E. coli a partir do espécime pré-viagem ou pós-viagem. Na Tabela 15 pode-se observar os dados dos viajantes excluídos e incluídos no estudo. Com esses dados pode-se observar que os dados principais como sexo e idade média não são discrepantes quando comparados os dois grupos. Porém quando são analisadas as regiões de destino, a África subsaariana predominou entre os excluídos, porém sem uma significância estatística.

Tabela 15 - Descrição das principais características dos viajantes incluídos e excluídos

Características da viagem	Viajantes excluídos n=71 (%)	Viajantes incluídos n=153 (%)	P
Sexo			0,765
Feminino	44 (62)	99 (64,7)	
Masculino	27 (38)	54 (35,3)	
Idade (anos)			
Média, Mediana	37, 34	38, 34	
Intervalo interquartil	28-43	28-47	
Região de destino			0,080
África subsaariana	45 (63,4)	55 (35,9)	
América do Sul (altitude)	11 (15,5)	36 (23,5)	
América do Sul (outros)	4 (5,6)	16 (10,5)	
Sudeste Asiático	4 (5,6)	15 (9,8)	
Subcontinente indiano	3 (4,3)	12 (7,8)	
Ásia	2 (2,8)	7 (4,6)	
África do Norte	0	2 (1,3)	
América do Norte e Central / Oceania/Oriente Médio	2 (2,8)	10 (6,7)	

Dados são número e %, a não ser quando indicados valores diferentes

5.3 Dados do questionário pós-viagem

Na Tabela 16 pode-se observar que 33 participantes utilizaram algum tipo de antimicrobiano durante a viagem, sendo a doxiciclina o mais utilizado, como motivo sendo a quimioprofilaxia de malária. Ainda na tabela, é possível observar que estes 33 participantes tiveram algum episódio de diarreia na viagem, não ultrapassando um dia.

Tabela 16 – Variáveis observadas nos participantes do estudo durante a viagem

Variáveis observadas durante a viagem	Viajantes n = 153 (%)
Uso de antimicrobiano durante a viagem	
Sim	33 (21,6)
Qual antimicrobiano?	
Nenhum	120 (78,4)
Doxiciclina	28 (18,3)
Penicilinas	2 (1,3)
Quinolonas	1 (0,7)
Macrolídeos	1 (0,7)
Não soube informar	1 (0,7)
Diarreia durante a viagem	
Sim	33 (21,6)
Duração da diarreia	
Não se aplica	120 (78,4)
Inferior ou igual a 24 horas	24 (15,7)
24 h – 72 h	7 (4,6)
Mais que 72 h	2 (1,3)

5.4 Análise microbiológica

A coleção das amostras de *E. coli* totalizou 1210 colônias, sendo recuperadas até 3 colônias antes da viagem e até 3 colônias após o retorno por participante. Não foram recuperadas amostras de *E. coli* de 6 viajantes a partir do espécime pré-viagem ou pós-viagem.

5.4.1 Frequência de aquisição de *E. coli* produtora de ESBL e multirresistente

Dentre os 153 viajantes incluídos nesta análise, 10 (6,5%) eram portadores de *E. coli* produtora de ESBL e 15 (9,8%) de *E. coli* MR antes da viagem, restando 143 viajantes sob risco de aquisição de *E. coli* produtora de ESBL e 138 sob risco de aquisição de *E. coli* MR, como apresentado na Tabela 17. A frequência de aquisição de *E. coli* produtora de ESBL nas viagens foi de 20,3%, e de *E. coli* MR foi de 27,6%.

Tabela 17 - Presença de *E. coli* produtora de ESBL e *E. coli* MR na microbiota intestinal dos viajantes antes da viagem e após o seu retorno

Momento da coleta do espécime	<i>E. coli</i> produtora de ESBL		<i>E. coli</i> MR	
	Sim	Não	Sim	Não
Pré-viagem	10 (6,5)	143 (93,5)	15 (9,8)	138 (90,2)
Pós-viagem	29 (20,3)	114 (79,7)	38 (27,6)	100 (72,4)

MR: multirresistente

As frequências de aquisição de *E. coli* produtora de ESBL e *E. coli* MR de acordo com a região de destino podem ser observadas na Tabela 18 e na Tabela 19, respectivamente. Ficou notável que o subcontinente Sudeste Asiático teve uma elevada frequência de aquisição de *E. coli* produtora de ESBL e *E. coli* MR, seguido pelo Subcontinente Indiano e Ásia para aquisição de *E. coli* produtora de ESBL, sendo que ambos os resultados apresentaram significado estatístico. Não houve aquisição de *E. coli* produtora de ESBL e *E. coli* MR após viagem para América do Norte, América Central e Oriente Médio.

Dentre os 153 viajantes, 26 visitaram mais de um continente; 4 dentre esses adquiriram *E. coli* produtora de ESBL e 6 adquiriram *E. coli* MR. Os destinos em questão foram Sudeste Asiático e Oriente Médio, além de Oceania e Europa.

Tabela 18 - Frequência de aquisição de *E. coli* produtora de ESBL de acordo com a região de destino

Região de destino	Total de viajantes	Aquisição de <i>E. coli</i> produtora de ESBL		
		N e (%) de viajantes	% de aquisição	P
África do Norte	2	1 (3,4)	50,0	
Sudeste Asiático	12	6 ^a (20,8)	50,0	
Subcontinente indiano	12	5 (17,2)	41,7	
Ásia	7	2 ^{b,c} (6,9)	28,6	
África subsaariana	49	10 (34,5)	20,4	
América do Sul (altitude)	35	5 (17,2)	14,3	0,009
América do Sul (outros)	16	0	0	
América do Norte e Central / Oceania/Oriente Médio	10	0	0	
Total	143	29	20,3	

N: número; a: 2 viajantes também foram para Oriente Médio; b: 1 viajante também foi para Sudeste asiático; c: 1 viajante também foi para Oceania

Tabela 19 - Frequência de aquisição de *E. coli* MR de acordo com a região de destino

Região de destino	Total de viajantes	Aquisição de <i>E. coli</i> MR		P
		N e (%) de viajantes	% de aquisição	
Sudeste Asiático	11	6 ^a (15,8)	54,5	0,046
África do Norte	2	1 (2,6)	50,0	
Subcontinente indiano	12	6 (15,8)	50,0	
Ásia	7	3 ^{b,c} (8)	42,9	
África subsaariana	48	14 ^d (36,8)	29,2	
América do Sul (altitude)	33	6 (15,8)	18,2	
América do Norte e Central / Oceania/Oriente Médio	10	1 (2,6)	14,3	
América do Sul (outros)	15	1 (2,6)	6,6	
Total	138	38	27,6	

N: número; MR: multirresistente; a: 2 viajantes também foram para Oriente Médio; b: 2 viajantes também foram para Sudeste asiático; c: 1 viajante também foi para Oceania; d: 1 viajante também foi para Europa

As frequências de resistência antes da viagem e após o retorno dos participantes estão demonstradas na Tabela 20. Pode-se observar que não houve amostras resistentes a amicacina tanto na ida quanto na volta. Houve ainda uma baixa frequência de resistência aos carbapenemas, à nitrofurantoína e à fosfomicina. Para os antimicrobianos gentamicina, ampicilina, cefalosporinas de 1^a a 4^a gerações e sulfametoxazol+trimetoprim houve aumento e a resistência encontrada na amostra isolada na pré-viagem e pós-viagem, sendo a resistência maior na amostra após o retorno.

Tabela 20 - Comparação da frequência de resistência antes da viagem e após o retorno do viajante

Antimicrobiano	Número e % de amostras resistentes		P
	Antes da viagem	Após o retorno	
Ampicilina	36 (23,5)	68 (44,4)	<0,001
Cotrimoxazol	31 (20,3)	58 (37,9)	0,001
Cefazolina	14 (9,2)	36 (23,5)	0,001
Cefuroxima	9 (5,9)	31 (20,3)	<0,001
Cefotaxima	9 (5,9)	30 (19,6)	<0,001
Cefepime	8 (5,2)	23 (15,0)	0,007
Ciprofloxacina	8 (5,2)	17 (11,1)	0,093
Gentamicina	2 (1,3)	13 (8,5)	0,006
Ceftazidima	2 (1,3)	11 (7,2)	0,020
Amoxicilina + ácido clavulânico	1 (0,7)	7 (4,6)	0,067
Fosfomicina	0	2 (1,3)	0,498
Cefoxitina	3 (2,0)	1 (0,7)	0,623
Ertapenem	0	1 (0,7)	1,000
Nitrofurantoína	1 (0,7)	1 (0,7)	1,000
Amicacina	0	0	-

R: resistência

Foram obtidas 25 amostras de *E. coli* resistentes a CIP. Desse total, 8 foram obtidas antes da viagem, com frequência de resistência de 5%, e 17 após o retorno, com frequência de 11%, como já apresentado na Tabela 20. A pesquisa de genes que codificam resistência transferível às quinolonas nessas amostras revelou, nas amostras pré-viagem, a presença dos genes *qnrB*, *aac(6')-Ib-cr5* e *qepA*, cada um deles em uma de três amostras; e entre as amostras pós-viagem, três carregavam o gene *qnrS*, duas o gene *qepA* e cinco o gene *aac(6')-Ib-cr5*.

Dentre as 5 amostras produtoras de AmpC plasmidial todas foram identificadas como produtoras do tipo *bla_{CMYlike}*, sendo três amostras antes da viagem e duas após o retorno do viajante, sendo carreadoras do gene *bla_{CMY2}* e *bla_{CMY4}*.

Nenhuma amostra apresentou genes transferíveis de resistência à colistina (*mcr*). Resistência à ertapenem foi observada em apenas uma amostra de retorno, na qual foi detectado o gene *bla_{OXA-48}*. Essa amostra foi recuperada de um viajante do sexo masculino, 32 anos de idade, que viajou a turismo. Acampamento foi sua hospedagem, que teve como destino a África subsaariana, tendo visitado Etiópia, Quênia, Tanzânia e Zâmbia. O viajante relatou não ter feito uso de antimicrobianos nos 30 dias que antecederam a viagem, mas utilizou doxiciclina durante e após a

viagem para quimioprofilaxia de malária. Relatou ausência de diarreia durante a viagem e após o retorno.

5.4.2 Genes que codificam beta-lactamases de espectro estendido detectados entre viajantes

Todos os genes relacionados a ESBL detectados codificam variantes do tipo CTX-M. A variante genética mais frequente foi *bla*_{CTX-M15}. Todos os casos pré e pós - viagem estão demonstrados na Tabela 21.

Tabela 21 - Genes que codificam ESBL identificados em viajantes na consulta pré-viagem a após retorno

Gene que codifica ESBL		Número de viajantes
Ida	Volta	
<i>bla</i> _{CTX-M2}	<i>bla</i> _{CTX-M2}	1
<i>bla</i> _{CTX-M8}	<i>bla</i> _{CTX-M8}	1
<i>bla</i> _{CTX-M27}	<i>bla</i> _{CTX-M27}	1
<i>bla</i> _{CTX-M15}	Ausente	2
<i>bla</i> _{CTX-M2}	Ausente	3
<i>bla</i> _{CTX-M8}	Ausente	1
<i>bla</i> _{CTX-M27}	Ausente	1
Ausente	<i>bla</i> _{CTX-M15}	18
Ausente	<i>bla</i> _{CTX-M14}	4
Ausente	<i>bla</i> _{CTX-M55}	3
Ausente	<i>bla</i> _{CTX-M2}	2
Ausente	<i>bla</i> _{CTX-M8}	1
Ausente	<i>bla</i> _{CTX-M27}	1

Na Tabela 22 são apresentados os genes que codificam ESBL detectados após a viagem de acordo com a região de destino. A variante *bla*_{CTX-M15} foi encontrada na maioria das regiões de destino. Na África subsaariana e Sudeste Asiático há uma diversidade de variantes encontradas, sendo que na primeira região foram encontrados os genes *bla*_{CTX-M15}, *bla*_{CTX-M55}, *bla*_{CTX-M2} e *bla*_{CTX-M8} e na segunda *bla*_{CTX-M15}, *bla*_{CTX-M14} e *bla*_{CTX-M27}.

Tabela 22 - Genes que codificam beta-lactamases do tipo CTX-M encontrados após a viagem de acordo com a região de destino

Região de destino	Gene que codifica ESBL					
	<i>bla</i> _{CTX-M15}	<i>bla</i> _{CTX-M14}	<i>bla</i> _{CTX-M55}	<i>bla</i> _{CTX-M2}	<i>bla</i> _{CTX-M8}	<i>bla</i> _{CTX-M27}
	África subsaariana	7 (38,9)	-	1 (33,3)	1 (50,0)	1 (100)
Sudeste Asiático	3 (16,7)	2 (50,0)	-	-	-	1 (100)
Subcontinente indiano	5 (27,8)	-	-	-	-	-
América do Sul (altitude)	-	2 (50,0)	2 (66,7)	1 (50,0)	-	-
África do Norte	1 (5,6)	-	-	-	-	-
Ásia	2 (11,1)	-	-	-	-	-

5.5 Tipificação de amostras

5.5.1 Quanto ao grupo filogenético

Todas as amostras foram classificadas quanto ao grupo filogenético. Foi possível observar que a maioria das amostras foi caracterizada como do filogrupo A ou C, seguido de B1 e B2. As frequências de cada grupo são mostradas na Tabela 23. Não foi possível observar diferença com significado estatístico na distribuição dos filogrupos quando comparadas as amostras recuperadas dos espécimes da ida com os da volta.

Tabela 23 - Grupos filogenéticos caracterizados nas amostras de *E. coli* antes da viagem e após o retorno

Grupo filogenético	Número e (%) de amostras		P
	Pré-viagem	Pós-viagem	
A ou C	51 (33,3)	54 (35,3)	0,329
B1	23 (15,0)	26 (17,0)	
B2	28 (18,3)	16 (10,5)	
D ou E	12 (7,8)	24 (15,7)	
A	19 (12,4)	16 (10,5)	
F	10 (6,5)	9 (5,9)	
U	4 (2,6)	5 (3,3)	
Outros (CLAD 1 ou 2; E ou CLAD 1)	6 (4,1)	3 (1,8)	

5.5.2 Diversidade de genótipos de *fingerprinting*

Para essa análise foram incluídas também as amostras de *E. coli* MR identificadas na consulta pré-viagem. Foram tipificadas no RAPD 106 amostras de *E.*

coli obtidas de 53 viajantes a partir dos quais uma amostra MR havia sido obtida, uma antes e outra após o retorno da viagem, para comparação dos perfis de fragmentos de DNA amplificados. Para cada amostra foi obtido um perfil com 3 a 13 fragmentos de DNA, sendo em média 6.

Foram observados 103 perfis, sendo 100 perfis com amostras únicas e 3 perfis com duas amostras cada um, com 100% de similaridade entre si (perfis indistinguíveis, participantes 86, 165 e 220). Cada um desses perfis é proveniente do mesmo viajante, sendo as amostras antes da viagem e após o retorno classificadas como MR. Na Tabela 24 estão demonstrados os perfis considerados iguais e diferentes de acordo com a produção de ESBL antes e após as viagens, sendo que as amostras que apresentaram perfis iguais produziram o mesmo tipo de CTX-M. Dentre os perfis diferentes pode-se observar que houve uma diversidade entre os clones. O dendograma está demonstrado na Figura 2 a seguir.

Tabela 24 - Perfis considerados iguais e diferentes de acordo com a produção de ESBL antes e após as viagens

Gene que codifica ESBL		Número de viajantes	Perfis no RAPD
Ida	Volta		
<i>bla_{CTX-M2}</i>	<i>bla_{CTX-M2}</i>	1	Igual
<i>bla_{CTX-M8}</i>	<i>bla_{CTX-M8}</i>	1	Igual
<i>bla_{CTX-M27}</i>	<i>bla_{CTX-M27}</i>	1	Igual
<i>bla_{CTX-M15}</i>	Ausente	2	Diferente
<i>bla_{CTX-M2}</i>	Ausente	3	Diferente
<i>bla_{CTX-M8}</i>	Ausente	1	Diferente
<i>bla_{CTX-M27}</i>	Ausente	1	Diferente
Ausente	<i>bla_{CTX-M15}</i>	18	Diferente
Ausente	<i>bla_{CTX-M14}</i>	4	Diferente
Ausente	<i>bla_{CTX-M55}</i>	3	Diferente
Ausente	<i>bla_{CTX-M2}</i>	2	Diferente
Ausente	<i>bla_{CTX-M8}</i>	1	Diferente
Ausente	<i>bla_{CTX-M27}</i>	1	Diferente

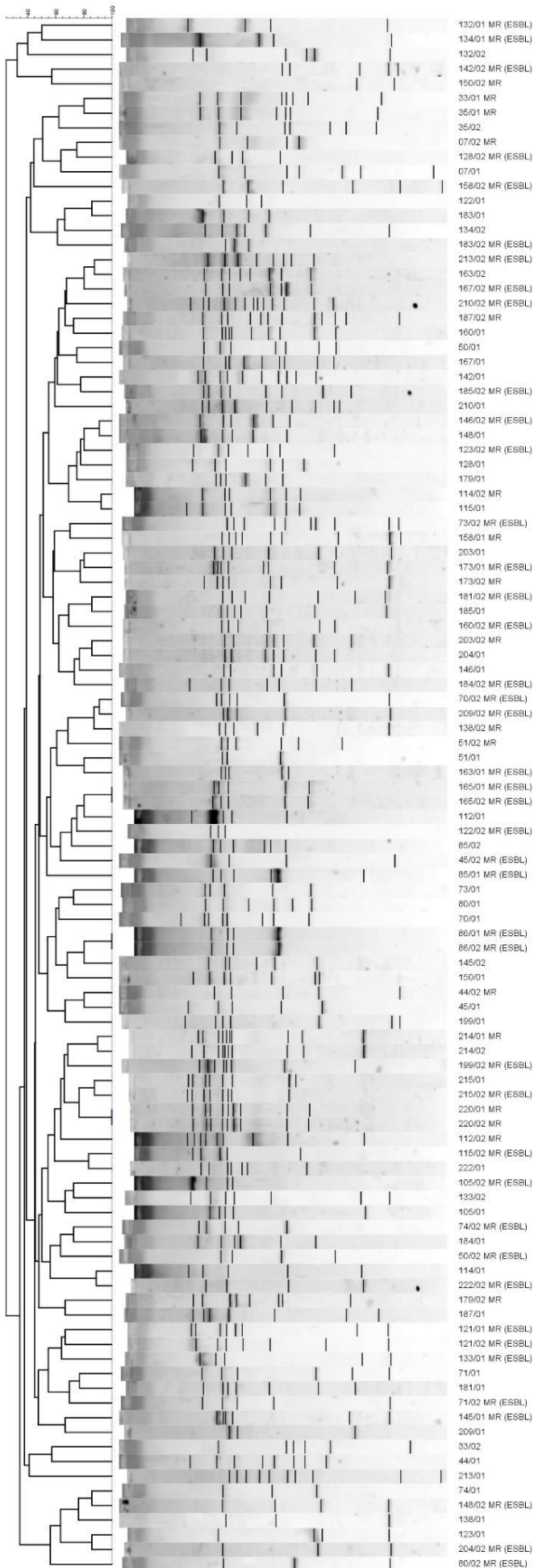


Figura 2 - Perfis de fragmentos de DNA amplificados por RAPD das amostras MR com seu par respectivo ou antes da viagem ou após o seu retorno

5.6 Análise de variáveis associadas à aquisição de amostra de *E. coli* multirresistente ou *E. coli* produtora de ESBL

A análise de condições pré-viagem revelou uma associação com significado estatístico ($p= 0,022$) entre o uso de antimicrobianos nos 30 dias antes da partida e a colonização por *E. coli* produtora de ESBL, e uma tendência para associação também com colonização por *E. coli* MR nesse momento ($p= 0,055$). Esses dados são mostrados na Tabela 25.

Tabela 25 - Análise do uso de antimicrobianos antes da viagem e sua relação com a detecção da colonização por *E. coli* produtora de ESBL e *E. coli* MR pré-viagem dos participantes

Uso de antimicrobianos antes da viagem	Número (%) de viajantes					
	<i>E. coli</i> produtora de ESBL		P	<i>E. coli</i> MR		P
	Sim	Não		Sim	Não	
Sim	2 (50,0)	2 (50,0)	0,022	2 (50,0)	2 (50,0)	0,055
Não	8 (5,4)	141 (94,6)		14 (9,4)	135 (90,6)	

Na Tabela 26 estão descritas as análises de associações entre variáveis de sexo, motivo da viagem, diarreia e uso de antimicrobianos durante a viagem, região de destino e hospedagem, comparando-as com aquisição de colonização por amostra de *E. coli* produtora de ESBL ou *E. coli* MR.

Dentre as variáveis descritas na tabela, houve associação com significado estatístico ($p= 0,020$) entre viagem a turismo e a aquisição de *E. coli* produtora de ESBL. Essa mesma associação não foi detectada ($p= 0,164$) quando considerada a aquisição de amostra de *E. coli* MR.

No presente estudo, não foi possível detectar sexo, a ocorrência de diarreia durante a viagem, uso de antimicrobianos durante a viagem, bem como o tipo de hospedagem como variáveis associadas à aquisição de *E. coli* produtora de ESBL ou MR. Foi realizada ainda a análise da associação entre a média de idade e duração da viagem com a aquisição de *E. coli* produtora de ESBL ou MR, porém não houve uma associação estatisticamente significativa.

Pode-se observar que houve significado estatístico entre a aquisição de amostra produtora de ESBL ou MR e a região de destino, sendo essa associação com

significado estatístico para aquisição mais frequente de ESBL ou MR para as regiões analisadas no presente estudo, sendo Sudeste Asiático, Ásia e Índia e África.

Tabela 26 - Análise de associações entre variáveis e aquisição de colonização por amostra de *E. coli* produtora de ESBL ou *E. coli* MR

Variável	Número (%) de viajantes					P
	<i>E. coli</i> produtora de ESBL		P	<i>E. coli</i> MR		
	Sim	Não		Sim	Não	
Sexo						
Feminino	19 (21,1)	71 (78,9)	0,831	25 (65,8)	60 (60,6)	0,695
Masculino	10 (18,9)	43 (81,1)		13 (34,2)	39 (39,4)	
Motivo da viagem						
Turismo	25 (23,6)	81 (76,4)	0,020	30 (29,4)	72 (70,6)	0,164
Trabalho	3 (8,3)	33 (91,7)		7 (20,6)	27 (79,4)	
Visitar amigos e parentes	1 (100)	0		1 (100)	0	
Diarreia durante a viagem						
Sim	3 (9,4)	29 (90,6)	0,132	6 (20,7)	23 (79,3)	0,484
Não	26 (23,4)	85 (76,6)		32 (29,6)	76 (70,4)	
Hospedagem						
Hotel	12 (20,3)	47 (79,7)	0,962	17 (30,4)	39 (69,6)	0,850
Acampamento	8 (21,6)	29 (78,4)		9 (25,7)	26 (74,3)	
Outros ¹	9 (19,1)	38 (80,9)		12 (26,1)	34 (73,9)	
Região de destino						
Sudeste Asiático	6 (50,0)	6 (50,0)	0,003	6 (54,5)	5 (45,5)	0,007
Ásia e Índia	7 (36,8)	12 (63,2)		9 (47,4)	10 (52,6)	
África	10 (20,4)	39 (79,6)		14 (29,2)	34 (70,8)	
Outros ²	6 (9,5)	57 (90,5)		9 (15,3)	50 (84,7)	
Uso de antimicrobianos						
Sim	7 (22,6)	24 (77,4)	0,801	12 (42,9)	16 (57,1)	0,059
Não	22 (19,6)	90 (80,4)		26 (23,9)	83 (76,1)	

¹Albergue, residência, alojamento; ²América do Sul, Ilhas do Pacífico, Oceania, Europa, América do Norte e Central

6 DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo que investiga características de viajantes brasileiros em viagens internacionais quanto ao sexo, idade, tipo da viagem, tipo de hospedagem, duração da viagem, uso de antimicrobianos e episódios de diarreia antes e durante a viagem, dentre outros. O principal achado foi a aquisição de colonização intestinal por amostra de *E. coli* produtora de ESBL em 29 de 143 participantes (com uma frequência de aquisição de 20%) e por amostra de *E. coli* MR em 38 de 138 participantes (frequência de aquisição de 28%).

6.1 Perfil dos participantes do estudo e da viagem: questionário pré-viagem

No recrutamento dos indivíduos para o presente estudo, obtivemos concordância de 224 voluntários. Dentre esses, a maioria era do sexo feminino, o que condiz com a literatura relacionada a estudos com viajantes. Estudos relacionados com a aquisição de Enterobacteriaceae MR em viagens internacionais mostram a predominância de inclusão de mulheres, variando de 54% a 65% dos participantes (Arcilla *et al.*, 2017; Sole *et al.*, 2014; Peirano *et al.*, 2017). Essa característica pode estar relacionada ao maior frequência de viagem por parte das mulheres, a disposição das mulheres de visitar uma clínica de medicina de viagens e entender a importância do acompanhamento na consulta.

A idade média dos viajantes do presente estudo foi de 38 anos. Observa-se na literatura que viajantes incluídos em estudos similares apresentam uma idade média variável, de 30 anos (Barreto Miranda *et al.*, 2016), 48 (Reuland, al Naiemi, *et al.*, 2016) ou até 50 anos (Arcilla *et al.*, 2017). As razões para essa variação pode ser devido à diferentes níveis econômicos e laborais entre as nações, variações entre hábitos que propiciam às viagens e diferenças nas faixas de idade de aposentadoria.

No presente estudo cerca de 63% dos viajantes não apresentavam doença de base. Os achados de Peirano *et al.* (2017) para a ausência de comorbidades em viajantes canadenses foi de 87%, e outros autores, como Vading *et al.* (2016), encontraram que 79% dos viajantes suecos não apresentavam doenças crônicas; e da mesma forma, Arcilla *et al.* (2017), que analisaram viajantes holandeses, também observaram que cerca de 73% dos viajantes não possuíam nenhuma doença crônica ou de base.

Dentre os viajantes que procuram a clínica de viagem o turismo foi o principal motivo em 68% dos casos nesse estudo, o que também foi observado em outros

estudos relacionados a viagens internacionais, como o de Kuenzli *et al.* (2014) que observou que cerca de 67% dos viajantes estavam viajando a turismo, ou o de Arcilla *et al.* (2017) com cerca de 84%, Barreto Miranda *et al.* (2016), com um achado de 77%, dentre outros.

A média da duração da viagem foi de 25 dias. Na literatura similar, pode-se observar que as viagens podem variar de 14 dias (Vading *et al.*, 2016), 20 dias (Sole *et al.*, 2014; Arcilla *et al.*, 2017) a um máximo de 28 dias (Barreto Miranda *et al.*, 2016). Essa duração média da viagem é considerada longa, pois apenas avaliam os participantes que procuram uma clínica de viagem, porém muitas viagens são feitas em um período mais curto, como em viagens a trabalho.

O principal destino nesse estudo foi a África subsaariana com cerca de 45% dos participantes. Esse mesmo destino foi relatado por Kantele *et al.* (2015), que avaliou viajantes finlandeses, por Östholm-Balkhed *et al.* (2013), que analisou viajantes suecos, e por Ruppé *et al.* (2015), que analisou viajantes franceses. Entretanto, em outros estudos, o principal destino é o subcontinente indiano (Sole *et al.*, 2014; Barreto Miranda *et al.*, 2016) e a África (Lääveri *et al.*, 2018), sendo que no estudo de Sole *et al.* (2014) o segundo destino mais procurado por viajantes espanhóis foi a África Ocidental (que corresponde a uma parte da África subsaariana). O segundo continente mais procurado e visitado pelos viajantes no presente estudo foi a América do Sul em turismo de altitude. Há algumas publicações que mostram que América do Sul ou América Latina são regiões procuradas pelos viajantes, porém são destinos procurados com menos frequência (Paltansing *et al.*, 2013; Sole *et al.*, 2014; Ruppé *et al.*, 2015; Barreto Miranda *et al.*, 2016; Mizuno *et al.*, 2016; Arcilla *et al.*, 2017; Lääveri *et al.*, 2018).

6.2 Dados de inclusão e exclusão

Há muitos estudos que mostram uma perda de seguimento dos viajantes ao longo do trabalho, como na publicação de Paltansing *et al.* (2013), que avaliou viajantes holandeses, no qual o número de viajantes que não continuaram o estudo foi de 39%. Ruppé *et al.* (2015) detectaram uma perda dos voluntários de 30%, Arcilla *et al.* (2017), estudando 2001 viajantes holandeses, observaram 26% de perda, e em estudo de 2018 (Lääveri *et al.*), a perda foi de 13%. No presente estudo, caracterizou-se uma perda de 32%, sendo a perda de participantes maior no ano de início do estudo (2015). Os diversos motivos para essa perda foram cancelamento da viagem, falta de

contato no retorno, falta de interesse em coletar o segundo *swab*, ou desinteresse em continuar na pesquisa.

A comparação entre as variáveis sexo e idade média dos viajantes incluídos e excluídos não revelou diferenças importantes entre os grupos. Porém, quando os destinos das viagens foram comparados, pode-se verificar que na viagem para a África subsaariana houve a maior perda. No entanto, essa perda não prejudicou a observação de resultados significativos sobre outros viajantes para esse mesmo destino, que permanceu como o mais procurado.

6.3 Dados do questionário pós-viagem

No presente estudo, que avalia viajantes brasileiros, verificamos que 22% dos participantes utilizaram antimicrobianos durante a viagem. A utilização destes medicamentos por viajantes de outras nacionalidades é relatada com frequências de 10% por franceses (Ruppé *et al.*, 2015); 26% por alemães (Barreto Miranda *et al.*, 2016) e 7% por holandeses (Arcilla *et al.*, 2017). Dentre os 22% de viajantes brasileiros que utilizaram antimicrobianos durante a viagem, a maioria fez uso de doxiciclina, um quimioprolático para a malária, que pode ser visto também em outros estudos de viagens internacionais (Ruppé *et al.*, 2015; Blyth *et al.*, 2016).

Episódios de diarreia durante a viagem ocorreram em 22% dos viajantes do presente estudo, estando esse número abaixo do que é encontrado na literatura do assunto; por exemplo, 67% dos viajantes finlandeses (Kantele *et al.*, 2015), 42% dos viajantes suecos (Östholm-Balkhed *et al.*, 2013), 40% dos viajantes franceses (Ruppé *et al.*, 2015) e 37% de viajantes suíços (Kuenzli *et al.*, 2014) tiveram episódios de diarreia durante a viagem. Essa diferença nos dados dos viajantes que partem de países desenvolvidos pode ser devido ao antimalárico utilizado por esses países ser atovaquone+proguanil, como quimioprolático para malária, sendo caracterizada por possuir mais efeitos adversos que a doxiciclina utilizada pelos viajantes que partem do Brasil, sendo a diarreia mais relatada.

6.4 Análise microbiológica

6.4.1 Frequência de aquisição de *E. coli* produtora de ESBL e *E. coli* multirresistente

No presente estudo detectamos que 10 viajantes (7%) já estavam colonizados por *E. coli* produtora de ESBL e 15 (10%) por *E. coli* MR antes da viagem. Em estudos

que caracterizaram e avaliaram a aquisição desses microrganismos resistentes durante viagens internacionais, a frequência de colonização pré-viagem variou de 1 a 14% (Peirano *et al.*, 2017; Ruppé *et al.*, 2015; Hassing *et al.*, 2015) para amostras de Enterobacteriaceae MR. Observamos, portanto, que os resultados do presente estudo são similares aos de outros autores. A frequência de *E. coli* MR na microbiota intestinal (pesquisada em espécime coletado por *swab* anal) dos viajantes brasileiros foi semelhante ou ainda menor se comparado com a frequência encontrada na microbiota intestinal de viajantes de outros países. No entanto, outra justificativa para esse achado seria decorrente da metodologia que adotamos, com coleta de espécime fecal utilizando *swab* anal. Porém isso não é possível, pois em estudo que investigou o rendimento do *swab* anal para detecção de amostras resistentes a fluorquinolona (20 em 59 indivíduos), comparado com a cultura de fezes, a sensibilidade e especificidade do *swab* anal foram plenamente satisfatórias, de 90% e 100% respectivamente (Lautenbach *et al.*, 2005). Além disso, nos nossos achados apenas não foi detectado *E. coli* em amostras de 6 viajantes, caso houvesse algum problema com a metodologia, essa perda seria bem maior.

No presente estudo, a frequência de aquisição nas viagens foi de 20% para *E. coli* produtora de ESBL e 28% para *E. coli* MR, o que se aproxima do estudo de Kantele *et al.* (2015), que achou uma frequência de aquisição de Enterobacteriaceae produtora de ESBL em viagens internacionais de 21%, Tängdén *et al.* (2010) que encontrou um valor de 24% de aquisição em viagens e de Östholm-Balkhed *et al.* (2013) que encontrou 30% de aquisição de *E. coli* produtora de ESBL no estudo. Outros estudos mostraram uma frequência de aquisição maior, como 30% no estudo de Lübbert *et al.* (2015), 34% no estudo de von Wintersdorff *et al.* (2014) e 34% no de Arcilla *et al.* (2017).

A Ásia é o local com maior frequência de aquisição de Enterobacteriaceae MR (Östholm-Balkhed *et al.*, 2013; Paltansing *et al.*, 2013; Ruppé *et al.*, 2015; Reuland, al Naiemi, *et al.*, 2016). No presente estudo, o Sudeste asiático foi o local de aquisição de *E. coli* produtora de ESBL e *E. coli* MR mais frequente, o que foi observado também em outros estudos, como o de Barreto Miranda *et al.* (2016) que encontrou como locais com maior frequência de aquisição desses microrganismos a Índia e Sudeste asiático. O estudo de Vading *et al.* (2016) encontrou que para viajantes suecos, o subcontinente indiano foi o principal destino para aquisição de *E. coli* produtora de ESBL, seguido do sudeste asiático, sendo encontrado também no presente estudo que o

subcontinente indiano foi o segundo destino mais relacionado com a aquisição de *E. coli* produtora de ESBL e *E. coli* MR.

Assim como nesse estudo, outros também observaram que não houve aquisição desses microrganismos durante viagens para destinos como Oceania ou América do Norte (Kennedy e Collignon, 2010; Tängdén *et al.*, 2010; Östholm-Balkhed *et al.*, 2013; Mizuno *et al.*, 2016).

Observou-se diferença nas frequências de resistência antes e depois da viagem para os antimicrobianos gentamicina, ciprofloxacina e sulfametoxazol+trimetoprim; ou seja, obtivemos mais amostras resistentes no pós-viagem quando comparado às amostras da pré-viagem, esse dado também é encontrado em estudos semelhantes (Paltansing *et al.*, 2013; Lübbert *et al.*, 2015; Vading *et al.*, 2016).

A frequência de amostras resistentes a CIP no presente estudo antes da viagem foi de 5% e após a viagem de 11%. Pode-se observar que comparando os dados de viajantes brasileiros com viajantes provenientes da Holanda, esse perfil de resistência é superior tanto em amostras pré-viagem (10%) quanto pós-viagem (32%) (Reuland, Sonder, *et al.*, 2016). Dentre as amostras resistentes a CIP, foram detectadas *qnrB*, *aac(6')-Ib-cr5* e *qepA* antes da viagem com 13% cada, e após o retorno, *qnrB* não foi encontrado, mas 29% das amostras apresentavam *aac(6')-Ib-cr5*, 12% apresentavam *qepA* e 18% apresentavam *qnrS*. Esses resultados foram bem diferentes dos encontrados por von Wintersdorff *et al.* (2014) que avaliou esses genes transferíveis de resistência a quinolonas em viajantes holandeses. Os achados encontrados pelo autor foram que antes da viagem *qnrA*, *qnrB* e *qnrS* foram relativamente pouco frequentes: 0,8%, 7% e 8%, respectivamente, e após a viagem os mesmos genes foram detectados em 3%, 37% e 56% das amostras, respectivamente. No estudo de Vading *et al.* (2016) foi observado que após o retorno 46% dessas amostras apresentavam genes *qnr* ou *aac*, dentre eles o *qnrS* foi o mais detectado, seguido de *aac*, ao contrário do que observamos no presente estudo, em que o *aac* foi mais detectado seguido do gene *qnrS*.

No presente estudo foram detectados apenas dois viajantes que retornaram em sua microbiota após as viagens com amostras produtoras de AmpC plasmidial do tipo *bla_{CMY-2}* e *bla_{CMY-4}*, o que é similar ao evidenciado por outros estudos. Por exemplo, Vading *et al.* (2016) e Paltasing *et al.* (2013) observaram a presença de AmpC plasmidial em apenas três amostras e no estudo de Lorme *et al.* (2018), que observou

11% de aquisição de cefalosporinases após as viagens internacionais, principalmente de *bla_{CMY-2}* e *bla_{CMY-4}*. Fica evidenciado que a aquisição de AmpC plasmidial é baixa quando comparada com aquisição de bactérias produtoras de ESBL.

Alguns estudos relatam a aquisição de Enterobacteriaceae apresentando gene *mcr* durante viagens, como nos estudos a seguir: 3 viajantes (Nakayama *et al.*, 2018), 5 (von Wintersdorff *et al.*, 2014), 6 viajantes (Arcilla *et al.*, 2017), porém esses casos são considerados esporádicos e pouco frequentes. No presente estudo não foi possível detectar nenhuma aquisição de *E. coli* carreadora do gene *mcr*.

Foi recuperada uma amostra de *E. coli* produtora de *bla_{OXA48}* após o retorno de um viajante da África subsaariana, tendo visitado Quênia, Tanzânia, Etiópia e Zâmbia. Naquele primeiro país foram descritas amostras produtoras de *bla_{OXA163}*, uma variante de *bla_{OXA48}*, e no segundo país *bla_{OXA48}* (Manenzhe *et al.*, 2015). Há ainda poucos estudos que mostram a aquisição de Enterobacteriaceae produtora de carbapenemases como no estudo de Ruppé *et al.* (2014) que observou aquisição em três viajantes retornando da Índia, sendo caracterizada por duas amostras de *E. coli* produtora de *bla_{OXA181}* e uma *E. coli* produtora de *bla_{NDM1}*.

A sensibilidade das amostras frente ao antimicrobiano amicacina tanto na ida quanto no retorno de viagens foi de 100%, o que é encontrado em outros estudos em que a amicacina é testada, sendo determinada sua frequência de resistência de 2% para o estudo de Östholm-Balkhed *et al.* (2013) e Lübbert *et al.* (2015) e 5% para Kuenzli *et al.* (2014).

6.4.2 Beta-lactamases de espectro estendido

A partir dos anos 2000, as ESBL do tipo CTX-M tornaram-se predominantes em comparação com as do tipo TEM e SHV, e foram amplamente identificadas em amostras de *E. coli* comensais e patogênicas de origem humana e animal distribuídas por todo o mundo (Pitout *et al.*, 2005; Poirel *et al.*, 2018). No presente estudo, o tipo predominante de ESBL encontrado foi CTX-M, corroborando a literatura. A difusão e disseminação da CTX-M é bastante eficiente ao ponto de não se limitar aos ambientes hospitalares, mas pode abranger também a comunidade, animais de maneira geral, sejam eles de corte, domésticos, ou selvagens. Essas enzimas são encontradas em amostras isoladas a partir do meio ambiente contendo águas fluviais e águas costeiras com influxo de esgoto (Chen *et al.*, 2010; Dhanji *et al.*, 2011; D'Andrea *et al.*, 2013; Montezzi *et al.*, 2015).

Considerando apenas os genes que codificam variantes de CTX-M encontradas antes da viagem, ou seja, aqueles presentes na microbiota dos viajantes antes de sair do Brasil, há casos diversos de *E. coli* produtora de ESBL do tipo CTX-M dos grupos 1, 2, 8 e 9. As variantes genéticas da família mais encontradas no Brasil são *bla*_{CTX-M2} e *bla*_{CTX-M15}, seguidas por *bla*_{CTX-M8} (Rocha *et al.*, 2016).

Em relação às variantes enzimáticas e o local de sua aquisição de *E. coli* produtora de ESBL, *bla*_{CTX-M15} foi uma variante adquirida em todos na maioria dos locais de destino de acordo com esse estudo. Vários outros mostram a dominância global dessa variante (Reuland, al Naiemi, *et al.*, 2016; Vading *et al.*, 2016; Arcilla *et al.*, 2017; Peirano *et al.*, 2017) seguido por *bla*_{CTX-M14}, adquirido em viagens para o Sudeste asiático, para América Central e para África (Sole *et al.*, 2014; Reuland, al Naiemi, *et al.*, 2016), dentre outros, sendo a segunda maior variante adquirida em viagens internacionais. *bla*_{CTX-M27} foi apenas adquirida por um viajante em uma viagem para o Sudeste asiático, um dado corroborado por Östholm-Balkhed *et al.* (2013) e Mizuno *et al.* (2016) que também observaram que a aquisição dessa variante se deu em sua maioria na Ásia, e no estudo de Lübbert *et al.* (2015).

6.5 Tipificação de amostras

6.5.1 Quanto ao grupo filogenético

A maioria das amostras de *E. coli* identificadas foram incluídas no grupo A ou C, como evidenciado também em outros estudos (Vading *et al.*, 2016; Maataoui *et al.*, 2018). O segundo filogrupo mais detectado dentre as amostras dos viajantes brasileiros foi B1 (Sole *et al.*, 2014). Dentre as amostras produtoras de ESBL pode-se observar que A ou C são os mais encontrados, seguido de D ou E, B1, B2 e F. O estudo de Vading *et al.* (2016) detectou em amostras produtoras de ESBL de retorno de viajantes suecos, essa mesma sequência de detecção encontrada no presente estudo. Sendo assim, os filogrupos não patogênicos como o A são os que dominam entre as amostras dos viajantes, pois são filogrupos que pertencem a microbiota intestinal de humanos, porém ainda sim foi possível detectar *E. coli* pertencentes aos filogrupos patogênicos extraintestinais como D, B2 ou até mesmo F nas amostras MR. Esses achados indicam que amostras que pertencem a filogrupos patogênicos extraintestinais podem ser encontrados colonizando a microbiota intestinal de viajantes antes e após as viagens.

6.5.2 Diversidade de genótipos de *fingerprinting*

Em relação a análise dos perfis de fragmentos de DNA amplificados por RAPD, observou-se 103 perfis, sendo três considerados indistinguíveis com 2 amostras cada perfil proveniente do mesmo viajante, ou seja, esses viajantes antes da viagem já possuíam *E. coli* MR em sua microbiota intestinal e após a viagem permaneceram com esse mesmo microrganismo em sua microbiota, nesse caso não houve aquisição de uma *E. coli* MR, mas sim apenas uma colonização que teve duração até o retorno desse participante. A partir do achado dos 100 perfis considerados únicos, pode-se observar uma diversidade de tipos entre as amostras, indicando que não havia clones dominantes circulando entre os participantes do estudo.

6.6 Análise de variáveis associadas a aquisição de *E. coli* multirresistente ou *E. coli* produtora de ESBL

Nesse estudo os fatores que estavam relacionados com aquisição de *E. coli* produtora de ESBL e *E. coli* MR foram a região de destino, sendo o Sudeste Asiático, seguido da África, Ásia e Índia. Em relação a local de destino, a literatura mostra que a viagem para a Ásia é o principal fator de risco associado com a aquisição de Enterobacteriaceae MR (Tängdén *et al.*, 2010; Ruppé *et al.*, 2015). Além da Ásia, outros continentes estão associados com essa aquisição, como o subcontinente Indiano, África do Norte e Oriente Médio (Armand-Lefèvre *et al.*, 2018).

O uso de antimicrobianos nos últimos 30 dias antes da viagem foi relacionado com a presença de amostras de *E. coli* produtoras de ESBL antes da viagem. De fato, a utilização de antimicrobianos modifica a composição da microbiota intestinal e interfere na sua principal função que é a proteção contra microrganismos estranhos àquele local, além de selecionar bactérias resistentes (Dethlefsen *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2017; Ruppé *et al.*, 2018).

Não houve relação entre episódios de diarreia e uso de antimicrobianos durante a viagem e a consequente aquisição de *E. coli* MR. Porém a utilização de antimicrobianos apresentou uma tendência dos valores encontrados nesse estudo, visto que a aquisição de *E. coli* MR em sua microbiota após o retorno da viagem ocorreu em 43% dos viajantes que utilizaram antimicrobiano. Na maioria dos estudos, a utilização de antimicrobianos (Kennedy e Collignon, 2010; Kantele *et al.*, 2015; Ruppé *et al.*, 2015; Reuland, al Naiemi, *et al.*, 2016; Vading *et al.*, 2016; Arcilla *et al.*, 2017) e a ocorrência de diarreia durante a viagem (Kennedy e Collignon, 2010;

Tängdén *et al.*, 2010; Östholm-Balkhed *et al.*, 2013; Lübbert *et al.*, 2015; Kantele *et al.*, 2015; Ruppé *et al.*, 2015; Vading *et al.*, 2016; Arcilla *et al.*, 2017) são fatores de risco para aquisição de *E. coli* MR. Porém, no presente estudo não foi observada essa associação, o que pode ter ocorrido devido à pouca utilização de antimicrobianos pelos viajantes brasileiros, e até mesmo devido aos episódios de diarreia terem sido relatados por poucos viajantes, se comparado a outros estudos em que o número de viajantes foi maior nos dois casos.

Observamos associação entre a viagem a turismo e visitar amigos e parentes com a aquisição de *E. coli* produtora de ESBL, como no estudo de Kuenzli *et al.* (2014). Não observamos relação entre tipo de hospedagem e aquisição de *E. coli* produtora de ESBL e MR; porém no estudo de Ruppé *et al.* (2015), os autores observaram associação entre práticas de acampamento e visitas a famílias e amigos e aquisição de Enterobacteriaceae MR. Pode-se propor que isso ocorra devido os viajantes estarem em determinado local a lazer e por esse motivo se alimentam de forma menos preocupada e se precisam se relacionar com pessoas dessa região, ou seja, os viajantes que estão a lazer estão menos preocupados com a alimentação ou com a ingestão de água. Por esse motivo o principal fator de risco para os viajantes que partem do Brasil para o presente estudo é a região de destino e a própria alimentação dos viajantes.

7 CONCLUSÕES

Foram analisados 153 viajantes brasileiros, sendo que 6,5% já estavam colonizados por *E. coli* produtora de ESBL e 9,8% por *E. coli* MR. A frequência de aquisição de *E. coli* produtora de ESBL em viagens foi de 20,3% e *E. coli* MR de 27,6%. Foi detectada maior frequência de aquisição de *E. coli* produtora de ESBL e *E. coli* MR em viagens para subcontinentes Sudeste Asiático e Índia.

A comparação entre a resistência aos antimicrobianos considerando todas as amostras isoladas antes da viagem e após o retorno revelou que as amostras obtidas após o retorno são significativamente mais resistentes à gentamicina, ampicilina, cefalosporinas de 1^a a 4^a gerações e sulfametoxazol+trimetoprim.

Nenhuma das amostras apresentou genes transferíveis de resistência à colistina (*mcr*). Apenas uma amostra de retorno apresentou resistência a ertapenem, e nesta amostra foi detectado o gene *bla*_{OXA-48}. Em relação aos genes que codificam ESBL, em todas as produtoras dessas enzimas foi detectado *bla*_{CTX-M}, sendo os mais frequentes após as viagens *bla*_{CTX-M15} e *bla*_{CTX-M14}, sendo o primeiro encontrado nas amostras de retorno dos viajantes que visitaram a maioria das regiões de destino e o segundo de viajantes que visitaram Sudeste Asiático e América do Sul (altitude).

Os filogrupos mais prevalentes foram A ou C, seguido de B1 e B2. No RAPD, foram observados 103 perfis, sendo que 3 continham duas amostras cada um com 100% de similaridade, caracterizando amostras do mesmo viajante e 100 diferentes caracterizando uma diversidade de perfis dentre as amostras estudadas.

A viagem a turismo e região de destino (Sudeste Asiático, Ásia e Índia e África) foram associados com a aquisição de *E. coli* produtora de ESBL e *E. coli* MR.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akova, M. (2016). Epidemiology of antimicrobial resistance in bloodstream infections. *Virulence*, 7, 252–266.
- Albornoz, E., Tijet, N., De Belder, D., Gomez, S., Martino, F., Corso, A., Melano, R. G., e Petroni, A. (2017). *qnrE1*, a member of a new family of plasmid-located quinolone resistance genes, originated from the chromosome of *Enterobacter* species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61, 1–8.
- Aldred, K. J., Kerns, R. J., e Osheroff, N. (2014). Mechanism of quinolone action and resistance. *Biochemistry*, 53, 1565–1574.
- Alizade, H. (2018). *Escherichia coli* in Iran: an overview of antibiotic resistance: a review article. *Iranian Journal of Public Health*, 47, 1–12.
- Amandeep Kaur, N. K., e Singh, S. (2017). Prevalence of ESBL and MBL producing gram negative isolates from various clinical samples in a tertiary care hospital. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6, 1423–1430.
- Ambler, R. P. (1980). The structure of beta-lactamases. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 289, 321–331.
- Arcilla, M. S., van Hattem, J. M., Bootsma, M. C., van Genderen, P. J., Goorhuis, A., Schultsz, C., Stobberingh, E. E., Verbrugh, H. A., de Jong, M. D., Melles, D. C., e Penders, J. (2014). The carriage of multiresistant bacteria after travel (COMBAT) prospective cohort study: methodology and design. *BMC Public Health*, 14, 1–8.
- Arcilla, M. S., van Hattem, J. M., Haverkate, M. R., Bootsma, M. C. J., van Genderen, P. J. J., Goorhuis, A., Grobusch, M. P., Lashof, A. M. O., Molhoek, N., Schultsz, C., Stobberingh, E. E., Verbrugh, H. A., de Jong, M. D., Melles, D. C., e Penders, J. (2017). Import and spread of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae by international travellers (COMBAT study): a prospective, multicentre cohort study. *The Lancet Infectious Diseases*, 17, 78–85.
- Armand-Lefèvre, L., Andremont, A., e Ruppé, E. (2018). Travel and acquisition of multidrug-resistant Enterobacteriaceae. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 48, 431–441.
- Barguigua, A., El Otmani, F., Talmi, M., Bourjilat, F., Haouzane, F., Zerouali, K., e Timinouni, M. (2011). Characterization of extended-spectrum -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from the community in Morocco. *Journal of Medical Microbiology*, 60, 1344–1352.
- Barlam, T. F., e Gupta, K. (2015). Antibiotic resistance spreads internationally across borders. *The Journal of Law, Medicine & Ethics*, 43, 12–16.
- Barreto Miranda, I., Ignatius, R., Pfüller, R., Friedrich-Jänicke, B., Steiner, F., Paland, M., Dieckmann, S., Schaufler, K., Wieler, L. H., Guenther, S., e Mockenhaupt, F. P. (2016). High carriage rate of ESBL-producing Enterobacteriaceae at presentation and follow-up among travellers with gastrointestinal complaints returning from India and Southeast Asia. *Journal of Travel Medicine*, 23, 1–7.
- Bauernfeind, A., Grimm, H., e Schweighart, S. (1990). A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Infection*, 18, 294–298.
- Bengtsson-Palme, J., Angelin, M., Huss, M., Kjellqvist, S., Kristiansson, E., Palmgren, H., Larsson, D. G. J., e Johansson, A. (2015). The human gut microbiome as a transporter of antibiotic resistance genes between continents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59, 6551–6560.
- Biehl, L. M., Schmidt-Hieber, M., Liss, B., Cornely, O. A., e Vehreschild, M. J. G. T. (2016). Colonization and infection with extended spectrum beta-lactamase producing Enterobacteriaceae in high-risk patients – Review of the literature from a clinical perspective. *Critical Reviews in Microbiology*, 42, 1–16.

- Bitrus, A., Chuanchuen, R., e Luangtongkum, T. (2018). Emergence of colistin resistance in extended-spectrum beta lactamase producing Enterobacteriaceae isolated from food animals and its public health implication: A review. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research*, 5, 1–11.
- Blyth, D. M., Mende, K., Maranich, A. M., Beckius, M. L., Harnisch, K. A., Rosemann, C. A., Zera, W. C., Murray, C. K., e Akers, K. S. (2016). Antimicrobial resistance acquisition after international travel in U.S. travelers. *Tropical Diseases, Travel Medicine and Vaccines*, 2, 1–8.
- Bonnet, R. (2004). Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48, 1–14.
- Bopp, C. A., Fields, P. I., Nataro, J. P., Strockbine, N. A., e Kaper, J. B. (2015). *Escherichia*, *Shigella*, and *Salmonella*. M. A. Pfaller, S. S. Richter, G. Funke, J. H. Jorgensen, M. L. Landry, K. C. Carroll, & D. W. Warnock (Eds), *Manual of Clinical Microbiology*, 11th Edition (p. 685–713). American Society of Microbiology.
- Botelho, L. A. B., Kraychete, G. B., Costa e Silva, J. L., Regis, D. V. V., Picão, R. C., Moreira, B. M., e Bonelli, R. R. (2015). Widespread distribution of CTX-M and plasmid-mediated AmpC β -lactamases in *Escherichia coli* from Brazilian chicken meat. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 110, 249–254.
- Bradford, P. A. (2001). Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clinical Microbiology Reviews*, 14, 933–951.
- Bush, K., e Jacoby, G. A. (2010). Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54, 969–976.
- Candela, M., Biagi, E., Turrone, S., Maccaferri, S., Figini, P., e Brigidi, P. (2015). Dynamic efficiency of the human intestinal microbiota. *Critical Reviews in Microbiology*, 41, 165–171.
- Cantón, R., González-Alba, J. M., e Galán, J. C. (2012). CTX-M enzymes: origin and diffusion. *Frontiers in Microbiology*, 3, 1–19.
- Chang, Q., Wang, W., Regev-Yochay, G., Lipsitch, M., e Hanage, W. P. (2015). Antibiotics in agriculture and the risk to human health: how worried should we be? *Evolutionary Applications*, 8, 240–247.
- Chaudhary, U., Agarwal, S., e Raghuraman, K. (2018). Identification of extended spectrum beta lactamases, AmpC and carbapenemase production among isolates of *Escherichia coli* in North Indian tertiary care centre. *Avicenna Journal of Medicine*, 8, 46–50.
- Chen, H., Shu, W., Chang, X., Chen, J., Guo, Y., e Tan, Y. (2010). The profile of antibiotics resistance and integrons of extended-spectrum beta-lactamase producing thermotolerant coliforms isolated from the Yangtze River basin in Chongqing. *Environmental Pollution*, 158, 2459–2464.
- Cheng, G., Hao, H., Dai, M., Liu, Z., e Yuan, Z. (2013). Antibacterial action of quinolones: from target to network. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 66, 555–562.
- Clermont, O., Bonacorsi, S., e Bingen, E. (2000). Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 4555–4558.
- Clermont, O., Bonacorsi, S., e Bingen, E. (2004). Characterization of an anonymous molecular marker strongly linked to *Escherichia coli* strains causing neonatal meningitis. *Journal of Clinical Microbiology*, 42, 1770–1772.
- Clermont, O., Christenson, J. K., Denamur, E., e Gordon, D. M. (2013). The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups: A new *E. coli* phylo-typing method. *Environmental Microbiology Reports*, 5, 58–65.
- Codjoe, F., e Donkor, E. (2017). Carbapenem resistance: a review. *Medical Sciences*, 6, 1.
- Courvalin, P. (2005). Antimicrobial drug resistance: “Prediction is very difficult, especially about the future”¹. *Emerging Infectious Diseases*, 11, 1503–1506.

- Croxen, M. A., Law, R. J., Scholz, R., Keeney, K. M., Wlodarska, M., e Finlay, B. B. (2013). Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 26, 822–880.
- Cundliffe, E. (1989). How antibiotic-producing organisms avoid suicide. *Annual Review of Microbiology*, 43, 207–233.
- Dalhoff, A. (2012). Resistance surveillance studies: a multifaceted problem—the fluoroquinolone example. *Infection*, 40, 239–262.
- D'Andrea, M. M., Arena, F., Pallecchi, L., e Rossolini, G. M. (2013). CTX-M-type β -lactamases: A successful story of antibiotic resistance. *International Journal of Medical Microbiology*, 303, 305–317.
- Davis, B. D. (1987). Mechanism of bactericidal action of aminoglycosides. *Microbiological Reviews*, 51, 341–350.
- Dethlefsen, L., Huse, S., Sogin, M. L., e Relman, D. A. (2008). The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing. *PLoS Biology*, 6, e280.
- Dhanji, H., Patel, R., Wall, R., Doumith, M., Patel, B., Hope, R., Livermore, D. M., e Woodford, N. (2011). Variation in the genetic environments of *bla*CTX-M-15 in *Escherichia coli* from the faeces of travellers returning to the United Kingdom. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66, 1005–1012.
- Doi, Y., e Arakawa, Y. (2007). 16S ribosomal RNA methylation: emerging resistance mechanism against aminoglycosides. *Clinical Infectious Diseases*, 45, 88–94.
- Doi, Y., Wachino, J., e Arakawa, Y. (2016). Aminoglycoside resistance. *Infectious Disease Clinics of North America*, 30, 523–537.
- Drawz, S. M., e Bonomo, R. A. (2010). Three decades of beta-lactamase inhibitors. *Clinical Microbiology Reviews*, 23, 160–201.
- Drlica, K., Malik, M., Kerns, R. J., e Zhao, X. (2008). Quinolone-mediated bacterial death. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52, 385–392.
- Durante-Mangoni, E., Grammatikos, A., Utili, R., e Falagas, M. E. (2009). Do we still need the aminoglycosides? *International Journal of Antimicrobial Agents*, 33, 201–205.
- Ellington, M. J., Livermore, D. M., Pitt, T. L., Hall, L. M. C., e Woodford, N. (2006). Mutators among CTX-M -lactamase-producing *Escherichia coli* and risk for the emergence of fosfomicin resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 58, 848–852.
- Fàbrega, A., Madurga, S., Giralt, E., e Vila, J. (2009). Mechanism of action of and resistance to quinolones. *Microbial Biotechnology*, 2, 40–61.
- Falagas, M. E., e Kasiakou, S. K. (2005). Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections., 40, 1333–1341.
- Falagas, M. E., e Karageorgopoulos, D. E. (2009). Extended-spectrum β -lactamase-producing organisms. *Journal of Hospital Infection*, 73, 345–354.
- Falagas, M. E., Maraki, S., Karageorgopoulos, D. E., Kastoris, A. C., Mavromanolakis, E., e Samonis, G. (2010). Antimicrobial susceptibility of multidrug-resistant (MDR) and extensively drug-resistant (XDR) Enterobacteriaceae isolates to fosfomicin. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 35, 240–243.
- Falagas, M. E., Vouloumanou, E. K., Samonis, G., e Vardakas, K. Z. (2016). Fosfomicin. *Clinical Microbiology Reviews*, 29, 321–347.
- Falagas, M. E., Athanasiaki, F., Voulgaris, G. L., Triarides, N. A., e Vardakas, K. Z. (2018). Resistance to fosfomicin: mechanisms, frequency and clinical consequences. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 53, 22–28.

Fernandes, R., Amador, P., e Prudêncio, C. (2013). β -Lactams: chemical structure, mode of action and mechanisms of resistance. *Reviews in Medical Microbiology*, 24, 7–17.

Frieri, M., Kumar, K., e Boutin, A. (2017). Antibiotic resistance. *Journal of Infection and Public Health*, 10, 369–378.

Gaarslev, K., e Stenderup, I. (1985). Changes during travel in the composition and antibiotic resistance pattern of the intestinal Enterobacteriaceae flora: results from a study of mecillinam prophylaxis against travellers' diarrhoea. *Current Medical Research and Opinion*, 9, 384–387.

Galimand, M., Courvalin, P., e Lambert, T. (2003). Plasmid-mediated high-level resistance to aminoglycosides in Enterobacteriaceae due to 16S rRNA methylation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47, 2565–2571.

Gao, R., Hu, Y., Li, Z., Sun, J., Wang, Q., Lin, J., Ye, H., Liu, F., Srinivas, S., Li, D., Zhu, B., Liu, Y.-H., Tian, G.-B., e Feng, Y. (2016). Dissemination and mechanism for the MCR-1 colistin resistance. *PLoS Pathogens*, 12, e1005957.

Garneau-Tsodikova, S., e Labby, K. J. (2016). Mechanisms of resistance to aminoglycoside antibiotics: overview and perspectives. *MedChemComm*, 7, 11–27.

Gerritsen, J., Smidt, H., Rijkers, G. T., e de Vos, W. M. (2011). Intestinal microbiota in human health and disease: the impact of probiotics. *Genes & Nutrition*, 6, 209–240.

Ghuysen, J. M. (1991). Serine beta-lactamases and penicillin-binding proteins. *Annual Review of Microbiology*, 45, 37–67.

Gomes, T. A. T., Elias, W. P., Scaletsky, I. C. A., Guth, B. E. C., Rodrigues, J. F., Piazza, R. M. F., Ferreira, L. C. S., e Martinez, M. B. (2016). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47, 3–30.

Haller, L., Chen, H., Ng, C., Le, T. H., Koh, T. H., Barkham, T., Sobsey, M., e Gin, K. Y.-H. (2018). Occurrence and characteristics of extended-spectrum β -lactamase- and carbapenemase- producing bacteria from hospital effluents in Singapore. *Science of The Total Environment*, 615, 1119–1125.

Hansen, L. H., Jensen, L. B., Sørensen, H. I., e Sørensen, S. J. (2007). Substrate specificity of the *OqxAB* multidrug resistance pump in *Escherichia coli* and selected enteric bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60, 145–147.

Harris, P. (2015). Clinical management of infections caused by Enterobacteriaceae that express extended-spectrum β -lactamase and AmpC enzymes. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, 36, 056–073.

Hassing, R. J., Alsmas, J., Arcilla, M. S., Genderen, P. J., Stricker, B. H., e Verbon, A. (2015). International travel and acquisition of multidrug-resistant Enterobacteriaceae: a systematic review. *Journal of Travel Medicine*, 20, 14.

Hendlin, D., Stapley, E. O., Jackson, M., Wallick, H., Miller, A. K., Wolf, F. J., Miller, T. W., Chaiet, L., Kahan, F. M., Foltz, E. L., Woodruff, H. B., Mata, J. M., Hernandez, S., e Mochales, S. (1969). Phosphonomycin, a new antibiotic produced by strains of *Streptomyces*. *Science*, 166, 122–123.

Hermann, T. (2007). Aminoglycoside antibiotics: old drugs and new therapeutic approaches. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64, 1841–1852.

Herrera-León, S., Llorente, M. T., e Sánchez, S. (2016). Plasmid-mediated quinolone resistance in different diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes responsible for complicated, noncomplicated, and traveler's diarrhea cases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60, 1950–1951.

Ho, P.-L., Tse, C. W.-S., Que, T.-L., Ng, T.-K., Chu, Y. P.-S., Chow, K.-H., Law, P. Y., Lo, W.-U., e Cheng, V. C.-C. (2015). High prevalence of *Escherichia coli* sequence type 131 among antimicrobial-resistant *E. coli* isolates from geriatric patients. *Journal of Medical Microbiology*, 64, 243–247.

- Ho, P.-L., Ng, K.-Y., Lo, W.-U., Law, P. Y., Lai, E. L.-Y., Wang, Y., e Chow, K.-H. (2016). Plasmid-mediated *OqxAB* is an important mechanism for nitrofurantoin resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60, 537–543.
- Höltje, J.-V. (1998). Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of *Escherichia coli*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62, 181–203.
- Hooper, D. C., e Jacoby, G. A. (2015). Mechanisms of drug resistance: quinolone resistance. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1354, 12–31.
- Hossain, A., Ferraro, M. J., Pino, R. M., Dew, R. B., Moland, E. S., Lockhart, T. J., Thomson, K. S., Goering, R. V., e Hanson, N. D. (2004). Plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing enzyme KPC-2 in an *Enterobacter* sp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48, 4438–4440.
- Huang, D. B., e Dupont, H. L. (2004). Enteroaggregative *Escherichia coli*: an emerging pathogen in children. *Seminars in Pediatric Infectious Diseases*, 15, 266–271.
- Huttner, A., Verhaegh, E. M., Harbarth, S., Muller, A. E., Theuretzbacher, U., e Mouton, J. W. (2015). Nitrofurantoin revisited: a systematic review and meta-analysis of controlled trials. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 70, 2456–2464.
- Ianiro, G., Tilg, H., e Gasbarrini, A. (2016). Antibiotics as deep modulators of gut microbiota: between good and evil. *Gut*, 65, 1906–1915.
- Jacoby, G. A. (2009). AmpC -lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*, 22, 161–182.
- Jacoby, G. A., Strahilevitz, J., e Hooper, D. C. (2014). Plasmid-mediated quinolone resistance. *Microbiology spectrum*, 2, 1–42.
- Jarlier, V., Nicolas, M. H., Fournier, G., e Philippon, A. (1988). Extended broad-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Reviews of Infectious Diseases*, 10, 867–878.
- Javan, A. O., Shokouhi, S., e Sahraei, Z. (2015). A review on colistin nephrotoxicity. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 71, 801–810.
- Jean, S.-S., Lee, W.-S., Lam, C., Hsu, C.-W., Chen, R.-J., e Hsueh, P.-R. (2015). Carbapenemase-producing Gram-negative bacteria: current epidemics, antimicrobial susceptibility and treatment options. *Future Microbiology*, 10, 407–425.
- Jernberg, C., Lofmark, S., Edlund, C., e Jansson, J. K. (2010). Long-term impacts of antibiotic exposure on the human intestinal microbiota. *Microbiology*, 156, 3216–3223.
- Kahan, F. M., Kahan, J. S., Cassidy, P. J., e Kropp, H. (1974). The mechanism of action of fosfomycin (phosphonomycin). *Annals of the New York Academy of Sciences*, 235, 364–386.
- Kantele, A., Laaveri, T., Mero, S., Vilkinan, K., Pakkanen, S. H., Ollgren, J., Antikainen, J., e Kirveskari, J. (2015). Antimicrobials increase travelers' risk of colonization by extended-spectrum beta-lactamase producing Enterobacteriaceae. *Clinical Infectious Diseases*, 60, 837–846.
- Kaper, J. B., Nataro, J. P., e Mobley, H. L. T. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 2, 123–140.
- Kempf, I., Jouy, E., e Chauvin, C. (2016). Colistin use and colistin resistance in bacteria from animals. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 48, 598–606.
- Kennedy, K., e Collignon, P. (2010). Colonisation with *Escherichia coli* resistant to “critically important” antibiotics: a high risk for international travellers. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 29, 1501–1506.
- Kim, S., Covington, A., e Pamer, E. G. (2017). The intestinal microbiota: Antibiotics, colonization resistance, and enteric pathogens. *Immunological Reviews*, 279, 90–105.

- Köhler, C.-D., e Dobrindt, U. (2011). What defines extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*? International Journal of Medical Microbiology, 301, 642–647.
- Kotra, L. P., Haddad, J., e Mobashery, S. (2000). Aminoglycosides: perspectives on mechanisms of action and resistance and strategies to counter resistance. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 44, 3249–3256.
- Krause, K. M., Serio, A. W., Kane, T. R., e Connolly, L. E. (2016). Aminoglycosides: an overview. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, 6, a027029.
- Kraychete, G. B., Botelho, L. A. B., Campana, E. H., Picão, R. C., e Bonelli, R. R. (2016). Updated multiplex PCR for detection of all six plasmid-mediated *qnr* gene families. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 60, 7524–7526.
- Kuenzli, E., Jaeger, V. K., Frei, R., Neumayr, A., DeCrom, S., Haller, S., Blum, J., Widmer, A. F., Furrer, H., Battegay, M., Endimiani, A., e Hatz, C. (2014). High colonization rates of extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* in Swiss Travellers to South Asia— a prospective observational multicentre cohort study looking at epidemiology, microbiology and risk factors. BMC Infectious Diseases, 14, 528.
- Kuenzli, E. (2016). Antibiotic resistance and international travel: Causes and consequences. Travel Medicine and Infectious Disease, 14, 595–598.
- Lääveri, T., Vilkinan, K., Pakkanen, S. H., Kirveskari, J., e Kantele, A. (2018). A prospective study of travellers' diarrhoea: analysis of pathogen findings by destination in various (sub)tropical regions. Clinical Microbiology and Infection, 24, 908.e9-908.e16.
- Lahlaoui, H., Ben Haj Khalifa, A., e Ben Moussa, M. (2014). Epidemiology of Enterobacteriaceae producing CTX-M type extended spectrum β -lactamase (ESBL). Médecine et Maladies Infectieuses, 44, 400–404.
- Langford, B., e Schwartz, K. (2018). Bringing home unwelcome souvenirs: Travel and drug-resistant bacteria. Canada Communicable Disease Report, 44, 277–282.
- Lautenbach, E., Harris, A. D., Perencevich, E. N., Nachamkin, I., Tolomeo, P., e Metlay, J. P. (2005). Test characteristics of perirectal and rectal swab compared to stool sample for detection of fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* in the gastrointestinal tract. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 49, 798–800.
- Lazarus, B., Paterson, D. L., Mollinger, J. L., e Rogers, B. A. (2015). Do human extraintestinal *Escherichia coli* infections resistant to expanded-spectrum cephalosporins originate from food-producing animals? A systematic review. Clinical Infectious Diseases, 60, 439–452.
- Lim, L. M., Ly, N., Anderson, D., Yang, J. C., Macander, L., Jarkowski, A., Forrest, A., Bulitta, J. B., e Tsuji, B. T. (2010). Resurgence of colistin: A review of resistance, toxicity, pharmacodynamics, and dosing. Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy, 30, 1279–1291.
- Lipsitch, M., Singer, R. S., e Levin, B. R. (2002). Antibiotics in agriculture: When is it time to close the barn door? Proceedings of the National Academy of Sciences, 99, 5752–5754.
- Liu, Y.-Y., Wang, Y., Walsh, T. R., Yi, L.-X., Zhang, R., Spencer, J., Doi, Y., Tian, G., Dong, B., Huang, X., Yu, L.-F., Gu, D., Ren, H., Chen, X., Lv, L., He, D., Zhou, H., Liang, Z., Liu, J.-H., e Shen, J. (2016). Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. The Lancet Infectious Diseases, 16, 161–168.
- Lopez, J. A., Correa, A., Navon-Venezia, S., Correa, A. L., Torres, J. A., Briceño, D. F., Montealegre, M. C., Quinn, J. P., Carmeli, Y., e Villegasz, M. V. (2011). Intercontinental spread from Israel to Colombia of a KPC-3-producing *Klebsiella pneumoniae* strain. Clinical Microbiology and Infection, 17, 52–56.

- López-Cerero, L., e Almirante, B. (2014). Epidemiology of infections caused by carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: Reservoirs and transmission mechanisms. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 32, 10–16.
- Lorme, F., Maataoui, N., Rondinaud, E., Esposito-Farèse, M., Clermont, O., Ruppe, E., Arlet, G., Genel, N., the VOYAG-R study group, Matheron, S., Andremont, A., e Armand-Lefevre, L. (2018). Acquisition of plasmid-mediated cephalosporinase producing Enterobacteriaceae after a travel to the tropics. *PLOS ONE*, 13, e0206909.
- Lozupone, C. A., Stombaugh, J. I., Gordon, J. I., Jansson, J. K., e Knight, R. (2012). Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature*, 489, 220–230.
- Lu, S., Jin, D., Wu, S., Yang, J., Lan, R., Bai, X., Liu, S., Meng, Q., Yuan, X., Zhou, J., Pu, J., Chen, Q., Dai, H., Hu, Y., Xiong, Y., Ye, C., e Xu, J. (2016). Insights into the evolution of pathogenicity of *Escherichia coli* from genomic analysis of intestinal *E. coli* of Marmota himalayana in Qinghai–Tibet plateau of China. *Emerging Microbes & Infections*, 5, e122–e122.
- Lübbert, C., Straube, L., Stein, C., Makarewicz, O., Schubert, S., Mössner, J., Pletz, M. W., e Rodloff, A. C. (2015). Colonization with extended-spectrum beta-lactamase-producing and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in international travelers returning to Germany. *International Journal of Medical Microbiology*, 305, 148–156.
- Ma, L.; Wang, J.-T.; Wu, T.-L.; Siu, L.K.; Chuang, Y.-C.; Lin, J.-C.; Lu, M.-C.; Lu, P.-O. (2015). Emergence of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan. *PLoS ONE*, 10, e0139152.
- Maataoui, N., Mayet, A., Duron, S., Delacour, H., Mentré, F., Laouenan, C., Desvillechabrol, D., Cokelaer, T., Meynard, J. B., Ducher, A., Andremont, A., Armand-Lefèvre, L., e Mérens, A. (2018). High acquisition rate of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae among French military personnel on mission abroad, without evidence of inter-individual transmission. *Clinical Microbiology and Infection*, 1, 1–9.
- Madico, G., Akopyants, N. S., e Berg, D. E. (1995). Arbitrarily primed PCR DNA fingerprinting of *Escherichia coli* O157:H7 strains by using templates from boiled cultures. *Journal of Clinical Microbiology*, 33, 1534–1536.
- Magiorakos, A.-P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., Harbarth, S., Hindler, J. F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D. L., Rice, L. B., Stelling, J., Struelens, M. J., Vatopoulos, A., Weber, J. T., e Monnet, D. L. (2011). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, 18, 268–281.
- Magnet, S., e Blanchard, J. S. (2005). Molecular insights into aminoglycoside action and resistance. *Chemical Reviews*, 105, 477–498.
- Marsik, F. J., e Nambiar, S. (2011). Review of carbapenemases and AmpC-beta Lactamases: The Pediatric Infectious Disease Journal, 30, 1094–1095.
- Martínez, J. L., e Baquero, F. (2014). Emergence and spread of antibiotic resistance: setting a parameter space. *Upsala Journal of Medical Sciences*, 119, 68–77.
- Martínez-Martínez, L., Pascual, A., e Jacoby, G. A. (1998). Quinolone resistance from a transferable plasmid. *The Lancet*, 351, 797–799.
- Martins, F. S., Pedro, L. G., Castinneiras, T. M. P. P., e Igreja, R. P. (2005). Viagens e Saúde. Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias. 1a Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- Mathers, A. J., Peirano, G., e Pitout, J. D. D. (2015). The role of epidemic resistance plasmids and international high-risk clones in the spread of multidrug-resistant Enterobacteriaceae. *Clinical Microbiology Reviews*, 28, 565–591.
- McCalla, D. R., Kaiser, C., e Green, M. H. L. (1978). Genetics of nitrofurazone resistance in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 133, 10–16.

- McOsker, C. C., e Fitzpatrick, P. M. (1994). Nitrofurantoin: Mechanism of action and implications for resistance development in common uropathogens. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 33, 23–30.
- Mendes, R. E., Kiyota, K. A., Monteiro, J., Castanheira, M., Andrade, S. S., Gales, A. C., Pignatari, A. C. C., e Tufik, S. (2007). Rapid detection and identification of metallo-beta-lactamase-encoding genes by multiplex real-time PCR assay and melt curve analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 45, 544–547.
- Mizuno, Y., Miura, Y., Yamaguchi, T., e Matsumoto, T. (2016). Extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae colonisation in long-term overseas business travellers. *Travel Medicine and Infectious Disease*, 14, 561–567.
- Mohsen, S. M. Y., Hamzah, H. A., e Mustafa, M. I. A.-D. (2018). Phenotypic and molecular study of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in a referral hospital in the East coast Malaysia. *International Journal of Health & Allied Sciences*, 7, 17–22.
- Monaco, M., Giani, T., Raffone, M., Arena, F., Garcia-Fernandez, A., Pollini, S., Network EuSCAPE-Italy, collective, Grundmann, H., Pantosti, A., e Rossolini, G. M. (2014). Colistin resistance superimposed to endemic carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: a rapidly evolving problem in Italy, November 2013 to April 2014. *Eurosurveillance*, 19.
- Montezzi, L. F., Campana, E. H., Corrêa, L. L., Justo, L. H., Paschoal, R. P., da Silva, I. L. V. D., Souza, M. do C. M., Drolshagen, M., e Picão, R. C. (2015). Occurrence of carbapenemase-producing bacteria in coastal recreational waters. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 45, 174–177.
- Moura, A., Nicolau, A., Hooton, T., e Azeredo, J. (2009). Antibiotherapy and pathogenesis of uncomplicated UTI: difficult relationships. *Journal of Applied Microbiology*, 106, 1779–1791.
- Moxon, C. A., e Paulus, S. (2016). Beta-lactamases in Enterobacteriaceae infections in children. *Journal of Infection*, 72, S41–S49.
- Mulder, M., Kieffe-de Jong, J. C., Goessens, W. H. F., de Visser, H., Ikram, M. A., Verbon, A., e Stricker, B. H. (2018). Diet as a risk factor for antimicrobial resistance in community-acquired urinary tract infections in a middle-aged and elderly population: a case-control study. *Clinical Microbiology and Infection*.
- Muloi, D., Ward, M. J., Pedersen, A. B., Fèvre, E. M., Woolhouse, M. E. J., e van Bunnik, B. A. D. (2018). Are food animals responsible for transfer of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* or their resistance determinants to human populations? A systematic review. *Foodborne Pathogens and Disease*, 15, 467–474.
- Munoz-Davila, M. J. (2014). Role of old antibiotics in the era of antibiotic resistance. Highlighted nitrofurantoin for the treatment of lower urinary tract infections. *Antibiotics*, 3, 39–48.
- Murray, B. E., Mathewson, J. J., DuPont, H. L., Ericsson, C. D., e Reves, R. R. (1990). Emergence of resistant fecal *Escherichia coli* in travelers not taking prophylactic antimicrobial agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 34, 515–518.
- Murray, C. K., e Blyth, D. M. (2017). Acquisition of multidrug-resistant gram-negative organisms during travel. *Military Medicine*, 182, 26–33.
- Nakayama, T., Kumeda, Y., Kawahara, R., Yamaguchi, T., e Yamamoto, Y. (2018). Carriage of colistin-resistant, extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* harboring the *mcr-1* resistance gene after short-term international travel to Vietnam. *Infection and Drug Resistance*, 11, 391–395.
- Nandy, S., Das, A., e Dudeja, M. (2015). Prevalence of metallo beta lactamase in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in a tertiary care hospital. *International Journal of Community Medicine and Public Health*, 2, 566–569.
- Nataro, J. P., e Kaper, J. B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 11, 142–201.

- Nordmann, P., Naas, T., e Poirel, L. (2011). Global spread of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerging Infectious Diseases*, 17, 1791–1798.
- Nordmann, P. (2014). Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: Overview of a major public health challenge. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 44, 51–56.
- Nüesch-Inderbilen, M., Abgottspon, H., Sägger, G., Cernela, N., e Stephan, R. (2015). Antimicrobial susceptibility of travel-related *Salmonella enterica* serovar Typhi isolates detected in Switzerland (2002–2013) and molecular characterization of quinolone resistant isolates. *BMC Infectious Diseases*, 15.
- Okeke, I. N., e Edelman, R. (2001). Dissemination of antibiotic-resistant bacteria across geographic borders. *Clinical Infectious Diseases*, 33, 364–369.
- Oliphant, C. M., e Green, G. M. (2002). Quinolones: a comprehensive review. *American Family Physician*, 65, 455–464.
- Oliveira, C. F. de, Forno, N. L. F. D., Alves, I. A., Horta, J. A., Rieger, A., e Alves, S. H. (2009). Prevalência das famílias TEM, SHV e CTX-M de β -lactamases de espectro estendido em *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp no Hospital Universitário de Santa Maria, Estado do Rio Grande do Sul. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 42, 556–560.
- OMS, Organização Mundial da Saúde. OMS publica lista inédita de bactérias resistentes a antibióticos Disponível em: <https://www.who.int/>. Acesso em 11/05/2019.
- Östholm-Balkhed, Å., Tärnberg, M., Nilsson, M., Nilsson, L. E., Hanberger, H., e Hällgren, A. (2013). Travel-associated faecal colonization with ESBL-producing Enterobacteriaceae: incidence and risk factors. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68, 2144–2153.
- Paltansing, S., Vlot, J. A., Kraakman, M. E. M., Mesman, R., Bruijning, M. L., Bernards, A. T., Visser, L. G., e Veldkamp, K. E. (2013). Extended-spectrum β -Lactamase-producing Enterobacteriaceae among travelers from the Netherlands. *Emerging Infectious Diseases*, 19, 1206–1213.
- Park, C. H., Robicsek, A., Jacoby, G. A., Sahm, D., e Hooper, D. C. (2006). Prevalence in the United States of *aac(6)-Ib-cr* encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50, 3953–3955.
- Paterson, D. L., e Bonomo, R. A. (2005). Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update. *Clinical Microbiology Reviews*, 18, 657–686.
- Peirano, G., Laupland, K. B., Gregson, D. B., e Pitout, J. D. D. (2011). Colonization of returning travelers with CTX-M-producing *Escherichia coli*. *Journal of Travel Medicine*, 18, 299–303.
- Peirano, G., Gregson, D. B., Kuhn, S., Vanderkooi, O. G., Nobrega, D. B., e Pitout, J. D. D. (2017). Rates of colonization with extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* in Canadian travellers returning from South Asia: a cross-sectional assessment. *CMAJ Open*, 5, E850–E855.
- Perez, F., e Van Duin, D. (2013). Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: A menace to our most vulnerable patients. *Cleveland Clinic Journal of Medicine*, 80, 225–233.
- Pérez-Pérez, F. J., e Hanson, N. D. (2002). Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 40, 2153–2162.
- Perreten, V., e Boerlin, P. (2003). A new sulfonamide resistance gene (*sul3*) in *Escherichia coli* is widespread in the pig population of Switzerland. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47, 1169–1172.
- Peterson, L. R. (2009). Bad bugs, no drugs: no ESCAPE revisited. *Clinical Infectious Diseases*, 49, 992–993.
- Pfeifer, Y., Cullik, A., e Witte, W. (2010). Resistance to cephalosporins and carbapenems in gram-negative bacterial pathogens. *International Journal of Medical Microbiology*, 300, 371–379.

- Philippe, J., Gallet, B., Morlot, C., Denapate, D., Hakenbeck, R., Chen, Y., Vernet, T., e Zapun, A. (2015). Mechanism of β -lactam action in *Streptococcus pneumoniae*: the piperacillin paradox. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59, 609–621.
- Philippon, A., Arlet, G., e Jacoby, G. A. (2002). Plasmid-determined AmpC-type β -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46, 1–11.
- Pitout, J. D. D., Nordmann, P., Laupland, K. B., e Poirel, L. (2005). Emergence of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) in the community. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56, 52–59.
- Pitout, J. D., e Laupland, K. B. (2008). Extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. *The Lancet Infectious Diseases*, 8, 159–166.
- Pitout, J. D. (2012). Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: an update on antimicrobial resistance, laboratory diagnosis and treatment. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 10, 1165–1176.
- Poirel, L., Naas, T., Nicolas, D., Collet, L., Bellais, S., Cavallo, J.-D., e Nordmann, P. (2000). Characterization of *VIM-2*, a carbapenem-hydrolyzing metallo- β -lactamase and its plasmid- and integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44, 891–897.
- Poirel, L., Héritier, C., Tolün, V., e Nordmann, P. (2004). Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48, 15–22.
- Poirel, L., Benouda, A., Hays, C., e Nordmann, P. (2011). Emergence of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in Morocco. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66, 2781–2783.
- Poirel, L., Ros, A., Carrer, A., Fortineau, N., Carricajo, A., Berthelot, P., e Nordmann, P. (2011). Cross-border transmission of OXA-48-producing *Enterobacter cloacae* from Morocco to France. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66, 1181–1182.
- Poirel, L., Madec, J.-Y., Lupo, A., Schink, A.-K., Kieffer, N., Nordmann, P., e Schwarz, S. (2018). Antimicrobial resistance in *Escherichia coli*. Schwarz, Cavaco, & Shen (Eds), *Antimicrobial Resistance in Bacteria from Livestock and Companion Animals* (Vol. 6, p. 289–316). American Society of Microbiology.
- Qiao, M., Ying, G.-G., Singer, A. C., e Zhu, Y.-G. (2018). Review of antibiotic resistance in China and its environment. *Environment International*, 110, 160–172.
- Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K. S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Levenez, F., Yamada, T., Mende, D. R., Li, J., Xu, J., Li, S., Li, D., Cao, J., Wang, B., Liang, H., Zheng, H., Xie, Y., Tap, J., Lepage, P., Bertalan, M., Batto, J.-M., Hansen, T., Le Paslier, D., Linneberg, A., Nielsen, H. B., Pelletier, E., Renault, P., Sicheritz-Ponten, T., Turner, K., Zhu, H., Yu, C., Li, S., Jian, M., Zhou, Y., Li, Y., Zhang, X., Li, S., Qin, N., Yang, H., Wang, J., Brunak, S., Doré, J., Guarner, F., Kristiansen, K., Pedersen, O., Parkhill, J., Weissenbach, J., MetaHIT Consortium, Antolin, M., Artiguenave, F., Blottiere, H., Borruel, N., Bruls, T., Casellas, F., Chervaux, C., Cultrone, A., Delorme, C., Denariáz, G., Dervyn, R., Forte, M., Friss, C., van de Guchte, M., Guedon, E., Haimet, F., Jamet, A., Juste, C., Kaci, G., Kleerebezem, M., Knol, J., Kristensen, M., Layec, S., Le Roux, K., Leclerc, M., Maguin, E., Melo Minardi, R., Oozeer, R., Rescigno, M., Sanchez, N., Tims, S., Torrejon, T., Varela, E., de Vos, W., Winogradsky, Y., Zoetendal, E., Bork, P., Ehrlich, S. D., e Wang, J. (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, 464, 59–65.
- Queenan, A. M., e Bush, K. (2007). Carbapenemases: the versatile β -Lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*, 20, 440–458.
- Radice, M., Power, P., Di Conza, J., Gutkind, G., Bonnet, R., Sirot, D., Sirot, J., e Labia, R. (2002). Early dissemination of CTX-M-derived enzymes in South America. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46, 602–604.

- Ramirez, M. S., e Tolmasky, M. E. (2010). Aminoglycoside modifying enzymes. Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy, 13, 151–171.
- Rawat, D., e Nair, D. (2010). Extended-spectrum β -lactamases in gram negative bacteria. Journal of Global Infectious Diseases, 2, 263–274.
- Ray, S., Anand, D., Purwar, S., Samanta, A., Upadhye, K. V., Gupta, P., e Dhar, D. (2018). Association of high mortality with extended–spectrum β -lactamase (ESBL) positive cultures in community acquired infections. Journal of Critical Care, 44, 255–260.
- Rebelo, A. R., Bortolaia, V., Kjeldgaard, J. S., Pedersen, S. K., Leekitcharoenphon, P., Hansen, I. M., Guerra, B., Malorny, B., Borowiak, M., Hammerl, J. A., Battisti, A., Franco, A., Alba, P., Perrin-Guyomard, A., Granier, S. A., De Frutos Escobar, C., Malhotra-Kumar, S., Villa, L., Carattoli, A., e Hendriksen, R. S. (2018). Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated colistin resistance determinants, *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* and *mcr-5* for surveillance purposes. Eurosurveillance, 23, 1–11.
- Recchia, G. D., e Hall, R. M. (1995). Gene cassettes: a new class of mobile element. Microbiology, 141, 3015–3027.
- Redgrave, L. S., Sutton, S. B., Webber, M. A., e Piddock, L. J. V. (2014). Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. Trends in Microbiology, 22, 438–445.
- Reuland, E. A., al Naiemi, N., Kaiser, A. M., Heck, M., Kluytmans, J. A. J. W., Savelkoul, P. H. M., Elders, P. J. M., e Vandenbroucke-Grauls, C. M. J. E. (2016). Prevalence and risk factors for carriage of ESBL-producing Enterobacteriaceae in Amsterdam. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 71, 1076–1082.
- Reuland, E. A., Sonder, G. J. B., Stolte, I., al Naiemi, N., Koek, A., Linde, G. B., van de Laar, T. J. W., Vandenbroucke-Grauls, C. M. J. E., e van Dam, A. P. (2016). Travel to Asia and traveller’s diarrhoea with antibiotic treatment are independent risk factors for acquiring ciprofloxacin-resistant and extended spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae—a prospective cohort study. Clinical Microbiology and Infection, 22, 731.e1-731.e7.
- Rice, L. B. (2008). Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE. The Journal of Infectious Diseases, 197, 1079–1081.
- Rice, L. B. (2012). Mechanisms of resistance and clinical relevance of resistance to β -Lactams, glycopeptides, and fluoroquinolones. Mayo Clinic Proceedings, 87, 198–208.
- Riddle, M. S., e Connor, B. A. (2016). The Traveling Microbiome. Current Infectious Disease Reports, 18, 1–13.
- Rieber, H., Frontzek, A., e Pfeifer, Y. (2012). Emergence of metallo- β -Lactamase GIM-1 in a clinical isolate of *Serratia marcescens*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 56, 4945–4947.
- Riley, L. W. (2014). Pandemic lineages of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. Clinical Microbiology and Infection, 20, 380–390.
- Robicsek, A., Strahilevitz, J., Jacoby, G. A., Macielag, M., Abbanat, D., Hye Park, C., Bush, K., e Hooper, D. C. (2006). Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. Nature Medicine, 12, 83–88.
- Robins-Browne, R. M. (1987). Traditional enteropathogenic *Escherichia coli* of infantile diarrhea. Reviews of Infectious Diseases, 9, 28–53.
- Robins-Browne, R. M., Holt, K. E., Ingle, D. J., Hocking, D. M., Yang, J., e Tauschek, M. (2016). Are *Escherichia coli* pathotypes still relevant in the era of whole-genome sequencing? Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 6, 1–9.

- Rocha, F. R., Pinto, V. P. T., e Barbosa, F. C. B. (2016). The spread of CTX-M-type extended-spectrum β -lactamases in Brazil: a systematic review. *Microbial Drug Resistance*, 22, 301–311.
- Rodrigues, K. M. de P., e Moreira, B. M. (2018). Preventing diseases in round-the-world travelers: a contemporary challenge for travel medicine advice. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 51, 125–132.
- Rogers, B. A., Aminzadeh, Z., Hayashi, Y., e Paterson, D. L. (2011). Country-to-country transfer of patients and the risk of multi-resistant bacterial infection. *Clinical Infectious Diseases*, 53, 49–56.
- Rolain, J. M., Parola, P., e Cornaglia, G. (2010). New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM-1): towards a new pandemic? *Clinical Microbiology and Infection*, 16, 1699–1701.
- Ruiz, J. (2003). Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51, 1109–1117.
- Ruppé, E., Armand-Lefèvre, L., Estellat, C., El-Mniai, A., Boussadia, Y., Consigny, P. H., Girard, P. M., Vittecoq, D., Bouchaud, O., Pialoux, G., Esposito-Farèse, M., Coignard, B., Lucet, J. C., Andremont, A., e Matheron, S. (2014). Acquisition of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae by healthy travellers to India, France, February 2012 to March 2013. *Euro Surveillace: Bulletin Europeen Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin*, 19, 20768.
- Ruppé, E., Armand-Lefèvre, L., Estellat, C., Consigny, P.-H., El Mniai, A., Boussadia, Y., Goujon, C., Ralaimazava, P., Campa, P., Girard, P.-M., Wyplosz, B., Vittecoq, D., Bouchaud, O., Le Loup, G., Pialoux, G., Perrier, M., Wieder, I., Moussa, N., Esposito-Farèse, M., Hoffmann, I., Coignard, B., Lucet, J.-C., Andremont, A., e Matheron, S. (2015). High rate of acquisition but short duration of carriage of multidrug-resistant Enterobacteriaceae after travel to the tropics. *Clinical Infectious Diseases*, 61, 593–600.
- Ruppé, E., Andremont, A., e Armand-Lefèvre, L. (2018). Digestive tract colonization by multidrug-resistant Enterobacteriaceae in travellers: An update. *Travel Medicine and Infectious Disease*, 21, 28–35.
- Sahl, J. W., Morris, C. R., e Rasko, D. A. (2013). Comparative genomics of pathogenic *Escherichia coli*. *Escherichia coli* (p. 21–43). Elsevier.
- Sandegren, L., Lindqvist, A., Kahlmeter, G., e Andersson, D. I. (2008). Nitrofurantoin resistance mechanism and fitness cost in *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 62, 495–503.
- Sanders, C. C. (1987). Chromosomal cephalosporinases responsible for multiple resistance to newer β -lactam antibiotics. *Annual Review of Microbiology*, 41, 573–594.
- Sastry, S., e Doi, Y. (2016). Fosfomycin: resurgence of an old companion. *Journal of infection and chemotherapy : official journal of the Japan Society of Chemotherapy*, 22, 273–280.
- Schatz, A., e Waksman, S. A. (1944). Effect of streptomycin and other antibiotic substances upon *Mycobacterium tuberculosis* and related organisms. *Experimental Biology and Medicine*, 57, 244–248.
- Seiffert, S. N., Perreten, V., Johannes, S., Droz, S., Bodmer, T., e Endimiani, A. (2014). OXA-48 carbapenemase-producing *Salmonella enterica* serovar Kentucky isolate of sequence type 198 in a patient transferred from Libya to Switzerland. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58, 2446–2449.
- Sekyere, J. O. (2018). Genomic insights into nitrofurantoin resistance mechanisms and epidemiology in clinical Enterobacteriaceae. *Future Science OA*, 4.
- Shah, R. R., e Wade, G. (1989). Reappraisal of the risk/benefit of nitrofurantoin: review of toxicity and efficacy. *Adverse Drug Reactions and Acute Poisoning Reviews*, 8, 183–201.
- Shahid, M., Singh, A., Sobia, F., Patel, M., Khan, H. M., Malik, A., e Shukla, I. (2011). An overview of CTX-M β -lactamases: *Reviews in Medical Microbiology*, 22, 28–40.

- Shaikh, S., Fatima, J., Shakil, S., Rizvi, S. Mohd. D., e Kamal, M. A. (2015). Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: types, epidemiology and treatment. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 22, 90–101.
- Shakil, S., Khan, R., Zarrilli, R., e Khan, A. U. (2007). Aminoglycosides versus bacteria – a description of the action, resistance mechanism, and nosocomial battleground. *Journal of Biomedical Science*, 15, 5–14.
- Shakti, L., e Veeraraghavan, B. (2015). Advantage and limitations of nitrofurantoin in multi-drug resistant Indian scenario. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 33, 477–481.
- Shaw, K. J., Rather, P. N., Hare, R. S., e Miller, G. H. (1993). Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiological Reviews*, 57, 138–163.
- Silhavy, T. J., Hartig-Beecken, I., e Boos, W. (1976). Periplasmic protein related to the sn-glycerol-3-phosphate transport system of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 126, 951–958.
- Silver, L. L. (2017). Fosfomycin: mechanism and resistance. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 7, a025262.
- Singh, A. P., e Aijaz, S. (2016). Enteropathogenic *E. coli*: breaking the intestinal tight junction barrier. *F1000Research*, 4, 231.
- Sköld, O. (2000). Sulfonamide resistance: mechanisms and trends. *Drug Resistance Updates*, 3, 155–160.
- Sköld, O. (2001). Resistance to trimethoprim and sulfonamides. *Veterinary Research*, 32, 261–273.
- Smith, C. L., e Powell, K. R. (2000). Review of the sulfonamides and trimethoprim. *Pediatrics in Review*, 21, 368–371.
- Sole, M., Pitart, C., Oliveira, I., Fábrega, A., Muñoz, L., Campo, I., Salvador, P., Alvarez-Martínez, M. J., Gascón, J., Marco, F., e Vila, J. (2014). Extended spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* faecal carriage in Spanish travellers returning from tropical and subtropical countries. *Clinical Microbiology and Infection*, 20, O636–O639.
- Sommer, F., Anderson, J. M., Bharti, R., Raes, J., e Rosenstiel, P. (2017). The resilience of the intestinal microbiota influences health and disease. *Nature Reviews Microbiology*, 15, 630–638.
- Souli, M., Galani, I., Boukovalas, S., Gourgoulis, M. G., Chryssouli, Z., Kanellakopoulou, K., Panagea, T., e Giamarellou, H. (2011). In vitro interactions of antimicrobial combinations with fosfomycin against KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* and protection of resistance development. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55, 2395–2397.
- Strahilevitz, J., Jacoby, G. A., Hooper, D. C., e Robicsek, A. (2009). Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. *Clinical Microbiology Reviews*, 22, 664–689.
- Sujatha, R., Kumar, A., e Kumar, A. (2017). Distribution of TEM, SHV and CTX-M β -lactamase producing. *Indian J.Sci.Res.*, 17, 45–48.
- Sullivan, Å., Edlund, C., e Nord, C. E. (2001). Effect of antimicrobial agents on the ecological balance of human microflora. *The Lancet Infectious Diseases*, 1, 101–114.
- Swedberg, G., e Sköld, O. (1980). Characterization of different plasmid-borne dihydropteroate synthases mediating bacterial resistance to sulfonamides. *Journal of Bacteriology*, 142, 1–7.
- Takahashi, Y., e Igarashi, M. (2017). Destination of aminoglycoside antibiotics in the 'post-antibiotic era'. *The Journal of Antibiotics*, 71, 4–14.
- Tängdén, T., Cars, O., Melhus, Å., e Löwdin, E. (2010). Foreign travel is a major risk factor for colonization with *Escherichia coli* producing CTX-M-type extended-spectrum β -Lactamases: a prospective study with Swedish volunteers. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54, 3564–3568.

- Tängdén, T., e Giske, C. G. (2015). Global dissemination of extensively drug-resistant carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: clinical perspectives on detection, treatment and infection control. *Journal of Internal Medicine*, 277, 501–512.
- Then, R. L. (1982). Mechanisms of resistance to trimethoprim, the sulfonamides, and trimethoprim-sulfamethoxazole. *Reviews of Infectious Diseases*, 4, 261–269.
- Toleman, M. A., Simm, A. M., Murphy, T. A., Gales, A. C., Biedenbach, D. J., Jones, R. N., e Walsh, T. R. (2002). Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo-beta-lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 50, 673–679.
- Tomasz, A., Albino, A., e Zanati, E. (1970). Multiple antibiotic resistance in a bacterium with suppressed autolytic system. *Nature*, 227, 138–140.
- Trabulsi, L. R., Alterthum, F., Rácz, M. L. B. de O., Martinez, M. B., Campos, L. C., e Gompertz, O. F. (2008). *Microbiologia*. Atheneu, São Paulo.
- Tsuruoka, T., Miyata, A., e Yamada, Y. (1978). Two kinds of mutants defective in multiple carbohydrate utilization isolated from in vitro fosfomicin-resistant strains of *Escherichia coli* K-12. *The Journal of Antibiotics*, 31, 192–201.
- Vading, M., Kabir, M. H., Kalin, M., Iversen, A., Wiklund, S., Naucclér, P., e Giske, C. G. (2016). Frequent acquisition of low-virulence strains of ESBL-producing *Escherichia coli* in travellers. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71, 3548–3555.
- van der Bij, A. K., e Pitout, J. D. D. (2012). The role of international travel in the worldwide spread of multiresistant Enterobacteriaceae. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67, 2090–2100.
- van Duijkeren, E., Schink, A.-K., Roberts, M. C., Wang, Y., e Schwarz, S. (2018). Mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. (Vol. 6, p. 51–82). American Society of Microbiology.
- van Hattem, J. M., Arcilla, M. S., Bootsma, M. C., van Genderen, P. J., Goorhuis, A., Grobusch, M. P., Molhoek, N., Oude Lashof, A. M., Schultsz, C., Stobberingh, E. E., Verbrugh, H. A., de Jong, M. D., Melles, D. C., e Penders, J. (2016). Prolonged carriage and potential onward transmission of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Dutch travelers. *Future Microbiology*, 11, 857–864.
- Vardakas, K. Z., Mavroudis, A. D., Georgiou, M., e Falagas, M. E. (2018). Intravenous colistin combination antimicrobial treatment vs. monotherapy: a systematic review and meta-analysis. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 51, 535–547.
- Vervoort, J., Xavier, B. B., Stewardson, A., Coenen, S., Godycki-Cwirko, M., Adriaenssens, N., Kowalczyk, A., Lammens, C., Harbarth, S., Goossens, H., e Malhotra-Kumar, S. (2014). An in vitro deletion in *ribE* encoding lumazine synthase contributes to nitrofurantoin resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58, 7225–7233.
- Vila, J. (2015). Multidrug-Resistant Bacteria without Borders: Role of International Trips in the Spread of Multidrug-Resistant Bacteria. *Journal of Travel Medicine*, 22, 289–291.
- Vila, J., Sáez-López, E., Johnson, J. R., Römling, U., Dobrindt, U., Cantón, R., Giske, C. G., Naas, T., Carattoli, A., Martínez-Medina, M., Bosch, J., Retamar, P., Rodríguez-Baño, J., Baquero, F., e Soto, S. M. (2016). *Escherichia coli*: an old friend with new tidings. *FEMS Microbiology Reviews*, 40, 437–463.
- Vittecoq, M., Godreuil, S., Prugnotte, F., Durand, P., Brazier, L., Renaud, N., Arnal, A., Aberkane, S., Jean-Pierre, H., Gauthier-Clerc, M., Thomas, F., e Renaud, F. (2016). Antimicrobial resistance in wildlife. *Journal of Applied Ecology*, 53, 519–529.
- Vollmer, W., Blanot, D., e De Pedro, M. A. (2008). Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiology Reviews*, 32, 149–167.

- von Wintersdorff, C. J. H., Penders, J., Stobberingh, E. E., Lashof, A. M. L. O., Hoebe, C. J. P. A., Savelkoul, P. H. M., e Wolffs, P. F. G. (2014). High rates of antimicrobial drug resistance gene acquisition after international travel, the Netherlands. *Emerging Infectious Diseases*, 20, 649–657.
- von Wintersdorff, C. J. H., Wolffs, P. F. G., van Niekerk, J. M., Beuken, E., van Alphen, L. B., Stobberingh, E. E., Oude Lashof, A. M. L., Hoebe, C. J. P. A., Savelkoul, P. H. M., e Penders, J. (2016). Detection of the plasmid-mediated colistin-resistance gene *mcr-1* in faecal metagenomes of Dutch travellers. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71, 3416–3419.
- Wadekar, M. D., Anuradha, K., e Venkatesha, D. (2013). Phenotypic detection of ESBL and MBL in clinical isolates of Enterobacteriaceae., 1, 89–95.
- Walkty, A., Karlowsky, J. A., Adam, H. J., Lagacé-Wiens, P., Baxter, M., Mulvey, M. R., McCracken, M., Poutanen, S. M., Roscoe, D., e Zhanel, G. G. (2016). Frequency of MCR-1-mediated colistin resistance among *Escherichia coli* clinical isolates obtained from patients in Canadian hospitals (CANWARD 2008-2015). *CMAJ Open*, 4, E641–E645.
- Walther-Rasmussen, J., e Høiby, N. (2002). Plasmid-borne AmpC beta-lactamases. *Canadian Journal of Microbiology*, 48, 479–493.
- Wang, X., Chen, J., Kang, Y., Jiang, N., An, S., e Gao, Z. (2012). Prevalence and characterization of plasmid-mediated blaESBL with their genetic environment in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in patients with pneumonia. *Chinese Medical Journal*, 125, 894–900.
- Wang, Y., Tian, G.-B., Zhang, R., Shen, Y., Tyrrell, J. M., Huang, X., Zhou, H., Lei, L., Li, H.-Y., Doi, Y., Fang, Y., Ren, H., Zhong, L.-L., Shen, Z., Zeng, K.-J., Wang, S., Liu, J.-H., Wu, C., Walsh, T. R., e Shen, J. (2017). Prevalence, risk factors, outcomes, and molecular epidemiology of *mcr-1*-positive Enterobacteriaceae in patients and healthy adults from China: an epidemiological and clinical study. *The Lancet Infectious Diseases*, 17, 390–399.
- Wang, X., Wang, Y., Zhou, Y., Li, J., Yin, W., Wang, S., Zhang, S., Shen, J., Shen, Z., e Wang, Y. (2018). Emergence of a novel mobile colistin resistance gene, *mcr-8*, in NDM-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Emerging Microbes & Infections*, 7, 1–9.
- Warren, R. E., Ensor, V. M., O'Neill, P., Butler, V., Taylor, J., Nye, K., Harvey, M., Livermore, D. M., Woodford, N., e Hawkey, P. M. (2008). Imported chicken meat as a potential source of quinolone-resistant *Escherichia coli* producing extended-spectrum -lactamases in the UK. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61, 504–508.
- Warren, R. E., Harvey, G., Carr, R., Ward, D., e Doroshenko, A. (2008). Control of infections due to extended-spectrum β -lactamase-producing organisms in hospitals and the community. *Clinical Microbiology and Infection*, 14, 124–133.
- Watanabe, M., Iyobe, S., Inoue, M., e Mitsuhashi, S. (1991). Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 35, 147–151.
- Whiteway, J., Koziarz, P., Veall, J., Sandhu, N., Kumar, P., Hoecher, B., e Lambert, I. B. (1998). Oxygen-insensitive nitroreductases: analysis of the roles of *nfsA* and *nfsB* in development of resistance to 5-nitrofur derivatives in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 180, 5529–5539.
- Wilson, M. E. (2003). The traveller and emerging infections: sentinel, courier, transmitter. *Journal of Applied Microbiology*, 94 Suppl, 1S-11S.
- Wilson, M. E., e Chen, L. H. (2012). NDM-1 and the role of travel in its dissemination. *Current Infectious Disease Reports*, 14, 213–226.
- Wise, M. G., Estabrook, M. A., Sahm, D. F., Stone, G. G., e Kazmierczak, K. M. (2018). Prevalence of *mcr*-type genes among colistin-resistant Enterobacteriaceae collected in 2014-2016 as part of the INFORM global surveillance program. *PLoS ONE*, 13, e0195281.

- Woerther, P.-L., Burdet, C., Chachaty, E., e Andremont, A. (2013). Trends in human fecal carriage of extended-spectrum β -lactamases in the community: toward the globalization of CTX-M. *Clinical Microbiology Reviews*, 26, 744–758.
- Yaita, K., Aoki, K., Suzuki, T., Nakaharai, K., Yoshimura, Y., Harada, S., Ishii, Y., e Tachikawa, N. (2014). Epidemiology of extended-spectrum β -lactamase producing *Escherichia coli* in the stools of returning Japanese travelers, and the risk factors for colonization. *PLoS ONE*, 9, e98000.
- Yamaji, R., Rubin, J., Thys, E., Friedman, C. R., e Riley, L. W. (2018). Persistent pandemic lineages of uropathogenic *Escherichia coli* in a college community from 1999 to 2017. *Journal of Clinical Microbiology*, 56, e01834-17.
- Yamane, K., Wachino, J., Suzuki, S., Kimura, K., Shibata, N., Kato, H., Shibayama, K., Konda, T., e Arakawa, Y. (2007). New Plasmid-Mediated Fluoroquinolone Efflux Pump, QepA, Found in an *Escherichia coli* Clinical Isolate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51, 3354–3360.
- Yamane, K., Wachino, J. -i., Suzuki, S., e Arakawa, Y. (2008). Plasmid-mediated *qepA* gene among *Escherichia coli* clinical isolates from Japan. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52, 1564–1566.
- Yan, L., Liu, D., Wang, X.-H., Wang, Y., Zhang, B., Wang, M., e Xu, H. (2017). Bacterial plasmid-mediated quinolone resistance genes in aquatic environments in China. *Scientific Reports*, 7, 40610.
- Yezli, S., e Li, H. (2012). Antibiotic resistance amongst healthcare-associated pathogens in China. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 40, 389–397.
- Yin, W., Li, H., Shen, Y., Liu, Z., Wang, S., Shen, Z., Zhang, R., Walsh, T. R., Shen, J., e Wang, Y. (2017). Novel plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-3* in *Escherichia coli*. *mBio*, 8, 1–8.
- Yokoyama, K., Doi, Y., Yamane, K., Kurokawa, H., Shibata, N., Shibayama, K., Yagi, T., Kato, H., e Arakawa, Y. (2003). Acquisition of 16S rRNA methylase gene in *Pseudomonas aeruginosa*. *The Lancet*, 362, 1888–1893.
- Yong, D., Toleman, M. A., Giske, C. G., Cho, H. S., Sundman, K., Lee, K., e Walsh, T. R. (2009). Characterization of a new metallo- β -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*, 53, 5046–5054.
- Youmans, B. P., Ajami, N. J., Jiang, Z.-D., Campbell, F., Wadsworth, W. D., Petrosino, J. F., DuPont, H. L., e Highlander, S. K. (2015). Characterization of the human gut microbiome during travelers' diarrhea. *Gut Microbes*, 6, 110–119.
- Zhanel, G. G., Walkty, A. J., e Karlowsky, J. A. (2016). Fosfomycin: a first-line oral therapy for acute uncomplicated cystitis. *The Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology = Journal Canadien des Maladies Infectieuses et de la Microbiologie Médicale*, 2016, 1–10.
- Zhang, Z., Xiao, X., Su, T., Wu, J., Ren, J., Zhu, J., Zhang, X., Cao, R., e Du, R. (2017). Synthesis, structure-activity relationships and preliminary mechanism of action of novel water-soluble 4-quinolone-3-carboxamides as antiproliferative agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 140, 239–251.
- Zhang, X., Zhang, Y., Wang, F., Wang, C., Chen, L., Liu, H., Lu, H., Wen, H., e Zhou, T. (2018). Unraveling the mechanisms of nitrofurantoin resistance and epidemiological characteristics among *Escherichia coli* clinical Isolates. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 52, 226–232.
- Zhao, W.-H., e Hu, Z.-Q. (2013). Epidemiology and genetics of CTX-M extended-spectrum β -lactamases in gram-negative bacteria. *Critical Reviews In Microbiology*, 39, 79–101.
- Zhou, Y. P., Wilder-Smith, A., e Hsu, L. (2014). The Role of international travel in the spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Travel Medicine*, 21, 272–281.

9 ANEXOS

Anexo 1: Questionário respondido pelos participantes no centro de informação em saúde para viajantes antes da viagem



Cives

Centro de Informação em Saúde para Viajantes

1. IDENTIFICAÇÃO E LOCALIZAÇÃO		CONSULTA → / /
NOME (completo, sem abreviaturas)		
Data do nascimento: / /	Sexo → <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/> F Estado civil → <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> C Filhos → <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> S →	
Endereço (rua, número, apartamento, bairro, município, CEP) →		
Nacionalidade →		Naturalidade →
Profissão →		Atividade atual →
Telefone/fax →		Empresa ou Instituição →
E-mail →		Motivo da consulta →
2. DADOS SOBRE A VIAGEM		
Destino →	<input type="checkbox"/> Brasil →	
	<input type="checkbox"/> Amazônia legal <input type="checkbox"/> Centro-Oeste <input type="checkbox"/> Nordeste <input type="checkbox"/> Sudeste <input type="checkbox"/> Sul <input type="checkbox"/> América do Sul <input type="checkbox"/> América Central <input type="checkbox"/> América do Norte <input type="checkbox"/> Europa Ocidental <input type="checkbox"/> Europa Oriental <input type="checkbox"/> África Saariana <input type="checkbox"/> África Subsaariana <input type="checkbox"/> Oriente Médio <input type="checkbox"/> Península Arábica <input type="checkbox"/> Extremo Oriente <input type="checkbox"/> Subcontinente Indiano <input type="checkbox"/> Ásia Central <input type="checkbox"/> Sudeste Asiático <input type="checkbox"/> Oceania <input type="checkbox"/> Ilhas do Pacífico	
Roteiro ↓	Partida → / /	Retorno → / /
→		
Motivo	<input type="checkbox"/> Trabalho (<input type="checkbox"/> ≤ 6 meses <input type="checkbox"/> > 6 meses) <input type="checkbox"/> Turismo <input type="checkbox"/> VAP <input type="checkbox"/> Evento de massa <input type="checkbox"/> Outro →	
Atividade	<input type="checkbox"/> Militar <input type="checkbox"/> Outra →	
Transporte	Avião → S N	Duração → Navio → S N Duração → VAT → S N
Hospedagem	<input type="checkbox"/> Hotel <input type="checkbox"/> Pousada <input type="checkbox"/> Residência <input type="checkbox"/> Acampamento <input type="checkbox"/> Outro →	
Assistência médica	S N →	Seguro → S N
Viagens frequentes (> 4/ano)	S N	<input type="checkbox"/> Trabalho ≤ 6 meses <input type="checkbox"/> Turismo <input type="checkbox"/> Outro →
Viagens altitude > 1500 m	S N	Altitude máxima → Intercorrências → <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não
3. HISTÓRIA CLÍNICA		
História	Relata	Especificar e datar
Antecedentes de doenças	S N	<input type="checkbox"/> Sarampo <input type="checkbox"/> Rubéola(sor) <input type="checkbox"/> Caxumba <input type="checkbox"/> Coqueluche <input type="checkbox"/> Varicela <input type="checkbox"/> Varicela /contactantes <input type="checkbox"/> Hep A (sor) <input type="checkbox"/> Varizes <input type="checkbox"/> TVP <input type="checkbox"/> DST <input type="checkbox"/> Psoríase <input type="checkbox"/> Outras →
Cirurgias	S N	→
Transfusão de hemoderivados	S N	Ano →
Doação de sangue	S N	Última doação (mês e ano) →
Doença atual	S N	<input type="checkbox"/> Hipertensão <input type="checkbox"/> Diabetes <input type="checkbox"/> Outras →
Medicamentos em uso	S N	→
β-bloqueadores	S N	→
Antecedentes cardíacos	S N	→
Antecedentes neuro-psiquiátricos	S N	<input type="checkbox"/> Convulsões <input type="checkbox"/> Outros →
Doenças em viagens	S N	<input type="checkbox"/> Malária <input type="checkbox"/> Diarréia <input type="checkbox"/> Barotrauma <input type="checkbox"/> Altitude <input type="checkbox"/> Cinetose <input type="checkbox"/> DST → <input type="checkbox"/> Outras →
D→istúrbios de comportamento	S N	<input type="checkbox"/> Fobia aérea <input type="checkbox"/> Pânico <input type="checkbox"/> Claustrofobia <input type="checkbox"/> Agorafobia <input type="checkbox"/> Tripanofobia
Alt. psíquicas /viagens aéreas	S N	<input type="checkbox"/> Fúria aérea <input type="checkbox"/> Outros →
Uso de quimioprolifáticos	S N	<input type="checkbox"/> Malária <input type="checkbox"/> Diarréia <input type="checkbox"/> Leptospirose <input type="checkbox"/> Outros →
Gestação	S N	Idade gestacional →
Imunodeficiência	S N	<input type="checkbox"/> Doença → <input type="checkbox"/> Induzida →
Esplenectomia	S N	<input type="checkbox"/> Cirúrgica → / / <input type="checkbox"/> Funcional →
Contactante /imunodeficiente	S N	→
Contactante /tuberculose	S N	→
Tabagismo	S N	→
Etilismo	S N	→
Antecedentes odontológicos	S N	<input type="checkbox"/> Dor (<input type="checkbox"/> calor <input type="checkbox"/> frio) <input type="checkbox"/> Barodontalgia (<input type="checkbox"/> aérea <input type="checkbox"/> mergulho) <input type="checkbox"/> Bolsa periodontal <input type="checkbox"/> Gengivite <input type="checkbox"/> Abscesso <input type="checkbox"/> Canal (<input type="checkbox"/> atual <input type="checkbox"/> anterior) <input type="checkbox"/> Prótese total
Exame dentário = < 6 meses > 6 e < 12 meses	S N	Motivo →
Alergias	S N	<input type="checkbox"/> Timerosal <input type="checkbox"/> Ovo <input type="checkbox"/> Gelatina <input type="checkbox"/> Iodo <input type="checkbox"/> Bolor <input type="checkbox"/> Sulfas <input type="checkbox"/> Neomicina <input type="checkbox"/> Eritromicina <input type="checkbox"/> Penicilinas <input type="checkbox"/> Outras → <input type="checkbox"/> Vacina → <input type="checkbox"/> Soro → <input type="checkbox"/> Amendoim <input type="checkbox"/> Frutos do mar <input type="checkbox"/> Outras →
Estigmas atópicos	S N	<input type="checkbox"/> Asma <input type="checkbox"/> Rinite <input type="checkbox"/> Eczema <input type="checkbox"/> Outros →
Obs →		

3. HISTÓRIA VACINAL							
História	Relata		Confirma		Doses	Última dose	Observações e resultado sorologias
Vacinação /infância	S	N	S	N	↓	↓	↓
BCG	S	N	S	N		/ / /	
<input type="checkbox"/> DPT <input type="checkbox"/> DTpa <input type="checkbox"/> DPTHib	S	N	S	N		/ / /	
Polio → <input type="checkbox"/> Sabin <input type="checkbox"/> Salk	S	N	S	N		/ / /	
<i>Haemophilus</i>	S	N	S	N		/ / /	
Sarampo	S	N	S	N		/ / /	
Rubéola	S	N	S	N		/ / /	
MMR	S	N	S	N		/ / /	
<input type="checkbox"/> ATT <input type="checkbox"/> DT <input type="checkbox"/> dT	S	N	S	N		/ / /	
Hepatite A	S	N	S	N		/ / /	
<input type="checkbox"/> Hepatite B <input type="checkbox"/> Hep A + B	S	N	S	N		/ / /	
<input type="checkbox"/> Cólera	S	N	S	N		/ / /	
Febre amarela	S	N	S	N		/ / /	
Febre tifóide	S	N	S	N		/ / /	
Anti-rábica <input type="checkbox"/> Pós <input type="checkbox"/> Pré	S	N	S	N		/ / /	
<input type="checkbox"/> Gripe <input type="checkbox"/> H1N1	S	N	S	N		/ / /	
Pneumocócica <input type="checkbox"/> 23 <input type="checkbox"/> Conj	S	N	S	N		/ / /	
Meningocócica (especificar)	S	N	S	N		/ / /	
	S	N	S	N		/ / /	
5. EXAME FÍSICO							
PA:	TPR:	Peso:	Altura:	IMC:			
AC: [N] [A]	AR: [N] [A]	Abdome: [N] [A]	EN: [N] [A]	MMI: [N] [A]			
Alterações →							
6. CONDUTA							
Exames laboratoriais [S] [N]	<input type="checkbox"/> Sorol → <input type="checkbox"/> Hepatite A <input type="checkbox"/> Hepatite B <input type="checkbox"/> Sarampo <input type="checkbox"/> Rubéola <input type="checkbox"/> Caxumba <input type="checkbox"/> Varicela <input type="checkbox"/> Dosagem de G6PD <input type="checkbox"/> Outros →						
Pareceres [S] [N]	<input type="checkbox"/> Cardio <input type="checkbox"/> Pneumo <input type="checkbox"/> Outros →						
↓ Orientação →	<input type="checkbox"/> Orientações gerais <input type="checkbox"/> Revisão odontológica <input type="checkbox"/> TVP <input type="checkbox"/> VAT <input type="checkbox"/> Cuidados /água e alimentos <input type="checkbox"/> Preservativos <input type="checkbox"/> Repelentes <input type="checkbox"/> Tela impregnada <input type="checkbox"/> Impregnação /roupas <input type="checkbox"/> Luz solar <input type="checkbox"/> Calor <input type="checkbox"/> Frio <input type="checkbox"/> Altitude <input type="checkbox"/> Contato /água <input type="checkbox"/> Contato /animais						
Indicação de Imunobiológicos [S] [N] REG CVA → _____	Vacina		Doses antes da viagem			CVA	
	<input type="checkbox"/> Cólera oral (apenas contra DV → [S] [N])	<input type="checkbox"/> D1 <input type="checkbox"/> D2 <input type="checkbox"/> Dose subsequente	S	N			
	<input type="checkbox"/> Doença meningocócica → <input type="checkbox"/> A+C <input type="checkbox"/> C conjugada <input type="checkbox"/> A+C+Y+W135	<input type="checkbox"/> D1 <input type="checkbox"/> Dose subsequente	S	N			
	<input type="checkbox"/> dT <input type="checkbox"/> DT <input type="checkbox"/> dTpa <input type="checkbox"/> DTpa	<input type="checkbox"/> D1 <input type="checkbox"/> D2 <input type="checkbox"/> D3 <input type="checkbox"/> Ds	S	N			
	<input type="checkbox"/> Encefalite japonesa	<input type="checkbox"/> D1 <input type="checkbox"/> D2 <input type="checkbox"/> D3	S	N			
	<input type="checkbox"/> Febre amarela	<input type="checkbox"/> D1 <input type="checkbox"/> Dose subsequente	S	N			
	<input type="checkbox"/> Febre tifóide	<input type="checkbox"/> D1 <input type="checkbox"/> Dose subsequente	S	N			
	<input type="checkbox"/> Gripe (inclui H1N1)	<input type="checkbox"/> D1 <input type="checkbox"/> Dose subsequente	S	N			
	<input type="checkbox"/> Hepatite A	<input type="checkbox"/> D1 <input type="checkbox"/> D2	S	N			
	<input type="checkbox"/> Hepatite B <input type="checkbox"/> Hepatite A + B	<input type="checkbox"/> D1 <input type="checkbox"/> D2 <input type="checkbox"/> D3	S	N			
	<input type="checkbox"/> HPV quadrivalente	<input type="checkbox"/> D1 <input type="checkbox"/> D2 <input type="checkbox"/> D3	S	N			
	<input type="checkbox"/> MMR	<input type="checkbox"/> D1 <input type="checkbox"/> D2	S	N			
	<input type="checkbox"/> Pneumocócica <input type="checkbox"/> 23 <input type="checkbox"/> Conjugada	<input type="checkbox"/> D1 <input type="checkbox"/> Dose subsequente	S	N			
	<input type="checkbox"/> Polio → <input type="checkbox"/> Injetável <input type="checkbox"/> Oral	<input type="checkbox"/> D1 <input type="checkbox"/> D2 <input type="checkbox"/> D3 <input type="checkbox"/> Ds	S	N			
<input type="checkbox"/> Raiva (pré exposição)	<input type="checkbox"/> D1 <input type="checkbox"/> D2 <input type="checkbox"/> D3	S	N				
<input type="checkbox"/> Varicela	<input type="checkbox"/> D1 <input type="checkbox"/> D2	S	N				
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> D1 <input type="checkbox"/> D2 <input type="checkbox"/> D3 <input type="checkbox"/> Ds	S	N				
Viagem /área de risco malária	<input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim →						
Quimioprofilaxia /malária [S] [N]	<input type="checkbox"/> Mefloquina → _____ cp <input type="checkbox"/> Atovaquone+proguanil → _____ cp <input type="checkbox"/> Doxiciclina → _____ cp <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Cloroquina → _____ cp <input type="checkbox"/> Primaquina → _____ cp <input type="checkbox"/> Outro → _____						
Quimioprofilaxia adicional ⇒ Falha [S] [N]	<input type="checkbox"/> Mefloquina [F] [A] → _____ cp <input type="checkbox"/> Atovaquone+proguanil [F] [A] → _____ cp <input type="checkbox"/> Doxiciclina [F] [A] → _____ cp <input type="checkbox"/> Cloroquina [F] [A] → _____ cp						
Autotratamento [S] [N]	<input type="checkbox"/> Artemisinina+lumefantrine [A] → _____ cp <input type="checkbox"/> Outro → _____						
Autotrat./candidose [S] [N]	<input type="checkbox"/> Fluconazol <input type="checkbox"/> Outro → _____						
7. MEDIDAS ADICIONAIS/JUSTIFICATIVAS							
8. CONSENTIMENTO INFORMADO →	Artigos e trabalhos científicos → <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não						
9. MÉDICO RESPONSÁVEL →	<input type="checkbox"/> FM <input type="checkbox"/> LGP <input type="checkbox"/> TMPPC <input type="checkbox"/> KCA <input type="checkbox"/> KMPR <input type="checkbox"/> RPI			Assinatura			

Anexo 2: Questionário respondido pelos participantes no centro de informação em saúde para viajantes após o retorno da viagem

Nome:		Registro:	
Sexo:	Idade:	Cidade de Residência:	CEP:
Data da Viagem:		Data de retorno:	
Destino:			
Data de Coleta de SWAB I:		Data de entrada Laboratório I:	
INFORMAÇÕES PRÉ-VIAGEM			
Uso de antimicrobianos nos últimos 3 meses: () Sim () Não			
Período:		Medicamento:	
Justificativa:			
Período:		Medicamento:	
Justificativa:			
Doença de base:			
Hospitalização no últimos 12 meses:		Período:	
INFORMAÇÕES PER-VIAGEM			
Sintomas gastrointestinais: () Sim () Não		Data:	Local:
Uso de antimicrobianos: () Sim () Não		Qual:	
Hospitalização: () Sim () Não		Data:	Local:
INFORMAÇÕES PÓS-VIAGEM			
Sintomas gastrointestinais: () Sim () Não		Data:	
Uso de antimicrobianos: () Sim () Não		Qual:	
Data de Coleta de SWAB II:		Data de entrada Laboratório II:	

Anexo 3: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
CLEMENTINO FRAGA FILHO
(HUCFF/ UFRJ))



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DA COLONIZAÇÃO INTESTINAL POR ENTEROBACTÉRIAS MULTI-RESISTENTES EM VIAJANTES.

Pesquisador: Káris Maria de Pinho Rodrigues

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 39274214.0.1001.5257

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

Patrocinador Principal: UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 936.655

Data da Relatoria: 14/01/2015

Apresentação do Projeto:

Protocolo 278-14. Respostas recebidas em 24.12.2014

Objetivo da Pesquisa:

Ver parecer consubstanciado de 7/12/2014

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Ver parecer consubstanciado de 7/12/2014

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Ver parecer consubstanciado de 7/12/2014

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Ver parecer consubstanciado de 7/12/2014

Recomendações:

sem recomendações

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Resposta ao CEP – Pendência de 07/12/2014

Do Projeto:

Endereço: Rua Prof. Rodolpho Paulo Rocco Nº255 Sala 01D-46
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 21.941-913
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3938-2480 **Fax:** (21)3938-2481 **E-mail:** cep@hucff.ufrj.br

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
CLEMENTINO FRAGA FILHO
(HUCFF/ UFRJ)



Continuação do Parecer: 936.655

a)A pesquisadora indica que a pesquisa será feita a partir da participação de 1500 viajantes, "atendidos no Cives e no Centro de Medicina de Viagem da FIOCRUZRJ". Porém, não há detalhes sobre o recrutamento desses voluntários. Informações sobre características da população, como faixa etária, por exemplo, além de critérios de inclusão e exclusão, não foram identificados no protocolo. Solicitam-se esclarecimentos.

Resposta: As principais características da população foram acrescentadas à metodologia. A população atendida tem média de idade de 31 anos nos dois centros. Quanto à distribuição entre homens e mulheres, a proporção de mulheres é um pouco maior na população atendida pelo Cives/UFRJ, 57%, enquanto na FIOCRUZ a distribuição entre homens e mulheres é de 50%. (Ver pág 04 do projeto)

Quanto ao recrutamento de voluntários, ao término da consulta de aconselhamento pré-viagem todos os viajantes maiores de 18 anos serão convidados a participar do estudo. Nessa ocasião o objetivo da pesquisa e os procedimentos de coleta de amostras serão explicados, bem como será feita leitura conjunta do Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) deixando o viajante à vontade para participar ou não do estudo, sem que isso acarrete nenhum prejuízo ao atendimento atual ou à consultas futuras. Em caso afirmativo o TCLE será obtido nesse momento. (Ver pág 05 do projeto)

Análise: pendência atendida

b)Como será feito o armazenamento de material biológico - onde será armazenado e que tipo de acordo há entre as instituições colaboradoras? Essas informações são relevantes inclusive porque "no caso de pesquisa envolvendo mais de uma instituição deve haver acordo firmado entre as instituições participantes, contemplando formas de operacionalização, compartilhamento e utilização do material biológico humano armazenado em Biobanco ou Biorrepositório, inclusive a possibilidade de dissolução futura da parceria e a consequente partilha e destinação dos dados e materiais armazenados, conforme previsto no TCLE." (Resolução 441, Art. 1 - 13, <http://conselho.saude.gov.br/resolucoes/2011/Reso441.pdf>)

Resposta: O material biológico coletado através do swab estéril representa a microbiota normal. O mesmo será armazenado temporariamente (menos de um mês) em frasco contendo 1mL da solução skim milk (leite desnatado), triptona, glicose, e glicerina (STGG) à temperatura de -20°C no Laboratório de Investigação em Microbiologia Médica (LIMM) sob a responsabilidade da Dra. Beatriz Meurer Moreira, nossa colaboradora, conforme descrito na carta anexada neste projeto, apenas durante o período em que estiver sendo feito o isolamento das bactérias que podem ser

Endereço: Rua Prof. Rodolpho Paulo Rocco Nº255 Sala 01D-46
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 21.941-913
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3938-2480 **Fax:** (21)3938-2481 **E-mail:** cep@hucff.ufrj.br

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
CLEMENTINO FRAGA FILHO
(HUCFF/ UFRJ)



Continuação do Parecer: 936.655

resistentes. Podem ser necessárias repetições dos cultivos, por isso um armazenamento inicial é aconselhável. Esse material é destruído por meio de autoclavação assim que o isolamento é completo. Apenas as bactérias são armazenadas para ensaios de detecção dos mecanismos de resistência. Dessa forma, não há formação de biobanco pois não há armazenamento de material biológico.

Análise: pendência atendida

c)A pesquisadora declara que "não há riscos para os participantes da pesquisa, mas não explicita a razão. Solicitam-se esclarecimentos. A pesquisadora deve considerar a concepção de risco na Resolução 466/12, <http://conselho.saude.gov.br/resolucoes/2012/Reso466.pdf>

Resposta: A coleta de material fecal através de swab perianal não envolve riscos físicos para o viajante em virtude da delicadeza, das dimensões do instrumento e por ser introduzido apenas 1-2cm no esfíncter anal. Pode acarretar leve desconforto. O viajante será esclarecido do procedimento, do possível desconforto e será colocado à vontade para recusar participar do estudo, caso haja o mínimo constrangimento com a coleta e fornecimento da amostra. (Ver pág 05 do projeto e TCLE corrigido)

análise: pendência atendida

d) Os custos de realização do projeto estão estimados em R\$ 86.465,52, conforme o orçamento apresentado. Não há indicação de patrocinador principal, além da Faculdade de Medicina/UFRJ. Solicitam-se esclarecimentos.

Resposta: Todo o material necessário para o primeiro ano do estudo já está disponível em estoque no LIMM. Este material proveio de recursos próprios do Laboratório e também da Faculdade de Medicina. Após a aprovação do projeto no CEP, o mesmo poderá ser enviado às agências de fomento, como CNPq e FAPERJ, para obtenção de recursos que permitam a sua continuidade.

Análise: pendência atendida

2- Do TCLE:

a) Boa parte do texto do TCLE está inadequado, já que o documento apresenta uma abordagem técnica, pouco amigável para uma população supostamente diversa em termos de educação e conhecimento técnico-científico. Por exemplo, o seguinte trecho deve ser simplificado: "O presente estudo tem como objetivo avaliar a aquisição de bactérias multi-resistentes namicrobiota

Endereço: Rua Prof. Rodolpho Paulo Rocco Nº255 Sala 01D-46
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 21.941-913
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3938-2480 **Fax:** (21)3938-2481 **E-mail:** cep@hucff.ufrj.br

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
CLEMENTINO FRAGA FILHO
(HUCFF/ UFRJ)



Continuação do Parecer: 936.655

do intestino após viagem internacional. Esse estudo permitirá o dimensionamento do problema e a elaboração de eventuais alertas de risco às agências de vigilância, bem como a adoção de medidas preventivas cabíveis no aconselhamento de viajantes. Para realização do estudo será necessário a coleta de duas amostras de material fecal: antes e depois da viagem. Essas amostras serão colhidas através de um swab estéril introduzido até aproximadamente 1 a 2 cm do esfíncter anal, girado cuidadosamente sobre seu próprio eixo por duas vezes e retirado após este procedimento, que será efetuado pelo próprio viajante. O primeiro swab será colhido na ocasião da consulta para aconselhamento pré-viagem e o segundo até uma semana após o retorno. O swab de retorno, colhido pelo próprio viajante será resgatado por um dos membros da equipe na residência do viajante...".

b) Sobre a declaração do participante ao final do TCLE, a pesquisadora sugere a concordância de que "ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos...". Entretanto, pelo texto do TCLE, parece que não há quaisquer riscos ou desconfortos no procedimento a ser adotado pelo participante. Os riscos e os possíveis desconfortos são nulos? A pesquisadora deve considerar que deve haver no TCLE a "explicitação dos possíveis desconfortos e riscos decorrentes da participação na pesquisa, além dos benefícios esperados dessa participação e apresentação das providências e cautelas a serem empregadas para evitar e/ou reduzir efeitos e condições adversas que possam causar dano, considerando características e contexto do participante da pesquisa". (Resolução 466/12, IV.3, b). Solicita-se adequação.

Resposta: O TCLE foi adequado conforme as orientações acima. (Ver TCLE corrigido)

Análise: pendência atendida

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

1. De acordo com o item X.1.3.b, da Resolução CNS n.º 466/12, o pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais que permitam ao CEP acompanhar o desenvolvimento dos projetos.
2. Eventuais emendas (modificações) ao protocolo devem ser apresentadas, com justificativa, ao CEP, de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada

Endereço: Rua Prof. Rodolpho Paulo Rocco Nº255 Sala 01D-46
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 21.941-913
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3938-2480 **Fax:** (21)3938-2481 **E-mail:** cep@hucff.ufrj.br

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
CLEMENTINO FRAGA FILHO
(HUCFF/ UFRJ)



Continuação do Parecer: 936.655

RIO DE JANEIRO, 22 de Janeiro de 2015

Assinado por:
Carlos Alberto Guimarães
(Coordenador)

Endereço: Rua Prof. Rodolpho Paulo Rocco Nº255 Sala 01D-46
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 21.941-913
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3938-2480 **Fax:** (21)3938-2481 **E-mail:** cep@hucff.ufrj.br

Anexo 4: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) utilizado no estudo



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
Centro de Ciências da Saúde
Faculdade de Medicina
Departamento de Medicina Preventiva

Cives - Centro de Informação em Saúde para Viajantes

www.cives.ufrj.br

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

AVALIAÇÃO DA COLONIZAÇÃO INTESTINAL POR ENTEROBACTÉRIAS MULTI-RESISTENTES EM VIAJANTES.

Esta pesquisa tem como objetivo verificar a aquisição de bactérias resistentes a antibióticos no intestino, durante viagens. Será verificado o risco de uma pessoa pegar bactérias resistentes em algumas regiões, e para onde esse risco for elevado, serão elaboradas recomendações para os viajantes.

O estudo será realizado através da análise do material fecal; e para confirmar que a aquisição da bactéria ocorreu durante a viagem, será necessária a coleta de duas amostras: uma antes e uma depois da viagem. Essas amostras serão colhidas pelo próprio viajante com um *swab* estéril (uma haste flexível com ponta de algodão), fornecido sem custo. Para a coleta, a parte do *swab* com algodão deve ser introduzida 1 a 2 cm através do ânus, realizando um movimento giratório de duas voltas em torno do próprio eixo do *swab* (para que o material fecal fique preso ao algodão). O primeiro *swab* será colhido na consulta para aconselhamento pré-viagem, e o segundo em até uma semana depois do retorno. Um dos membros da equipe buscará este *swab* de retorno na residência do viajante, ou em outro local que seja mais conveniente. Nessa ocasião será feito contato telefônico para coleta de informações referentes à viagem: ocorrência de diarreia, uso de antibióticos e hospitalização durante a viagem. Todo material será processado de forma anônima, identificado por um código, assegurando total privacidade ao participante da pesquisa. Os resultados das culturas, bem como as informações obtidas nas fichas de atendimento, serão de competência exclusiva dos pesquisadores envolvidos no projeto e dos profissionais que atuam no processamento das amostras. O procedimento em alguns casos pode causar mínimo desconforto durante a coleta, mas não acarreta risco de lesão física para o viajante. Os resultados de cultura estarão disponíveis para seu conhecimento quando finalizado o processamento da amostra.

Não haverá nenhum tipo de remuneração para participação do estudo.

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso ao profissional responsável pelo estudo: **Dra. Káris Maria de Pinho Rodrigues**, que poderá ser encontrada no telefone **(21) 982088905**. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho/HUCFF/UFRJ – R. Prof. Rodolpho Paulo Rocco, n.º 255 – Cidade Universitária/Ilha do Fundão - Sala 01D-46/1º andar - pelo telefone 2562-2480, de segunda a sexta-feira, das 8 às 15 horas, ou através do e-mail:

cep@hucff.ufjf.br. Você tem liberdade de recusar participar do projeto de pesquisa, ou de retirar o consentimento, a qualquer momento, no caso da aceitação, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu atendimento na Instituição.

As bactérias obtidas para esse estudo serão armazenadas com a finalidade de utilização em estudos futuros, em virtude de haver a possibilidade do surgimento de novos mecanismos de resistência bacteriana que possam vir a ser identificados nessas amostras.

Eu discuti com o **Dra Káris Maria de Pinho Rodrigues** sobre a minha decisão de participar no estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, que a coleta do material, embora possa causar ligeiro desconforto, é isenta de riscos, e as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia de acesso aos resultados do estudo quando disponíveis. Autorizo o contato telefônico para obtenção de informações após a viagem, bem como o armazenamento das bactérias coletadas para estudos futuros. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem penalidades ou prejuízos e sem a perda de atendimento nesta Instituição ou de qualquer benefício que eu possa ter adquirido. Eu receberei uma cópia desse Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e a outra ficará com o pesquisador responsável por essa pesquisa. Além disso, estou ciente de que eu e o pesquisador responsável deveremos rubricar todas as folhas desse TCLE e assinar na última folha.

Nome do Sujeito da Pesquisa

Data: ____/____/____

Assinatura do Sujeito da Pesquisa

Nome do Pesquisador Responsável

Data: ____/____/____

Assinatura do Pesquisador Responsável