



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



Jaime Antonio Abrantes

**Avaliação da resistência bacteriana em Estações de Tratamento de Esgoto da Fiocruz
com ênfase no perfil fenotípico e molecular para beta-lactamases em enterobactérias**

Rio de Janeiro

2022

Jaime Antonio Abrantes

Avaliação da resistência bacteriana em Estações de Tratamento de Esgoto da Fiocruz com ênfase no perfil fenotípico e molecular para beta-lactamases em enterobactérias

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente, da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, na Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de Concentração: Gestão e Saneamento Ambiental.

Orientadora: Prof^a. Dra. Joseli M^a da Rocha Nogueira.

Rio de Janeiro

2022

Título do trabalho em inglês: Evaluation of bacterial resistance in Fiocruz Sewage Treatment Plants with emphasis on the phenotypic and molecular profile for beta-lactamases in enterobacteria.

Catálogo na fonte
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto de Comunicação e Informação Científica e Tecnológica em Saúde
Biblioteca de Saúde Pública

A161a Abrantes, Jaime Antonio.
Avaliação da resistência bacteriana em Estações de Tratamento de Esgoto da Fiocruz com ênfase no perfil fenotípico e molecular para beta-lactamases em enterobactérias / Jaime Antonio Abrantes. — 2022.
116 f. : il. color. ; graf. mapas ; tab.

Orientador: Joseli Maria da Rocha Nogueira.
Tese (doutorado) – Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Rio de Janeiro, 2022.

1. Estações de Tratamento de Águas Residuárias. 2. Farmacorresistência Bacteriana. 3. Enterobacteriaceae. 4. Carbapenêmicos. 5. Klebsiella pneumoniae. 6. Escherichia coli. 7. Citrobacter. 8. Aeromonas hydrophila. 9. Acinetobacter. 10. Pseudomonas. I. Título.

CDD – 23.ed. – 628.3

Jaime Antonio Abrantes

Avaliação da resistência bacteriana em Estações de Tratamento de Esgoto da Fiocruz com ênfase no perfil fenotípico e molecular para beta-lactamases em enterobactérias

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente, da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, na Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de Concentração: Gestão e Saneamento Ambiental

Aprovada em: 26 de maio de 2022.

Banca Examinadora

Prof^ª. Dra. Denise Borges dos Santos Dias
Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Prof^ª Dra. Clara de Fátima Gomes Cavados
Fundação Oswaldo Cruz – Instituto Oswaldo Cruz

Prof^ª Dra. Fernanda Nunes Santos
Fundação Oswaldo Cruz – Instituto Nacional de Infectologia

Prof. Dr. Paulo Rubens Guimarães Barrocas
Fundação Oswaldo Cruz - Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca

Prof^ª. Dra. Joseli Maria da Rocha Nogueira (Orientadora)
Fundação Oswaldo Cruz - Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca

Rio de Janeiro

2022

Dedico este trabalho aos meus dois pedaços do coração: meus filhos Victor Hugo Pereira Abrantes e Helena Pereira Abrantes, por tanta compreensão e amor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, pelo sopro divino da vida e pela oportunidade dada a cada dia de vivê-la junto às pessoas que amo.

Ao meu filho Victor Hugo, por cada sorriso e abraço sem nenhuma cobrança, mesmo com a ausência de seu pai em alguns momentos.

À minha filha Helena, que apesar de nunca saber do que se tratava uma tese, tinha sempre um beijo e a frase de que ia dar tudo certo. Um presente que chegou durante o curso.

Ao meu pai Walzir, mesmo em memória, por me deixar tesouros valiosos, como caráter, honestidade e responsabilidade.

À minha Irmã Graziella Toledo, companheira de todos os dias, compartilhando choro, risadas, lamentos e apreensões com o doutorado e com a vida. Segundo presente recebido durante o curso.

À minha orientadora e amiga, Dra. Joseli Nogueira, por acreditar no meu potencial e compartilhar esta jornada comigo. Obrigado pelas puxadas de orelha, pelos “memes” nos finais de semana e por não me deixar parar.

À minha turma do Doutorado e “apêndices do mestrado” que assistiam aula juntos, principalmente a Deborah Azevedo (Debs) e Ana Paula Azevedo (AP), por toda ajuda prestada ao longo desta jornada do início ao fim do trabalho.

Ao meu amigo, padrinho e microbiologista, Dr. Juarez Corrêa, pela inspiração e por me fazer descobrir o meu caminho profissional.

À minha amiga e colega de trabalho, Francisca Ribeiro, pelo apoio diário e companheirismo.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia DCB – ENSP: Ary, Raquel (ex LabMicro), Licurgo, Rose e Mariza pelo apoio e convivência com vocês.

Aos amigos do DCB - ENSP que adquiri pelo caminho, desde pesquisadores, técnicos e equipe de apoio.

Ao Laboratório de Genética Molecular de Micro-organismos – Instituto Oswaldo Cruz (IOC – FIOCRUZ), Dra. Ana Carolina Paulo Vicente e a Fernanda Freitas Jannechevitz, que colaboraram com este trabalho e o enriqueceram ainda mais.

À toda a equipe da Estação de Tratamento de Esgotos da Central de Saneamento Szachna Elias Cynamon, principalmente nas pessoas de Renatah da Fonseca, Luiz Antonio Bezerra, Jorge de Oliveira Cariuz, Cassio Murilo de Brito Barros e aos operadores Caetano e Pâmela por todo o apoio prestado para o ingresso nas instalações, coletas do material e discussões

importantes acerca da importância e continuidade do trabalho.

À coordenação do Programa de Saúde Pública e Meio Ambiente, a secretaria do programa e à SECA pelo suporte e estrutura oferecida.

Aos membros da banca da Qualificação pelas orientações e dicas importantes.

Aos membros da banca de Seminários II, III e IV.

Aos membros da banca prévia/ defesa pela colaboração prestada e por aumentar a qualidade do trabalho.

Aos professores Dr. Jaime Lopes da Mota Oliveira, Dr. Paulo Guimarães Barrocas, Dra. Débora Cynamon Kligerman entre outros, pelo conhecimento.

À amiga e colega de trabalho, Dra. Cristiane Lamas pelas colaborações em trabalhos científicos e incentivo.

À minha chefe no Instituto Nacional de Cardiologia, Dra. Ângela Dantas, por permitir que eu me aperfeiçoasse.

Aos amigos e colegas do Instituto Nacional de Cardiologia pelas palavras de apoio nesses últimos dois anos.

Aos funcionários da ENSP, que conviveram direta ou indiretamente comigo e auxiliaram em meu trabalho.

A todos que de alguma forma participaram ou contribuíram para o sucesso deste trabalho e não foram citados nominalmente neste momento.

“Um pedaço de jade não pode se tornar um objeto de arte sem ser cinzelado. Uma pessoa não pode conhecer os grandes princípios sem a educação.”

Confúcio

RESUMO

O gerenciamento de resíduos é um desafio no Brasil e no mundo, pois a cada dia há aumento populacional, expansão territorial e como consequência, um volume maior de diversos tipos de resíduos produzidos. Para minimizar os impactos ao Meio Ambiente e à Saúde humana, as Estações de Tratamento de Esgoto (ETE) foram criadas e têm como meta principal recuperar a qualidade das águas residuais, diminuindo a sobrecarga da natureza na tentativa de realizar esta tarefa. No esgoto podem estar presentes micro-organismos causadores de morbidades, inclusive aqueles portadores de resistência aos antimicrobianos utilizados no tratamento de doenças infecciosas. Tendo como base essas informações, este estudo objetivou detectar bactérias resistentes aos principais antimicrobianos em duas ETE na Fundação Oswaldo Cruz, realizando a triagem de grupos diversos com o auxílio de meios cromogênicos e testes específicos. Quatro coletas realizadas na ETE Central e ETE INI entre os meses de agosto e setembro de 2021, totalizaram dezesseis amostras divididas em esgoto bruto e tratado de cada uma das estações. Foram realizadas técnicas quantitativas para bactérias totais cultiváveis, para bacilos Gram-negativos (BGN) resistentes às cefalosporinas de terceira geração, assim como técnicas qualitativas, a fim de identificar estes micro-organismos, fornecer o perfil de suscetibilidade e apresentar possíveis mecanismos de resistência por testes fenotípicos e moleculares. A quantificação realizada resultou em crescimento bacteriano na ordem de 10^5 a 10^6 UFC/mL em esgoto bruto, enquanto no esgoto tratado foi de 10^2 a 10^5 UFC/mL. Os BGN resistentes compuseram de 7,1 a 36% do total de bactérias no esgoto bruto e zero a 4,7% no esgoto tratado. Em relação a eficácia do tratamento na redução de bactérias cultiváveis e resistentes, a ETE INI apresentou resultados de mais de 99% para ambos os tipos e a ETE Central apresentou 33,6% para redução de totais e 94,4% para a redução de BGN resistentes, apontando uma maior eficiência da ETE INI neste quesito. Ainda destas amostras foram isolados 62 espécimes de BGN dos grupos das enterobactérias (*Enterobacterales*), do gênero das *Aeromonas* e BGN não-fermentadores de glicose. Os principais gêneros e espécies de importância clínica encontrados foram *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Citrobacter* sp., *Aeromonas hydrophila*, *Acinetobacter* sp. e *Pseudomonas* sp. Após o Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos em todos os isolados, os testes fenotípicos para detecção de carbapenêmicos identificaram oito isolados de enterobactérias resistentes positivos para o fenótipo de carbapenemases. Já os testes moleculares detectaram em seis isolados o gene *blaKPC* em *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter farmeri* e em *Citrobacter amalonaticus*. Os resultados obtidos apontam que a resistência bacteriana aos antimicrobianos mais potentes estão nos organismos isolados do esgoto de origem hospitalar (INI) e que os testes fenotípicos foram eficazes na triagem dos mecanismos de resistência aos carbapenêmicos, sendo compatíveis com resultados dos testes moleculares. Ainda assim, a eficácia do tratamento ainda é maior na ETE INI, devido as especificidades do processo.

Palavras-Chave: Estação de Tratamento de Esgoto. Farmacorresistência Bacteriana. Enterobactérias. Carbapenêmicos. KPC.

ABSTRACT

Waste management is a challenge in Brazil and in the world, because every day there is an increase in population, territorial expansion and, as a consequence, a greater volume of different types of waste. In order to minimize the impacts on the Environment and Human Health, the main objective of the Sewage treatment is to repair waste water, with quality in order to achieve the goal of reaching nature in the task. In sewage there are microorganisms that cause morbidity, including those that may be resistant to antimicrobials used in the treatment of infectious diseases. Based on this information, this study or detection of defects in two ETE at Fundação Oswaldo Cruz, performing a screening of different groups with the aid of chromogenic means and specific tests. Ten is a sample derived from four collections, between August and September 2021, from ETE Central and ETE INI, with a sample from one of the raw and treated stations of each of the stations, in each collection. Quantitative techniques were performed for total cultureable bacteria, Gram-negative bacilli (GNB) resistant to third-generation cephalosporins. As well as qualitative techniques, in order to identify these microorganisms, provide a susceptibility profile and present possible resistance mechanisms by phenotypic and molecular tests. From a total of 16 analyzed samples, bacterial growth was from 10^5 to 10^6 CFU/mL in raw sewage, while in treated sewage it was from 10^2 to 10^5 CFU/mL. Resistant GNB comprised 7.1 to 36% of the total bacteria in raw sewage and zero to 4.7% in treated sewage. Regarding the effectiveness of the treatment in the reduction of cultivable and resistant bacteria, the ETE INI presented results of more than 99% for both types and the ETE Central presented 33.6% for the reduction of totals and 94.4% for the reduction of resistant GNB, indicating a greater efficiency of the ETE INI in this regard. Also from these samples, 62 specimens of BGN from the Enterobacteriaceae (*Enterobacterales*) groups, *Aeromonas* genus and non-glucose fermenting GNB were isolated. Among the main genera and species found and of clinical importance were *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Citrobacter* sp., *Aeromonas hydrophila*, *Acinetobacter* sp. and *Pseudomonas* sp. After the Antimicrobial Sensitivity Test on all isolates, phenotypic tests identified eight isolates of carbapenem-resistant enterobacteriaceae positive for the carbapenemase phenotype. Molecular tests detected the *blaKPC* gene in six isolates in *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter farmeri* and *Citrobacter amalonaticus*. The results obtained indicate that bacterial resistance to the most potent antimicrobials is found in organisms isolated from hospital sewage (INI) and that phenotypic tests were effective in screening for mechanisms of resistance to carbapenems, being compatible with molecular test results. Even so, the effectiveness of the treatment is still greater in TEE INI, due to the specificities of the process

Keywords: Sewage Treatment Station. Bacterial Pharmaco-resistance. Enterobacteriaceae. Carbapenems. KPC.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Figura 1: Etapas do tratamento na estação Central.....	22
Figura 2 -	Etapas do tratamento na Estação INI.....	22
Figura 3 -	Principais patógenos e seus sítios anatômicos de infecção.....	24
Figura 4 -	Esquema de classificação de bactérias Gram-negativas presentes no intestino.....	26
Figura 5 -	Coleta realizada em esgoto bruto da ETE Central.....	40
Figura 6 -	Coleta realizada em esgoto tratado da ETE Central.	40
Figura 7 -	ETE do Centro Hospitalar COVID-19 – INI/FIOCRUZ.....	41
Figura 8 -	Coleta realizada em esgoto bruto da ETE INI.	41
Figura 9 -	Coleta realizada em esgoto tratado da ETE INI.	42
Figura 10 -	Aspecto da amostra e armazenamento em frasco estéril graduado.....	43
Figura 11 -	Fluxograma de semeadura das amostras de esgoto bruto e tratado provenientes das ETE Central e INI.....	44
Figura 12 -	Meio CV proposto por Costa & Vernin.....	47
Figura 13 -	Vista frontal do equipamento VITEK 2® (BioMérieux) e seus cartões inseridos em cassetes.....	48
Figura 14 -	Exemplo de teste positivo de sinergismo para confirmação de organismos produtores de ESBL.....	50
Figura 15 -	Teste de Hodge Modificado.....	51
Figura 16 -	Esquema para aplicação de discos de antimicrobianos para detecção de carbapenemases.....	52
Figura 17 -	Fluxograma para detecção de carbapenemases no laboratório clínico.....	53
Figura 18 -	Placas de meio seletivo ESBL com crescimento de duas diluições (10^{-2} e 10^{-3}) em esgoto bruto.....	57
Figura 19 -	Placas de meio seletivo ESBL com crescimento de duas diluições (10^{-1} e 10^{-2}) em esgoto tratado.....	58

Figura 20 -	Gráfico de crescimento bacteriano por estação e tipo de amostra de esgoto.....	60
Figura 21 -	Gráfico de crescimento de BGN resistentes, por estação e tipo de amostra de esgoto.....	62
Figura 22 -	Gráfico de eficácia na redução de bactérias totais e BGN resistentes após tratamento, por estação.....	64
Figura 23 -	Gráfico de número de espécies bacterianas por grupo, coleta, tipo de esgoto e estação.....	68
Figura 24 -	Gráfico de distribuição de BGN resistentes com crescimento em meio seletivo e a porcentagem por espécie.....	72
Figura 25 -	Teste de VP para identificação das espécies de <i>Aeromonas</i> sp.	74
Figura 26 -	Placas de meio seletivo com replaqueamento de espécies isoladas em esgoto bruto e tratado.....	76
Figura 27 -	Isolamento de colônias em meios cromogênicos.....	77
Figura 28 -	Gráfico de distribuição das enterobactérias não-sensíveis.....	79
Figura 29 -	Gráfico de distribuição das <i>Aeromonas</i> sp. não-sensíveis.....	81
Figura 30 -	Gráfico de distribuição dos BGN-NF não-sensíveis.....	83
Figura 31 -	Gráfico de frequência de positividade dos testes fenotípicos para as enterobactérias.....	86
Figura 32	Testes fenotípicos de AmpC e ESBL.....	86
Figura 33 -	Teste de Hodge com os três carbapenêmicos: imipenem, meropenem e ertapenem.....	87
Figura 34 -	Teste de Hodge com ertapenem.....	88
Figura 35 -	Testes fenotípicos com ácido fenilborônico (A ou AFB), ácido etilenodiaminotetracético (EDTA ou E) e cloxacilina (CL ou C)	88
Figura 36 -	Teste positivo para AFB, com diferença de halo de mais de 5mm entre o disco com antibiótico puro e o impregnado.....	89
Figura 37 -	Produto de amplificação do gene <i>bla</i> KPC obtido através da reação em cadeia da polimerase (PCR) em diferentes amostras de enterobactérias....	92
Quadro 1-	Classificação de beta-lactamases.....	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Dados de coleta das amostras de esgoto.....	43
Tabela 2 -	Iniciadores utilizados nas reações de PCR para identificar a presença de genes de resistência.....	54
Tabela 3 -	Quantidade de UFC/mL de bactérias totais cultiváveis e resistentes, obtidas em cada amostra de esgoto.....	58
Tabela 4 -	Redução de UFC/mL de bactérias totais cultiváveis e resistentes, em amostras da ETE Central.....	63
Tabela 5 -	Redução de UFC/mL de bactérias totais cultiváveis e resistentes, em amostras da ETE INL.....	63
Tabela 6 -	Número de espécies encontradas em cada grupo bacteriano por amostra.....	65
Tabela 7 -	Espécies de bacilos Gram-negativos encontrados por amostra com crescimento em meio seletivo.....	79
Tabela 8 -	Perfil de sensibilidade das enterobactérias aos antimicrobianos.....	78
Tabela 9 -	Perfil de sensibilidade das <i>Aeromonas</i> sp. aos antimicrobianos.....	80
Tabela 10 -	Perfil de sensibilidade dos BGN-NF aos antimicrobianos.....	82
Tabela 11 -	Testes fenotípicos e sensibilidade à carbapenêmicos nas enterobactérias...	85
Tabela 12 -	Testes moleculares realizados nas enterobactérias resistentes à carbapenêmicos.....	91

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AFB – Ácido fenilborônico
- AMC – Amoxicilina + ácido clavulânico
- AMP - Ampicilina
- AmpC – Ampicilinase de classe C de Ambler
- AMI – Amicacina
- ANA - Agência Nacional de Águas
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- APHA - American Public Health Association
- ASB – Ampicilina + sulbactam
- ATCC - American Type Culture Collection
- BES – Brazil extended spectrum
- BGN – Bacilos Gram-negativos
- BGN-NF - Bacilos Gram-negativos não-fermentadores
- BHI - Brain Heart Infusion Broth
- BKC – Brazilian *Klebsiella* Carbapenemase
- Bla – Genes das beta-lactamases
- BrCAST - Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
- CAZ – Ceftazidima
- CFO - Cefoxitina
- CIM - Concentração Inibitória Mínima
- CIP – Ciprofloxacino
- COL - Colistina
- CLED - Cystine Lactose Electrolyte Deficient
- CLSI - Clinical Laboratory Standards Institute
- CLOXA - Cloxacilina
- CME - *Chryseobacterium meningosepticum* (isolada em)
- CPM - Cefepime
- CRO – Ceftriaxona
- CTX - Cefotaxima
- CTX-M – Cefotaximase isolada em Munich
- CV – Costa & Vernin meio
- DCB – Departamento de Ciências Biológicas

DNA – Ácido Desoxirribonucleico
dNTP – desoxinucleotídeos trifosfato
ECN - Estafilococos Coagulase Negativa
EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético
EMB – Eosin Methylene Blue (meio de cultura Eosina-azul de metileno)
ENSP – Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca
ERT - Ertapenem
ESBL - Beta-lactamase de amplo espectro
ETE - Estações de Tratamento de Esgotos
EUCAST - European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
GEN - Gentamicina
GES - Guiana extended-spectrum
GIM - German Imipenemase
GN - Gram-negativo
IMI - Imipenem
IMP - Imipenemase
INI – Instituto Nacional de Infectologia
IOC – Instituto Oswaldo Cruz
IRAS - Infecções Relacionadas aos Serviços de Saúde
ITB - Instituto Trata Brasil
KPC - *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase
LabMicro – Laboratório de Microbiologia
LGMM – Laboratório de Genética Molecular de Micro-organismos
MBBR - Moving Bed Biofilm Reactor (Reator Biológico de Leito Móvel)
MBL - Metalobetalactamases
MEM – Meropenem
MgCl₂ – Cloreto de magnésio
MRSA - *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina
NaCl – Cloreto de sódio
NDM - New Delhi metalobetalactamase
NMC/IMI - Imipenemase/ non-metallo carbapenemase-A
OMS - Organização Mundial da Saúde
ONU - Organização das Nações Unidas
OXA - Oxacilinase

PBPs - Penicillin Binding Protein (Proteínas Ligadoras da Penicilina)
PCR – Polymerase Chain Reaction (Reação em cadeia da polimerase)
PER – Pseudomonas de resistência estendida do inglês *Pseudomonas extendend resistant*
PIT – Piperacilina + tazobactam
POP – Procedimento Operacional Padrão
SHV - Sulfidrila variável
SIM - Ágar Indol Sulfeto Motilidade
SIM - Seoul Imipenemase
SFO – *Serratia fonticola* (gene isolado em)
SME - *Serratia marcescens* enzyme
SPM - São Paulo Metalobetalactamase
SUS - Sistema Único de Saúde
TAE - Tris-Acetato-EDTA
TEM – Temoneira (paciente portador de bactéria com o gene para Beta-lactamase)
TLA – *Thahuicas Indians* (gene descoberto em)
TSA - Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos
TSA2 – Tryptic soy agar (Ágar triptona de soja)
UFC - Unidade Formadora de Colônias
VEB – Vietnan extended-spectrum Beta-lactamase
VIM - Verona Imipenemase
VP - Voges-Proskauer
VRE - *Enterococcus* Resistente à Vancomicina

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	17
2.	REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1.	SANEAMENTO BÁSICO E SAÚDE PÚBLICA.....	19
2.2.	TRATAMENTO DE EFLUENTES E PROTEÇÃO AMBIENTAL.....	19
2.2.1	Caracterização do tratamento de esgoto	20
2.2.2	Tratamento de esgoto nas estações da Fiocruz	21
2.3.	INFECÇÕES CAUSADAS DEVIDO AO SANEAMENTO PRECÁRIO	23
2.4.	ENTEROBACTÉRIAS.....	24
2.5.	AEROMONAS.....	26
2.6.	BACILOS GRAM-NEGATIVOS NÃO-FERMENTADORES.....	27
2.7.	ESTAFILOCOCOS.....	28
2.8.	ENTEROCOCOS.....	29
2.9.	RESISTÊNCIA BACTERIANA.....	30
2.10.	DETECÇÃO FENOTÍPICA DE MECANISMOS DE RESISTÊNCIA EM ENTEROBACTÉRIAS.....	32
2.10.1.	Beta-lactamases de espectro estendido	32
2.10.2.	Carbapenemases	35
3.	JUSTIFICATIVA	37
4.	OBJETIVOS	38
4.1.	OBJETIVO GERAL.....	38
4.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	38
5.	METODOLOGIA	39
5.1.	MÉTODOS GERAIS.....	39
5.2.	COLETA DAS AMOSTRAS.....	39
5.3.	PREPARO E SEMEADURA DAS AMOSTRAS.....	44
5.4.	IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA BACTERIANA.....	46
5.5.	TESTE DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS.....	48
5.6.	TESTES FENOTÍPICOS.....	49
5.6.1.	Sinergismo por disco-aproximação	49
5.6.2.	Teste de Hodge modificado	51
5.6.3.	Teste com disco de EDTA, ácido fenilborônico ou cloxacilina	52

5.7.	TESTES MOLECULARES.....	54
5.7.1.	Eletroforese em Gel de Agarose.....	55
5.8	ANÁLISES DE DADOS.....	56
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
6.1.	ANÁLISE QUANTITATIVA DAS BACTÉRIAS ENCONTRADAS.....	57
6.2.	ANÁLISE QUALITATIVA DAS BACTÉRIAS ENCONTRADAS.....	65
6.3.	PERFIL DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS.....	77
6.4.	DETECÇÃO FENOTÍPICA DE ESBL, AMPC E CARBAPENEMASES....	84
6.5.	PESQUISA DOS GENES DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS BETA-LACTÂMICOS.....	90
7.	CONCLUSÕES.....	94
8.	DIFICULDADES/SOLUÇÕES ENCONTRADAS E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	95
9.	RECOMENDAÇÕES.....	96
	REFERÊNCIAS.....	97
	APÊNDICE A – RESUMO DO ARTIGO 1.....	114
	APÊNDICE B – RESUMO DO ARTIGO 2.....	115

1. INTRODUÇÃO

As várias atividades humanas geram resíduos, que devem ser gerenciados da maneira correta, de acordo com sua origem. Este gerenciamento, nem sempre é adequado e há décadas vem se agravando este grande problema de saúde pública, já que alguns destes resíduos podem gerar diversas doenças, além de impacto ambiental (BRAGA *et al.*, 2005; AMARO *et al.*, 2018).

De acordo com a Organização das Nações Unidas (ONU) (2017), com o desenvolvimento humano e conseqüente aumento da população, o destino dos resíduos, quantidade e modo como são tratados, se tornaram grandes desafios, levando em consideração que a população humana atual já contabiliza mais de sete bilhões de pessoas e as projeções para 2030 são alarmantes. Segundo estas projeções, grande parte da população se concentrará nos grandes centros urbanos, gerando assim uma grande dificuldade para lidar com os rejeitos produzidos.

Segundo Scarre (1995), quando a população mundial era mínima e não havia fixação em um lugar específico como cidades, por exemplo, a ação antrópica não era suficiente para degradar o meio ambiente e até mesmo esgotar os recursos naturais. Mesmo assim se existisse algum dano, o ambiente conseguia se recuperar e voltar ao equilíbrio ecológico e podia se dizer que o Homem vivia em harmonia com o meio ambiente.

De acordo com Arruda e Pilletti (2007) com a fixação de território e formação das cidades, a matéria prima da natureza passa a ser utilizada e explorada quanto aos recursos locais, para suprir a necessidade da população. O ambiente passou então a não se recuperar mais tão facilmente e ainda assim, a receber todos os detritos produzidos por este desenvolvimento.

Com a tecnologia e a industrialização, apareceram muitas patologias associadas à contaminação derivada do resíduo das atividades humanas (ARRUDA; PILETTI, 2007), já que juntamente à evolução tecnológica e produção de bens de consumo, aumentou proporcionalmente a degradação do meio ambiente e da saúde humana.

Por conta deste fato, surge a necessidade de conter esta degradação através de estratégias que visam à conservação ecológica e populacional. Estas estratégias visam lidar também com a escassez de recursos naturais e com a crescente poluição (BRAGA *et al.*, 2005; NEVES; MENDONÇA, 2016).

Um dos principais desafios para os países em desenvolvimento é o tratamento de esgoto sanitário. No Brasil ainda há muitas cidades sem saneamento básico e mesmo naquelas em que existe algum tipo de tratamento de esgoto, uma considerável parcela apresenta problemas estruturais e de manutenção (ITB, 2018).

Segundo Campos (1999), a natureza tem todo o aporte para restabelecer o desequilíbrio causado por águas residuais, porém com um limite que há muitos anos foi ultrapassado pelas grandes metrópoles. Por conta desta dificuldade, que ocasionamos para o ambiente, foram criadas as Estações de Tratamento de Esgotos (ETE), a fim de auxiliar a natureza na recuperação destas águas e diminuir o impacto gerado.

O tratamento de esgotos se baseia em níveis de complexidade e de processos, onde são envolvidas diversas fases com o propósito de retirar a maior quantidade possível de resíduo da água e devolvê-la com a qualidade anterior a ação antrópica. As etapas de tratamento são subsequentes e não só dependem uma da outra para a obtenção do resultado desejado como estão sujeitas ao tipo de estratégia utilizada por cada ETE (VON SPERLING, 2014).

Um dos motivos que aumenta o índice de morbidade da população é a contaminação humana por micro-organismos presentes no esgoto, que causam infecções das mais simples até aquelas que podem levar ao óbito (REY, 2017).

A gravidade dessas infecções depende de fatores como o tipo de agente etiológico, sua quantidade e patogenicidade bem como a porta de entrada da infecção. Em contrapartida, o estado imunológico, nutricional, fatores intrínsecos como idade, sexo e as comorbidades que o indivíduo possa apresentar, também influenciam na severidade destas afecções (REY, 2017).

Segundo Toze (1999), as doenças infectocontagiosas podem ser causadas por vírus, bactérias, fungos, protozoários e helmintos. Todavia os organismos bacterianos merecem destaque tanto no tocante as doenças de contaminação fecal-oral, quanto na possibilidade de controle. Entre as diversas bactérias passíveis de causar infecções por esse tipo de contágio, a ordem *Enterobacterales*, o gênero *Aeromonas*, os bacilos Gram-negativos não fermentadores de glicose (BGN-NF), os enterococos e os estafilococos merecem destaque especial, já que normalmente não só são responsáveis por infecções intestinais, mas também podem atuar em outros sítios do corpo humano (MURRAY *et al.*, 2017).

Tais micro-organismos podem se apresentar resistentes aos mais variados antimicrobianos normalmente utilizados para tratamento, o que aumenta ainda mais o problema de Saúde Pública, dificultando a terapêutica da população acometida e ocasionando importante impacto ambiental, já que esse tipo de micro-organismo pode se reproduzir e se disseminar no ambiente (ANTONIO *et al.*, 2009).

Com base neste processo é de extrema importância verificar a efetividade das estações de tratamento de esgoto na remoção destes organismos patogênicos e investigar a presença e a resistência bacteriana aos antimicrobianos que podem estar sendo liberados para corpos aquáticos urbanos (BAQUERO *et al.*, 2008).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. SANEAMENTO BÁSICO E SAÚDE PÚBLICA.

Inicialmente, o saneamento corresponde ao conjunto de medidas realizadas para modificar as condições do meio e prevenir doenças (ITB, 2018). Moraes (1993), definiu um conceito mais elaborado, dizendo que saneamento é o conjunto de ações e medidas para a melhoria da salubridade ambiental, junto a prevenção de doenças e promoção da saúde.

De acordo com Braga e colaboradores (2005), fazem parte do saneamento básico: o abastecimento de água para assegurar a higiene e o conforto; a coleta, o tratamento e disposição adequada dos esgotos e dos resíduos sólidos; a drenagem urbana de águas pluviais; e o controle ambiental de vetores e reservatórios de doenças.

O saneamento básico surgiu com a necessidade de controle dos surtos ou epidemias relacionada às patologias veiculadas pelo esgoto e se iniciou nas cidades onde o desenvolvimento foi pioneiro, estimulando a urbanização (LOFRANO; BROWN, 2010).

Segundo Lima e colaboradores (2015), o momento crítico para a valorização de questões essenciais como o saneamento, Saúde Pública e impacto ambiental, foi o da Reforma Sanitária na década de 70. Através desta Reforma, os movimentos começaram a tomar um destino promissor, desembocando na 8ª Conferência Nacional de Saúde, realizada em 1986, na Constituição Federal de 1988 e por fim na criação do Sistema Único de Saúde (SUS) em 1990 (PAIM, 2013).

O Saneamento Básico tenta reduzir o número de doenças que são veiculadas pela água, como as doenças infecciosas entéricas, que são a grande causa de morte por desidratação. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2009, o número aproximado de mortes derivadas dessas infecções chegou a 1,5 milhões por ano, tornando vítima principalmente as crianças dos países em desenvolvimento. Só no Brasil, de acordo com o Ministério da Saúde (2019), o número de óbitos infantis por doenças diarreicas, representaram mais de 20% do total de mortes desta faixa etária.

2.2. TRATAMENTO DE EFLUENTES E PROTEÇÃO AMBIENTAL.

Com o intuito de minimizar os impactos à saúde causados pela ação antrópica no destino inadequado dos dejetos, para reduzir a poluição do solo e dos mananciais de abastecimento de

água, conscientizar a população com relação aos bons hábitos higiênicos, evitar o contato dos vetores com as fezes e promover o conforto, além do senso estético, a Fundação Nacional de Saúde recomenda a construção de um sistema de esgotamento sanitário (BRASIL, 2015).

2.2.1 Caracterização do tratamento de esgoto.

De acordo com Von Sperling (2014) o tratamento de águas residuais é classificado a partir de quatro níveis: Preliminar, Primário, Secundário, Terciário. O nível preliminar tem como característica principal a separação de sólidos grosseiros, sedimentáveis e flutuantes, gorduras e areia da água residual.

São utilizados nesta fase materiais específicos como grade e desarenador, conhecido também como caixa de areia. Segundo Roque (2008), este nível é um passo essencial para todo o processo de tratamento de águas residuais, pois todas as outras etapas são dependentes do sucesso da primeira.

O nível primário, assim como o nível preliminar, se apresenta como um processo físico, que visa a retirada dos sólidos em suspensão por floculação e ação gravitacional, gerando o lodo como produto (VON SPERLING, 2014). Há a utilização de decantador primário, a fim de se obter a sedimentação de partículas de forma floculenta, em seguida é utilizado um digestor para estabilização do lodo e por fim, a disposição em leito de secagem dos sólidos retirados (ROQUE, 2008).

No nível secundário, após os processos físicos dos dois níveis anteriores, um processo biológico ocorre com o objetivo de reproduzir processos que ocorreriam na natureza se existisse um equilíbrio, convertendo a matéria orgânica em produtos mineralizados e inertes (VON SPERLING, 2014).

Esta etapa é crítica, pois existem vários tipos de estruturas e subdivisões do processo que Von Sperling (2014) caracterizou de acordo com sua pesquisa. Em relação às lagoas de estabilização existem diversos tipos como por exemplo, as lagoas facultativas, anaeróbias e aeradas; quanto à disposição dos efluentes no solo, ele cita os tipos de infiltração lenta, rápida e superficial; é discutido também sobre os reatores aeróbios com biofilme, com biofiltros aerados ou biodiscos; por fim, os sistemas de lodos ativados, que podem ser convencionais, de aeração prolongada ou de fluxo intermitente.

O nível terciário, por sua vez, é conduzido por um processo físico-químico. Neste momento, há a remoção de poluentes específicos não removíveis pelos métodos biológicos

convencionais (VON SPERLING, 2014). Segundo Roque (2008), estratégias e mecanismos de aprimoramento nas metodologias de tratamento secundário como também a utilização de metodologias específicas como floculação química, nanofiltração e osmose reversa podem produzir ótimos resultados finais. Já Von Sperling (2014), acrescenta ao processo, a retirada de organismos patogênicos por desinfecção do efluente através de processos como cloração, ozonização, radiação ultravioleta e/ou desinfetantes químicos.

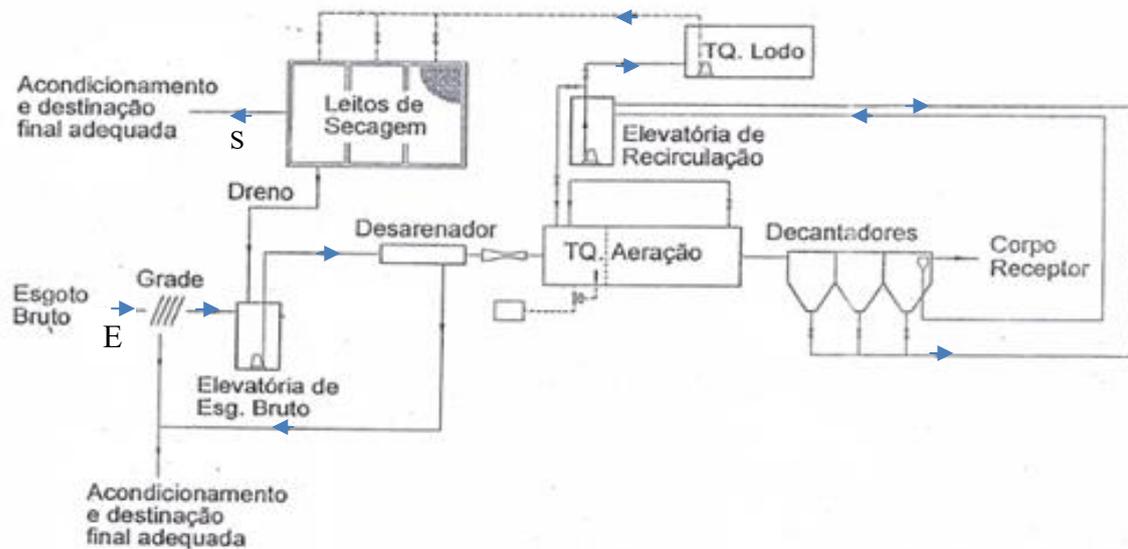
2.2.2 Tratamento de esgoto nas estações da Fiocruz

A Estação de Tratamento de Esgotos da Central de Saneamento Szachna Elias Cynamon (ETE Central) é um sistema de tratamento biológico a nível secundário com o processo de lodos ativados, variante aeração prolongada. A ETE atende a praticamente todo o Campus Manguinhos, excetuando-se apenas o Centro Hospitalar COVID-19 e o Centro Tecnológico de Vacinas, que possuem suas próprias estações. Ela tem como vazão média de projeto $512\text{m}^3/\text{dia}$ ($5,92\text{L/s}$) (CORREIA, 2021).

Segundo Correia (2021) A ETE Central possui as seguintes unidades: gradeamento, elevatória de esgoto bruto, desarenador, tanque de aeração, decantador secundário, elevatória de recirculação de lodo, tanque digestor e leitos de secagem, conforme demonstrado na figura 1.

Diferenciando-se da anterior, a Estação de Tratamento de Esgotos do Centro Hospitalar COVID-19, do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (ETE INI) é um sistema de tratamento biológico com o processo MBBR (Moving Bed Biofilm Reactors) seguido por desinfecção com utilização de hipoclorito de sódio (CORREIA, 2021). Moving Bed Biofilm Reactor – MBBR, tem sua tradução correspondente como Reator Biológico de Leito Móvel, se caracterizando por ser tecnologia de tratamento com micro-organismos, que ficam retidos no interior de um reator, na superfície de determinado material inerte (TERAN *et al.*, 2019).

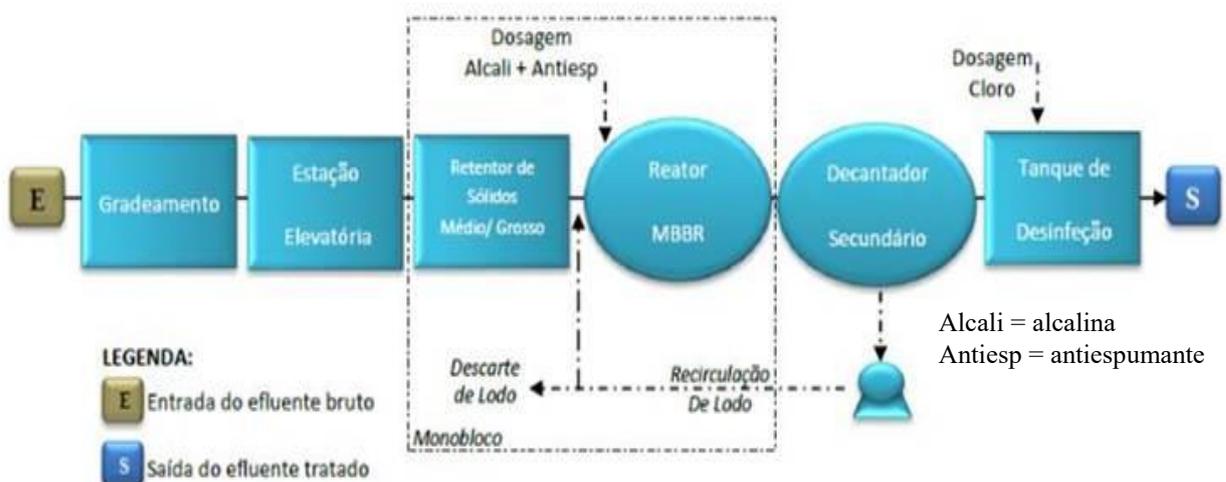
Figura 1- Etapas do tratamento na estação Central.



Fonte: Adaptado de Correia, 2021. Legenda: E = Entrada do efluente bruto. S = Saída do efluente tratado. TQ = Tanque

A ETE atende apenas ao Centro Hospitalar COVID-19, um hospital com 200 leitos, um bloco técnico e um prédio administrativo, complexo que foi construído no ano de 2020 para atender às demandas da crise sanitária causada pela epidemia de COVID-19. Ela tem como vazão média de projeto $65\text{m}^3/\text{dia}$ ($0,75\text{L/s}$). A ETE INI possui as seguintes unidades: estação elevatória de esgoto bruto com cesto de retenção de sólidos, tanque retentor de sólidos, reator MBBR, decantador secundário e tanque de contato, conforme demonstrado na figura 2 (CORREIA, 2021):

Figura 2- Etapas do tratamento na Estação INI (Centro Hospitalar COVID-19).



Fonte: Adaptado de Correia, 2021.

2.3. INFECÇÕES CAUSADAS DEVIDO AO SANEAMENTO PRECÁRIO.

A maioria dos problemas de saúde nas cidades está intimamente ligada a qualidade do saneamento básico, sendo um dos fatores para degradação ambiental. Em países em desenvolvimento o índice das doenças que ocorrem como consequência a um saneamento precário é altíssimo, levando em consideração a situação ambiental que é muitas vezes, calamitosa (GIATTI, 2007; OLIVEIRA, 2018).

As grandes cidades são responsáveis pela maior parcela de contaminação dos efluentes, onde residências, indústrias e estabelecimentos de saúde são produtores de resíduos potencialmente nocivos à população e ao ambiente. Os dois últimos são responsáveis pela maior parte dos micro-organismos resistentes presentes no esgoto (VECCHIA *et al.*, 2009; LORENZONI *et al.*, 2018).

Embora haja o conhecimento sobre a importância do tratamento de esgoto por parte da população, uma grande parcela da mesma não possui saneamento, pois há problemas políticos que impedem os investimentos em implantação de projetos, regulação, operação e manutenção do processo de coleta e tratamento do esgoto (GALVÃO JUNIOR *et al.*, 2009; SANTOS *et al.*, 2018).

Os dejetos humanos, devem receber um tratamento adequado, caso isso não seja realizado, pode acarretar diversos agravos. Doenças bacterianas como a febre tifoide e paratifoide, podem ser debilitantes e até mortais para um indivíduo, assim como as disenterias causadas por outras enterobactérias. Algumas doenças são diretamente relacionadas a água contaminada como a leptospirose e esquistossomose, assim como as doenças que são indiretamente causadas pela água, pois através dela que há a criação de vetores como no caso da dengue e malária (BRASIL, 2015).

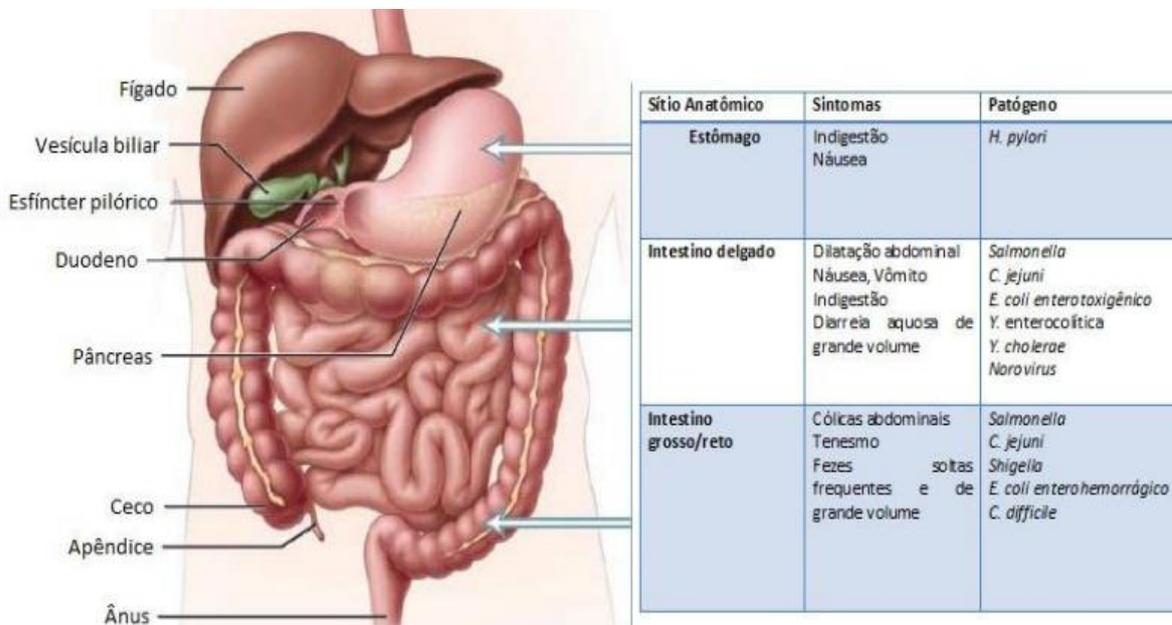
A maioria dos organismos causadores de doenças transmitidas através da água ou esgoto é de origem entérica, ou seja, são excretados junto com o material fecal, sendo liberados nos esgotos e por sua vez contaminam a água. A quantidade e os tipos de micro-organismos presentes na água podem ser usados para avaliar, com segurança, a qualidade microbiológica da mesma, que é determinada pela ausência de micro-organismos patogênicos e suas toxinas ou pela sua quantidade (GIATTI, 2007; GALVÃO JUNIOR *et al.*, 2009).

Os organismos bacterianos da ordem *Enterobacterales* são os principais enteropatógenos detectados em amostras de água residual, apresentando muitas vezes uma série de fatores de virulência. Tais micro-organismos também podem possuir variedades sorológicas, como *Escherichia coli*, *Shigella* sp. e *Salmonella* sp., sendo que a maioria dos patógenos entéricos

têm afinidade por partes distintas do sistema gastrointestinal (Figura 3) (GALVÃO JUNIOR *et al.*, 2009; TRABULSI; ALTERTHUM, 2017).

Outros micro-organismos também estão presentes no esgoto e podem causar diversas doenças, como as bactérias do gênero *Aeromonas*, os bacilos Gram-negativos não fermentadores de glicose (BGN-NF) e os enterococos (MURRAY *et al.*, 2017; KONEMAN *et al.*, 2018). Determinadas espécies de estafilococos, embora não sejam de origem entérica, são indiretamente relacionados às infecções causadas pelo saneamento precário e também esgoto hospitalar (TRABULSI; ALTERTHUM, 2017; KONEMAN *et al.*, 2018).

Figura 3: Principais patógenos e seus sítios anatômicos de infecção.



Fonte: UFJF, 2013.

2.4. ENTEROBACTÉRIAS.

As enterobactérias são bacilos Gram-negativos pertencentes à ordem *Enterobacterales*. Até há pouco tempo, a família *Enterobacteriaceae* agrupava praticamente todos os gêneros importantes de enterobactérias, todavia estudos filogenéticos, propuseram novas famílias, sendo que na atualidade a ordem agrupa 7 famílias, *Enterobacteriaceae*, *Erwiniaceae*, *Morganellaceae*, *Yersiniaceae*, *Pectobacteriaceae*, *Hafniaceae* e *Budviciaceae* (ADEOLU *et al.*, 2016; JANDA, J. M; ABBOTT, 2021).

Elas são bactérias anaeróbias facultativas ou aeróbias, não esporuladas, com motilidade variável, geralmente oxidase negativas e crescem em meios básicos, meios ricos e/ ou meios

seletivos (ANVISA, 2005; MURRAY *et al.*, 2017). Têm a capacidade de reduzir nitrato a nitrito, fermentar a glicose com produção de ácido ou ácido e gás (MURRAY *et al.*, 2017; KONEMAN *et al.*, 2018).

Estes micro-organismos estão distribuídos amplamente na natureza, sendo encontrados na água, solos, plantas e no trato intestinal de seres humanos e outros animais. São os maiores componentes da microbiota do intestino, mas são relativamente incomuns em outros sítios do corpo (MURRAY *et al.*, 2017; KONEMAN *et al.*, 2018).

As enterobactérias representam 80% ou mais de todos os Gram-negativos de importância clínica isolados na rotina microbiológica e são responsáveis por de cerca de 70% das infecções urinárias e 50% das sepSES (ANVISA, 2005).

Contido no grupo das enterobactérias, estão os coliformes. Estes, também são Gram-negativos, em forma de bastonetes, aeróbios ou anaeróbios facultativos, que fermentam a lactose, a 35°C-37°C, produzindo ácido e gás em um prazo de 24-48 horas. São oxidase-negativos e não formam esporos (KONEMAN *et al.*, 2018).

Fazem parte deste grupo, predominantemente, as bactérias pertencentes aos gêneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella*. Podem ser encontrados nas fezes, mas também estão presentes em outros ambientes como na vegetação, no solo, entre outros (MURRAY *et al.*, 2017).

No gênero *Klebsiella*, *K. pneumoniae* é encontrada com maior frequência em amostras clínicas, podendo causar pneumonia, meningite, infecções urinárias e sepSES (KONEMAN *et al.*, 2018). No gênero *Enterobacter*, as espécies mais isoladas são *E. aerogenes* e *E. cloacae*, sendo associadas a uma variedade de infecções oportunistas (ANVISA, 2005).

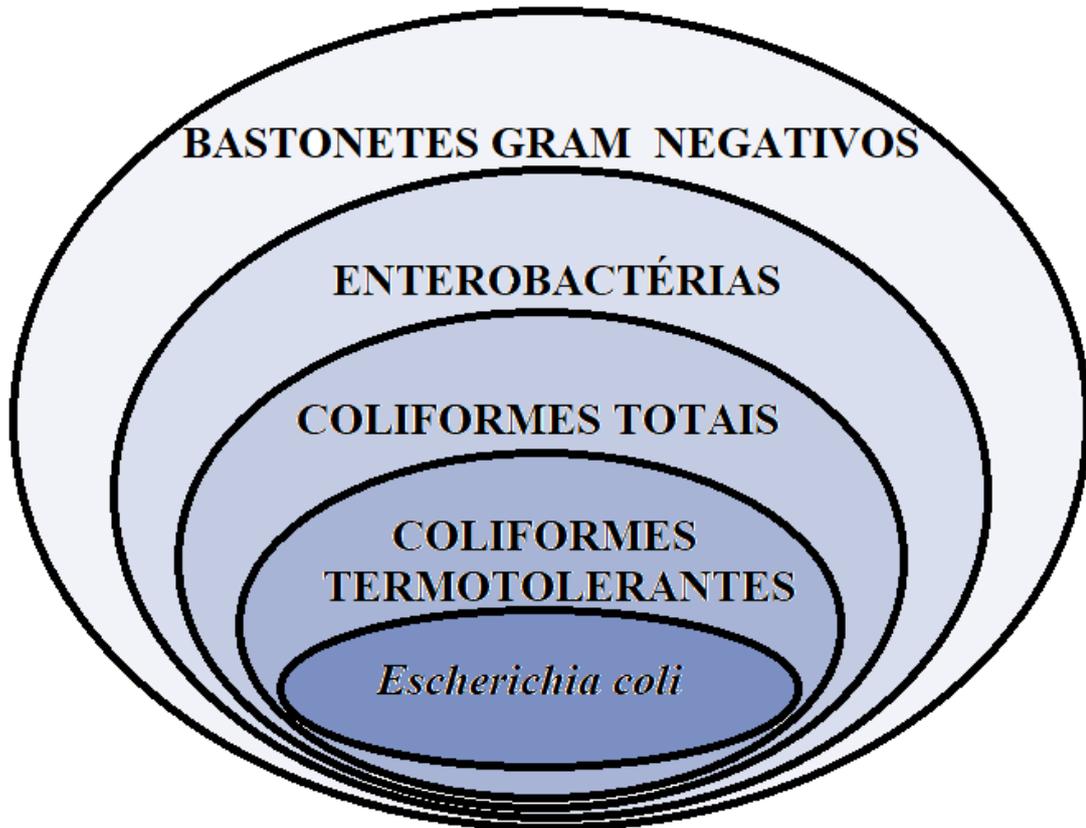
Os coliformes divididos em totais e termotolerantes (fecais). Os coliformes totais apresentam todas as características citadas anteriormente, porém não sobrevivem em temperaturas mais altas. Já os coliformes termotolerantes são bactérias que apresentam capacidade de continuar fermentando lactose, com produção de gás, quando incubadas a temperaturas de 44°C-45°C (TORTORA *et al.*, 2017; KONEMAN *et al.*, 2018).

O principal representante dos coliformes termotolerantes é a *Escherichia coli* (Figura 4) que é, exclusivamente, fecal. Em condições normais, os coliformes não são por si só patogênicos, embora certas linhagens possam causar diarreias e infecções urinárias (BRASIL, 2015; TORTORA *et al.*, 2017).

A *Escherichia coli* é a espécie mais isolada em materiais clínicos, sendo o patógeno mais comum nas infecções urinárias e, além disso, pode estar relacionada a pneumonia em pacientes imunossuprimidos, bacteremias e infecções intestinais (BRASIL, 2015; KONEMAN *et al.*,

2018).

Figura 4: Esquema de classificação de bactérias Gram negativas presentes no intestino.



Fonte: Próprio autor.

2.5. AEROMONAS.

As *Aeromonas* sp. são bacilos Gram-negativos pertencentes à família *Aeromonadaceae*, são anaeróbios facultativos e não esporulam. São citocromo oxidase-positiva, entretanto fermentam a glicose. Reduzem nitrato, porém não conseguem desnitrificar. Dependendo da espécie, podem ser consideradas psicrófilas ou mesófilas, em relação a temperatura ótima de crescimento. Normalmente, as espécies classificadas como mesófilas, apresentam motilidade positiva, por conta de possuírem flagelo polar ou até mesmo flagelos laterais (KONEMAN *et al.*, 2018).

Aeromonas sp. são amplamente presentes em ambiente aquático e são encontradas com maior probabilidade em água doce: como lagos, rios, reservatórios de água potável, águas subterrâneas e até mesmo em esgoto. Em menor frequência, também estão em águas salgadas

com baixa concentração de sal (BONIN *et al.*, 2019; PEREIRA *et al.*, 2020). Espécies deste gênero podem estar presentes em amostras de água que atendam aos padrões de qualidade para consumo humano e em alimentos, principalmente em pescados (PABLOS *et al.*, 2009; CORDEIRO *et al.*, 2020).

Determinadas espécies de *Aeromonas* possuem a capacidade causar infecções em animais, humanos ou não. Tais infecções podem acometer o trato gastrointestinal principalmente. Entretanto, existe uma gama de infecções extra intestinais causadas por algumas dessas espécies, como infecções de feridas, dos tecidos subcutâneos, fascite necrosante, sepse, infecções do trato respiratório, ocular, urogenital, meningite, infecções ósseas e das articulações (JANDA; ABBOTT, 2010; DAMER *et al.*, 2015; SOBRAL, 2018).

As espécies com maior associação com infecções em humanos são *A. hydrophila*, *A. caviae* e *A. sobria*. Estas espécies podem apresentar uma diversidade de fatores de virulência, tais como adesinas, cápsula, flagelos polar e lateral, proteases, hemolisinas, citotoxinas, enterotoxinas, leucocidina, elastase, entre outros (PEIXOTO *et al.*, 2012; GRIM *et al.*, 2014).

2.6. BACILOS GRAM-NEGATIVOS NÃO-FERMENTADORES

Bacilos Gram-negativos não-fermentadores (BGN-NF) são micro-organismos aeróbios e que não exibem a capacidade de utilizar a glicose como fonte de energia, fermentando-a. Degradando-a, então, pela via oxidativa. A maioria dos gêneros é citocromo oxidase-positiva, possui mobilidade e não forma esporos. O metabolismo dessa categoria de micro-organismos exibe uma atividade metabólica reduzida, comparados às enterobactérias. Tal fato, torna a identificação bioquímica mais complexa e demorada, sendo necessário o estudo concomitante das características morfológicas, macroscópicas e microscópicas durante o processo de identificação (KONEMAN *et al.*, 2018).

Por não fermentarem a glicose, estão adaptados à sobrevivência na natureza, seja em água, solo, alimentos, soluções desinfetantes, medicamentos e até em superfícies de instituições de saúde. Algumas espécies podem ser encontradas no intestino humano, fazendo parte da microbiota local (TRABULSI; ALTERTHUM, 2017; MAYER *et al.*, 2020).

Inicialmente, os BGN-NF eram caracterizados como oportunistas, por serem classificados como micro-organismos ambientais. Porém, com o passar dos anos, tornaram-se responsáveis por uma considerável parcela de infecções associadas aos cuidados de saúde, principalmente em indivíduos submetidos a procedimento invasivo, infecções no trato

respiratório de pacientes com fibrose cística, em queimaduras e Unidades de Terapia Intensiva (UTI). As bactérias deste grupo podem provocar inclusive, algumas infecções em não-hospitalizados e imunocompetentes (MURRAY *et al.*, 2017; KONEMAN *et al.*, 2018; DE MORAES SILVA, 2021).

Determinados gêneros e espécies de BGN-NF são conhecidos pelo seu potencial patogênico, disseminação e alta resistência a diversas classes de antimicrobianos. Tal categoria também possui grande tendência em adquirir novos mecanismos de resistência e ao mesmo tempo disseminá-los. Os gêneros mais conhecidos do grupo dos BGN-NF são: *Pseudomonas* sp., *Acinetobacter* sp., *Stenotrophomonas* sp., *Burkholderia* sp. e *Delftia* sp. Os dois primeiros gêneros são os maiores responsáveis por infecções em humanos e por contaminação de água e alimentos (ROSSI; ANDREAZZI, 2005; TORTORA *et al.*, 2017; KONEMAN *et al.*, 2018).

2.7. ESTAFILOCOCOS

O gênero *Staphylococcus* sp. pertence a ordem *Bacillales*, da família *Staphylococcaceae*. Apresenta aproximadamente 51 espécies, sendo somente 15 espécies normalmente encontradas em humanos (TRABULSI; ALTERTHUM, 2017; KONEMAN *et al.*, 2018). Os estafilococos são cocos Gram-positivos, dispostos em forma de cachos, mas podem se apresentar isoladamente. São classificados como mesófilos, com um espectro amplo de temperatura de crescimento, que varia entre 7 e 47,8° C. O pH ótimo para seu metabolismo varia entre 7 a 7,5. Não possuem mobilidade, são anaeróbios facultativos, halotolerantes, não formam esporos e produzem a enzima catalase. (TORTORA *et al.*, 2017; KONEMAN *et al.*, 2018).

São micro-organismos versáteis e encontrados por toda a natureza, em diversos tipos de ambientes e condições físico-químicas. Podem colonizar superfícies, sendo microbiota da pele e mucosas do homem e de outros animais, assim como contaminar água e alimentos. Junto a esta capacidade, existem estruturas que conferem maior sobrevivência, inclusive a ambientes inóspitos, como cápsula polissacarídica ou camada mucoide e a parede celular, que pode conter substâncias tóxicas para outras células (TRABULSI; ALTERTHUM, 2017; TORTORA *et al.*, 2017).

Os estafilococos são divididos em dois grandes grupos de acordo com a presença ou não da enzima coagulase, que confere a capacidade de coagular o plasma. Os estafilococos coagulase negativa (ECN) são normalmente encontrados nas mucosas e pele de humanos e outros animais saudáveis. Entretanto, podem causar infecções, pois se tratam de patógenos

oportunistas. Entre as principais espécies de ECN conhecidas são: *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus lugdunensis* e *Staphylococcus xylosus* (TORTORA *et al.*, 2017; KONEMAN *et al.*, 2018).

Já o *Staphylococcus aureus*, que é coagulase positiva, coloniza diversos sítios anatômicos, além de contaminar superfícies e principalmente, apresenta grande probabilidade de causar doenças. As infecções por *S. aureus* podem se apresentar em vários graus de letalidade, por conta dos possíveis fatores de virulência e resistência aos antimicrobianos. Inclusive, o sucesso adaptativo e de disseminação deste micro-organismo também no ambiente, conta com sua habilidade em formar ou estar inserido em biofilme (TRABULSI; ALTERTHUM, 2017; ACOSTA *et al.*, 2017).

O *S. aureus* pode apresentar resistência a oxacilina e causar infecções de grande importância clínica e epidemiológica. Quando há esta resistência, é chamado de *Staphylococcus aureus* Resistente à Meticilina (MRSA) e é responsável por grande parte das Infecções Relacionadas aos Serviços de Saúde (IRAS) (KOURTIS *et al.*, 2019; ALGAMMAL *et al.*, 2020).

2.8. ENTEROCOCOS

As bactérias do gênero *Enterococcus* sp. são cocos Gram-positivos, apresentando-se de maneira isolada, em pares ou em pequenas cadeias. Apresentam teste negativo para a presença da enzima catalase e são incapazes de formar esporos. São anaeróbios facultativos e crescem em um largo intervalo de temperatura, que fica 10° a 45°C e tem metabolismo ativo em pH que varia entre 5,0 e 9,6. Este gênero produz ácido láctico pelo consumo de glicose, sem produzir gás, além de sobreviverem em halofilia de, em média, 6,5% de NaCl e hidrolisarem a esculina na presença de sais biliares (TORTORA *et al.*, 2017; KONEMAN *et al.*, 2018).

Os enterococos possuem o antígeno D de Lancefield, característica que os aloca anteriormente no gênero *Streptococcus*. Porém, devido às suas características metabólicas peculiares, foi criada uma nova nomenclatura baseada no sítio de maior afinidade deste micro-organismos, o enteral. Embora sejam predominantemente bactérias do trato gastrointestinal, podem também sobreviver no meio ambiente, principalmente em água, solo e alimentos (TRABULSI; ALTERTHUM, 2017; MURRAY *et al.*, 2017).

Uma vez no meio ambiente, *Enterococcus* sp. apresenta grande resistência às condições

adversas, consegue colonizar diversas superfícies, contaminar água e até mesmo humanos e outros animais. Mesmo o gênero não sendo reconhecido como patogênico, algumas espécies podem provocar infecções graves, como endocardite e sepse, sendo *E. faecalis* e *E. faecium* as mais conhecidas. Estas duas espécies são encontradas com muita frequência nas IRAS, por serem oportunistas e ao mesmo tempo tem o alvo ideal, que são os pacientes com a imunidade insuficiente (FREITAS *et al.*, 2021; SILVA, J., 2021).

Entre espécies já citadas, evidencia-se também, resistência à diversas classes de antimicrobianos, inclusive à vancomicina. Quando há a ocorrência desta última, o enterococo é denominado *Enterococcus* Resistente à Vancomicina (VRE). O VRE é um grande desafio no tratamento da infecção e ao mesmo tempo um grande disseminador de seus genes de resistência, transmitindo para outras bactérias (DOS SANTOS *et al.*, 2021).

2.9. RESISTÊNCIA BACTERIANA

As bactérias são o grupo de micro-organismos de maior adaptação e evolução, pois tiveram origem na Terra há cerca de 3,5 bilhões de anos, sobrevivendo em um ambiente totalmente hostil, com temperaturas altíssimas, radiação ultravioleta e cósmica, tempestades e falta de nutrientes. O sucesso evolutivo fez com que este grupo tenha representantes até os dias de hoje, por todos os continentes e se deve, a estratégias como por exemplo, a estrutura do material genético, que permite a troca de genes facilmente entre elas (ANTONIO *et al.*, 2009).

A resistência bacteriana aos antimicrobianos é um mecanismo de defesa celular para manter a sobrevivência do micro-organismo, que pode ser intrínseco ou adquirido. As cepas resistentes aos antimicrobianos convencionais reduzem as chances de tratamento efetivo de doenças infecciosas causadas por tais micro-organismos (NIEDERMAN, 2000; ALVES, 2018).

Segundo Martinez e Baquero (2000), proporcionalmente ao uso indiscriminado de antimicrobianos, há o aumento cada vez maior da resistência bacteriana aos antimicrobianos utilizados e da concentração ambiental dos mesmos.

A resistência intrínseca é inerente à determinadas espécies bacterianas e faz parte da própria genética, estrutura e fisiologia bacteriana. Já a resistência adquirida, resulta de alguma alteração da estrutura e fisiologia celular ou por mudanças genéticas. A resistência pode ser adquirida por mutação genética, transferência de genes de outros organismos, ou ainda de uma associação de ambas (TENOVER *et al.* 1997; DZIDIC; BEDEKOVIC, 2003; MADIGAN *et al.*, 2016; FORBES *et al.*, 2017).

A transferência de genes entre as bactérias confere resistência a um determinado antimicrobiano, a uma classe específica deste tipo de fármaco e até a diversas classes antimicrobianas, dependendo da localização do gene, tipo de transferência e expressão. Estes genes de resistência estão localizados no cromossomo bacteriano ou nos plasmídeos (DAVISON, 1999; DZIDIC; BEDEKOVIC, 2003; KÜMMERER, 2009; KONEMAN *et al.*, 2018).

Segundo Tortora e colaboradores (2017), os plasmídeos são estruturas que conferem diversas vantagens, como transportar genes para atividades de resistência aos antimicrobianos, tolerância a metais tóxicos, produção de toxinas e síntese de enzimas. Ainda na transferência destes genes, os mesmos podem ter mobilidade entre bactérias da mesma espécie ou de espécies diferentes, por mecanismos de recombinação e troca, denominados de transferência horizontal (MUELA *et al.*, 1994; DAVISON, 1999).

De acordo as pesquisas de Schmidt e colaboradores (2001), a transferência horizontal é apontada como um fator relevante na presença de cepas patogênicas no meio ambiente. A conjugação é o mecanismo mais comum de transmissão de genes de resistência, mas para isso é necessário o contato entre as células bacterianas (SENGUPTA *et al.*, 2011).

De acordo com Luz (2008), a transposição é a transferência de genes dentro de uma mesma célula através de transposons (DNA). Na transformação, há a captação de DNA solúvel no meio por células receptoras competentes. Já no mecanismo de transdução, a transferência genética acontece com o auxílio de bacteriófagos.

Além da transferência de material genético, as bactérias podem adquirir resistência aos antimicrobianos, devido a alteração da proteína alvo, inativação enzimática, alteração da permeabilidade da membrana e ao mecanismo de efluxo (SMALLA *et al.*, 2000).

Na alteração da permeabilidade da membrana, há alteração dos canais de porinas, que dificulta a penetração celular do fármaco e reduz a ação do mesmo. A alteração da proteína alvo faz com que não haja ligação entre a superfície bacteriana e a molécula do antimicrobiano. Na inativação enzimática, são produzidas enzimas que modificam a estrutura molecular do fármaco, inibindo a atividade antibacteriana. Um curioso mecanismo é o de efluxo, onde funciona uma bomba que expulsa o antimicrobiano do interior da bactéria (SMALLA *et al.*, 2000; ROSSI; ANDREAZZI, 2005).

Além das estratégias bacterianas relacionadas, a exposição destes micro-organismos aos antimicrobianos, pode favorecer à seleção de bactérias resistentes e posteriormente haverá a reprodução e predomínio das mesmas. Porém, não só antimicrobianos podem induzir uma seleção, como também os metais-traço (GUARDABASSI *et al.*, 1998).

Existe ainda um fenômeno chamado persistência bacteriana e é determinado pela presença de células chamadas *persisters*, as quais são caracterizadas como uma pequena fração da população capaz de permanecer viável após a exposição a elevadas concentrações de antimicrobianos bactericidas, mesmo sendo fenotipicamente suscetíveis a estes fármacos (LEWIS, 2010).

A presença destas células está relacionada à falha na terapia antimicrobiana, especialmente em infecções crônicas e recorrentes, visto que estas são capazes de retomar o crescimento após a redução dos níveis do antimicrobiano, o que pode levar à recidiva do quadro infeccioso (MULCAHY, 2010).

O ambiente nos esgotos é altamente seletivo para os micro-organismos, tanto em efluentes residenciais e industriais como também nos hospitalares. Tendo sido já detectadas bactérias resistentes, principalmente quando o tratamento não está sendo eficaz (LINTON *et al.*, 1974).

Com base neste tipo de achado, existe grande preocupação com os efluentes hospitalares por conterem uma proporção maior de bactérias mais resistentes, porém as mesmas podem contaminar, em seu curso, o esgoto residencial, industrial e as Estações de Tratamento de Esgotos (ETE) (MEIRELLES-PEREIRA *et al.*, 2002; BAQUERO, 2004; RIBEIRO *et al.*, 2020).

2.10. DETECÇÃO FENOTÍPICA DE MECANISMOS DE RESISTÊNCIA EM ENTEROBACTÉRIAS

Os testes fenotípicos consistem em metodologias não-moleculares para a detecção da resistência bacteriana aos antimicrobianos de maior importância terapêutica ou epidemiológica. Os testes mais difundidos se aplicam na detecção de β -lactamases de espectro estendido (ESBL) (resistência às cefalosporinas de terceira e quarta geração) e as carbapenemases (resistência aos carbapenêmicos) (BRADFORD, 2001; KONEMAN *et al.*, 2018).

2.10.1 Beta-lactamases de espectro estendido.

As beta-lactamases hidrolisam o anel beta-lactâmico, impossibilitando a atividade antimicrobiana. Estas enzimas clivam o anel beta-lactâmico, alterando assim a estrutura do

antimicrobiano, que não consegue se ligar efetivamente às Proteínas Ligadoras da Penicilina (PBPs), o que permite que a síntese da parede celular bacteriana continue normalmente (FORBES *et al.*, 2017).

A especificidade destas enzimas aos beta-lactâmicos determina a eficácia da hidrólise dos mesmos. A capacidade ou não da beta-lactamase de conferir resistência aos antimicrobianos beta-lactâmicos de amplo espectro irá depender da quantidade de enzima produzida pelo micro-organismo, da habilidade dessa enzima em hidrolisar o antimicrobiano e da velocidade com que o beta-lactâmico penetra pela membrana externa (LIVERMORE, 1991).

As beta-lactamases foram originadas provavelmente, devido à pressão seletiva exercida por organismos existentes no solo, produtores de compostos beta-lactâmicos (BRADFORD, 2001; KONEMAN *et al.*, 2018).

A síntese destas enzimas pode ser cromossômica (constitutiva) ou mediada por plasmídeos (indutiva). A produção destas enzimas pode ser induzida tanto pela presença de beta-lactâmicos como de precursores da parede celular no meio extracelular (SAMAHAKFOURY; ARAJ, 2003; KONEMAN *et al.*, 2018).

As enzimas beta-lactamases apresentam duas classificações: uma proposta por Ambler em 1980; e outra desenvolvida por Bush, Jacoby e Medeiros, em 1995. A primeira está baseada na estrutura molecular e na homologia nas sequências de aminoácidos, resultando em quatro grupos (A, B, C e D). A Classificação de Bush se baseia nas propriedades bioquímicas, estrutura molecular e sequências nucleotídicas, separando as enzimas em quatro grupos funcionais e subgrupos (Quadro 1) (BUSH *et al.*, 1995).

As ESBL estão classificadas dentro do grupo funcional 2, segundo Bush *et al.* (1995), e da classe A de Ambler (1980). Estas enzimas são capazes de hidrolisar cefalosporinas e monobactâmicos, mas não as cefamicinas e os carbapenêmicos (BUSH *et al.*, 1995; YGITI *et al.*, 2001). São inibidas por compostos como o ácido clavulânico (clavulanato), o sulbactam e/ou o tazobactam (BUSH *et al.*, 1995; BRADFORD, 2001; PFALLER; SEGRETI, 2006).

Quadro 1 – Classificação de beta-lactamases.

BUSH, JACOBY, MEDEIROS	BUSH	CLASSE MOLECULAR	SUBSTRATOS ENZIMÁTICOS PREFERENCIAIS	INIBIÇÃO PELOS INIBIDORES DE β-LACTAMASES		ENZIMAS REPRESENTATIVAS
				AC. CLAV.	EDTA	
1	1	C	Cefalosporinas	-	-	Enzimas AmpC (Bactérias gram-negativas)
2a	2a	A	Penicilinas	+	-	PCases gram-positivas
2b	2b	A	Penicilinas, Cefalosporinas	+	-	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	2b	A	Penicilinas, cefalosporinas de amplo espectro e monobactams	+	-	TEM-3 a TEM-26, SHV-2 a SHV-6, <i>Klebsiella oxytoca</i> K1
2br	N.I.	A	Penicilinas	+/-	-	TEM-30 a TEM-36, TRC-1
2c	2c	A	Penicilinas (carbenicilina)	+	-	PSE-1, PSE-3, PSE-4
2d	2d	D	Penicilinas (cloxacilina)	+/-	-	OXA-1 a OXA-11, PSE-2
2e	2e	A	Cefalosporinas	+	-	CSase induzíveis do <i>Proteus vulgaris</i>
2f	N.I.	A	Penicilinas, cefalosporinas e carbapenems	+	-	<i>Enterobacter cloacae</i> (NMC-A), <i>Serratia marcescens</i> (Sme-1)
3	3	B	Maioria dos β-lactâmicos + carbapenems	-	+	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (L1), <i>Bacteriodes fragilis</i> (Cora)
4	4	N.D.	Penicilinas	-	?	PCase - <i>Burkholderia cepacia</i>

Abreviaturas: Csase = cefalosporinase; Pcase = penicilinase; Cxase = cefalosporinase que hidrolisa a cefuroxima; N.I. = Não Incluída; N.D. = Não Determinada; EDTA = Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético; Ác. Clav. = Ácido Clavulânico

Fonte: Adaptado de BUSH *et al.*, 1995.

As enzimas ESBL possuem, geralmente, localização plasmidial, porém podem ter sido originadas nos cromossomos, já que muitas enterobactérias contêm enzimas cromossômicas constitutivas. Os plasmídeos que carregam os genes codificadores de ESBL podem conter também determinantes de resistência para outros grupos de antimicrobiano: quinolonas, sulfonamidas, trimetoprim, cloranfenicol, tetraciclina e aminoglicosídeos (BRADFORD, 2001; COQUE *et al.*, 2002; SILVA; LINCOPAN, 2012).

As enzimas ESBL são agrupadas e denominadas de acordo com a similaridade com outras enzimas precursoras e/ou com grupos já conhecidos. A maioria delas é derivada das beta-lactamases dos tipos TEM e SHV. Outros tipos de ESBL, relevantes clinicamente, são: CTX-M, OXA, PER, VEB, CME, TLA, SFO, GES e BES (NAAS *et al.*, 2008; NORDMANN *et al.*, 2009).

As cepas produtoras de ESBL são encontradas em todo o mundo, inclusive no Brasil, onde estão disseminadas no ambiente (LIVERMORE; WOODFORD, 2006). As ESBL são encontradas normalmente em enterobactérias, principalmente na *Escherichia coli* e na *Klebsiella pneumoniae*, mas podem estar presentes em todas as espécies desta família (SADER *et al.*, 2001; SASAKI *et al.*, 2010, SILVA; LINCOPAN, 2012).

As enterobactérias produtoras de ESBL já foram detectadas em amostras fecais, em

alimentos e esgoto, aumentando ainda mais a preocupação com a disseminação ambiental das bactérias com este tipo de mecanismo de resistência (MESA *et al.*, 2006; SILVA; LINCOPAN, 2012; BUSH; BRADFORD, 2020).

2.10.2 Carbapenemases.

As carbapenemases pertencem a uma família de enzimas com ampla atividade hidrolítica à maioria dos antibióticos beta-lactâmicos (QUEENAN & BUSH, 2007). Distinguíveis pela conformação do seu sítio ativo, as carbapenemases pertencem à classe A de Ambler (carbapenemases de classe A), classe B (metalobetalactamases) e classe D (oxacilinas/Beta-lactamases) (DIENSTMANN *et al.*, 2010).

Quanto às carbapenemases de classe A (serino-carbapenemases), três grandes famílias de enzimas estão incluídas: NMC/IMI, SME e KPC, que se caracterizam por hidrolisar uma variedade de antibióticos beta-lactâmicos, incluindo carbapenêmicos, cefalosporinas, penicilinas e aztreonam e podem ser inibidas pelo ácido clavulânico e tazobactam (QUEENAN; BUSH, 2007).

A enzima KPC é uma serino-carbapenemase de grande relevância epidemiológica. As Beta-lactamases do tipo KPC hidrolisam penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos (aztreonam) e carbapenêmicos e são fracamente inibidas pelo ácido clavulânico e pelo tazobactam (NORDMANN *et al.*, 2009; SILVA; LINCOPAN, 2012).

Algumas análises genéticas dos genes *blaKPC* indicaram que sua mobilidade e disseminação estão relacionadas a um transposon *Tn3*-based, *Tn4401*, que é transportado por grandes plasmídeos variando em tamanho e estrutura (NAAS *et al.*, 2008; NORDMANN *et al.*, 2009).

Segundo Monteiro e colaboradores (2009), Peirano e colaboradores (2009) e Ribeiro e colaboradores (2020), a enzima KPC normalmente é presente em *K. pneumoniae*, no entanto já foi encontrada em outras espécies de enterobactérias em todos os continentes.

Ainda na classe A, foi descoberta em 2015 aqui no Brasil, uma serino-carbapenemase até então desconhecida, a BKC (Brasileira *Klebsiella* Carbapenemase). Este surgimento demonstra a diversidade e rápida evolução de Beta-lactamases em isolados clínicos de *K. pneumoniae*. (NICOLETTI *et al.*, 2015).

Na classe B, das metalobetalactamases, podemos encontrar os tipos VIM (Verona Imipenemase), IMP (Imipenemase) em enterobactérias. O isolamento dos genes *blaIMP* e

*bla*VIM ocorreram inicialmente em pacientes internados em instituições de saúde e embora ocorram em outros ambientes, ainda são predominantemente hospitalares (QUEENAN; BUSH, 2007; ANVISA, 2013; DE PAULA *et al.*, 2017).

Já na classe D, as oxacilinas, ainda são menos frequentes que as outras duas primeiras, principalmente no Brasil. As oxacilinas podem estar associadas a outros mecanismos de beta-lactamases, como CTX-M, que é uma enzima de ESBL. Podemos citar a OXA-48 e a OXA-23 como as mais relevantes no contexto epidemiológico (WANG; ZONG; LU, 2011; ANVISA, 2013).

3. JUSTIFICATIVA

As bactérias resistentes aos antimicrobianos são causadoras de infecções de difícil tratamento, pois as opções de fármacos são reduzidas e muitas vezes nulas. Tais micro-organismos podem estar presentes no ambiente, inclusive no esgoto, trocando genes de resistência e aumentando a morbimortalidade da população, devido ao risco de contaminação. Ao mesmo tempo que é um problema de Saúde Pública, observa-se também o impacto ambiental que bactérias resistentes podem causar, modificando as características naturais e desequilibrando ecossistemas.

O tratamento de efluentes é essencial para a manutenção do equilíbrio ambiental e saúde populacional. Por conta deste fator, levamos o foco para as Estações de Tratamento de Esgotos da FIOCRUZ, uma instituição de grande porte que por conta da especificidade do trabalho realizado, foi escolhida como objeto de estudo, já que essa análise mais profunda e a comparação entre as estações não havia ainda sido realizada.

Considerando os fatores apresentados, observa-se a grande importância de trabalhos que visem a vigilância da resistência bacteriana através da pesquisa de micro-organismos com essa característica nas águas residuais, o que contribui não só para as informações associadas diretamente à saúde pública, através da busca ativa de micro-organismos potencialmente patogênicos, o que pode alertar para a possível contaminação dos indivíduos expostos, como, em paralelo, busca-se o foco ecológico e conservação ambiental, mesmo com a intensa ação antrópica, verificando também a efetividade do tratamento dos efluentes antes do seu retorno aos corpos aquáticos urbanos.

4. OBJETIVOS

4.1 - OBJETIVO GERAL

- Detectar bactérias resistentes aos principais antimicrobianos utilizados, em duas Estações de Tratamento de Esgotos da FIOCRUZ comparando sua efetividade.

4.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Rastrear a presença de enterobactérias resistentes aos antimicrobianos;
- Identificar a presença de *Aeromonas* sp. e bacilos Gram-negativos não-fermentadores resistentes às cefalosporinas, nas estações;
- Realizar a pesquisa de cocos Gram-positivos nas duas ETE, pela triagem de MRSA e VRE nas amostras coletadas;
- Caracterizar os mecanismos de resistência antimicrobiana das enterobactérias não-sensíveis (resistentes ou intermediárias) aos carbapenêmicos, por testes fenotípicos e moleculares, buscando genes associados a este evento;
- Verificar as possíveis diferenças entre os resultados obtidos nas culturas quantitativas e qualitativas, nas coletas das duas ETE;

5. METODOLOGIA

5.1. MÉTODOS GERAIS.

O trabalho foi caracterizado inicialmente por pesquisa bibliográfica documental, exploratória e descritiva, seguida de um estudo observacional do tipo transversal.

Foram utilizadas metodologias baseadas no *American Public Health Association* (APHA, 2017) para análise de esgotos, adaptadas às práticas laboratoriais e recursos disponíveis, embasadas nos compêndios existentes.

As demais metodologias utilizadas estão descritas abaixo e presentes em Procedimento Operacional Padrão (POP) do Laboratório de Microbiologia (Labmicro) do Departamento de Ciências Biológicas, na Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca – FIOCRUZ, onde as amostras foram processadas.

5.2. COLETA DAS AMOSTRAS.

A técnica consiste na coleta do afluente, na entrada das ETE e efluente, na saída das ETE. Foram realizadas quatro coletas de amostras simples, durante o período da manhã. Os pontos de coleta compreendem: afluente (esgoto bruto que vem da rede coletora) e efluente tratado.

A Estação Central foi escolhida inicialmente para a realização do trabalho, posteriormente foi acrescentada a Estação INI (Instituto Nacional de Infectologia), construída para atender ao Hospital campanha para enfrentamento da pandemia por COVID-19, possibilitando mais pontos de coleta e comparações entre as ETE.

As coletas foram realizadas pelos operadores das ETE, visto que somente eles, poderiam fazê-las no período pandêmico. Os mesmos seguiram os protocolos de biossegurança (BRASIL, 2006; TEIXEIRA; VALLE, 2010; OPAS, 2021), tanto no procedimento de coleta quanto na utilização dos Equipamentos de Proteção Individual (EPI) (Figuras 5-9). Foi permitido apenas o acompanhamento e o registro fotográfico do processo de coleta, para a descrição no presente trabalho.

Figura 5 – Coleta realizada em esgoto bruto da ETE Central.



Fonte: Próprio autor.

Figura 6 – Coleta realizada em esgoto tratado da ETE Central.



Fonte: Próprio autor.

Figura 7 – ETE do Centro Hospitalar COVID-19 – INI/FIOCRUZ.



Fonte: Próprio autor.

Figura 8 – Coleta realizada em esgoto bruto da ETE INI.



Fonte: Próprio autor.

Figura 9 – Coleta realizada em esgoto tratado da ETE INI.



Fonte: Próprio autor

Após autorização da realização do trabalho no local proposto, as coletas foram realizadas pela manhã, entre os meses de agosto e setembro de 2021, como apresentado na tabela 1, em decorrência da necessidade de processar rapidamente as amostras no Laboratório para não permitir a competição bacteriana *in vitro*.

Foram realizadas semanalmente, quatro coletas de cada local, com o intuito de possibilitar estatisticamente, uma comparação entre os resultados encontrados e levando em consideração que sazonalidade não interfere na composição do esgoto. O volume coletado em cada ponto foi de 1L, armazenado em frascos estéreis graduados (Figura 10) etiquetados de acordo com local e horário da coleta e transportados em caixa refrigerada para o Labmicro, de acordo com as especificações do *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2017).

Tabela 1 – Dados de coleta das amostras de esgoto

Coleta	Dia	Horário	Local	Tipo
1	10/08/21	9:05	Central	Bruto
1	10/08/21	9:12	Central	Tratado
1	10/08/21	10:00	INI	Bruto
1	10/08/21	10:05	INI	Tratado
2	17/08/21	9:10	Central	Bruto
2	17/08/21	9:18	Central	Tratado
2	17/08/21	10:20	INI	Bruto
2	17/08/21	10:28	INI	Tratado
3	24/08/21	9:02	Central	Bruto
3	24/08/21	9:08	Central	Tratado
3	24/08/21	9:50	INI	Bruto
3	24/08/21	9:56	INI	Tratado
4	01/09/21	9:20	Central	Bruto
4	01/09/21	9:28	Central	Tratado
4	01/09/21	10:30	INI	Bruto
4	01/09/21	10:35	INI	Tratado

Figura 10 – Aspecto da amostra e armazenamento em frasco estéril graduado.

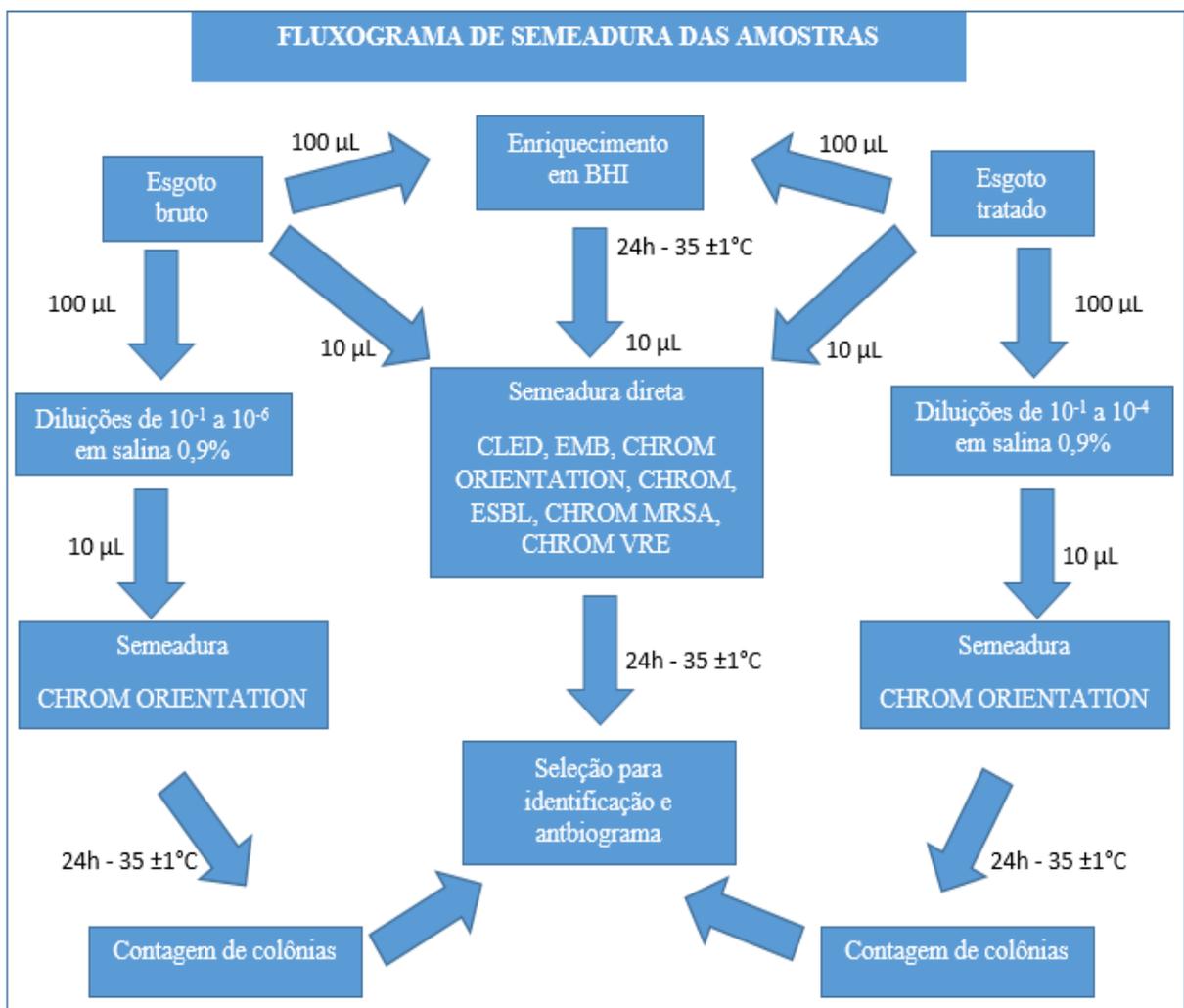


Fonte: Próprio autor

5.3 PREPARO E SEMEADURA DAS AMOSTRAS.

As amostras de esgoto, após recepção no laboratório, foram semeadas diretamente nos meios de cultura (100 µL), sendo também realizadas diluições em solução salina estéril (NaCl a 0,9%), nas concentrações de 10^{-1} a 10^{-4} , para esgoto tratado e de 10^{-1} a 10^{-6} para esgoto bruto (figura 11). As diluições são essenciais para realizar a contagem de colônias comparando a proporcionalidade das mesmas em cada placa.

Figura 11 – Fluxograma de semeadura das amostras de esgoto bruto e tratado provenientes das ETE Central e INI.



Após esse procedimento, 10µL de cada diluição foram semeados nos meios de cultura seletivos-indicadores para crescimento e isolamento das bactérias presentes e também daquelas que já poderiam ser selecionadas como resistentes, de acordo com o meio utilizado. Todas as semeaduras foram realizadas em duplicata.

Os meios escolhidos para o isolamento dos micro-organismos alvo, compreendem: Ágar

CLED (*Cystine Lactose Electrolyte Deficient*), CHROMagar Orientation e ágar EMB (*Eosin Methylene Blue Agar*), CHROMagar ESBL, CHROMagar MRSA e CHROMagar VRE. Já para enriquecimento, foi utilizado o meio BHI (*Brain Heart Infusion Broth*) (HSIAO *et al.*, 2014; WEISS *et al.*, 2015; APHA, 2017; CEBALLOS; DINIZ, 2017; CASTRO *et al.*, 2018; MEIRA *et al.*, 2018; CLSI, 2019; LIMA *et al.*, 2021).

O ágar CLED é comumente utilizado para isolamento, indicação de fermentação da lactose e quantificação de micro-organismos presentes em diversos locais, principalmente em sítio urinário. A deficiência de eletrólitos inibe o fenômeno de *swarming* produzido por determinadas cepas do gênero *Proteus*. Este fenômeno é possível pela rápida mobilidade da bactéria e se caracteriza por projeções radiais da colônia em meio sólido, formando um “véu” (MURRAY *et al.*, 2017; KONEMAN, 2018).

O ágar EMB contém corantes de eosina e azul-de-metileno que inibem as bactérias Gram-positivas e indicam a fermentação ou não da lactose. As colônias de *Escherichia coli* normalmente apresentam um reflexo verde metalizado característico, devido à rápida fermentação da lactose (MURRAY *et al.*, 2017; KONEMAN, 2018).

Depois de semeadas, as placas foram incubadas em estufa a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas para crescimento bacteriano e posteriormente realizou-se o repique das colônias de interesse para o estudo. Os resultados do crescimento de colônias foram expressos em UFCs (unidades formadoras de colônias) nos meios de cultura utilizados, correspondentes às amostras de esgoto dos diferentes estágios do sistema de tratamento do mesmo (APHA, 2017; CLSI, 2019).

Para uma maior recuperação de bactérias resistentes, objeto deste estudo, foram utilizados meios de cultura cromogênicos contendo antimicrobianos, direto da amostra e após enriquecimento da mesma, em BHI.

Após as primeiras 24 horas da incubação citada anteriormente, a partir do crescimento em meio líquido (BHI), foi realizado o esgotamento de 10 μL do inóculo nos meios cromogênicos seletivos (Figura 11). Logo em seguida, procedeu-se novamente a incubação em estufa bacteriológica a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas e as colônias foram de interesse foram repicadas para os testes seguintes.

Para os selecionar os Gram-negativos resistentes à cefalosporinas de terceira geração, foi utilizado o meio CHROMagar ESBL (Plast Labor) (HORNSEY *et al.*, 2013; GIRLICH *et al.*, 2019; LIMA *et al.*, 2021).

Em paralelo, para os Gram-positivos, foi utilizado o CHROMagar MRSA para a pesquisa de MRSA, e para a pesquisa de VRE, o CHROMagar VRE (Plast Labor) (HSIAO *et al.*, 2012; HSIAO *et al.*, 2014; WEISS *et al.*, 2015).

Todas as placas utilizadas contendo meios de cultura, inclusive aquelas contendo antimicrobiano, foram autoclavadas. Este processo visa minimizar a carga microbiana para descarte e também inativar os antimicrobianos presentes no material. Todos os antimicrobianos utilizados são termolábeis, sendo facilmente inativados para reduzir o impacto ambiental e não favorecer o aparecimento de mais bactérias resistentes (INSTITUTO BUTANTAN, 2012).

5.4 IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA BACTERIANA.

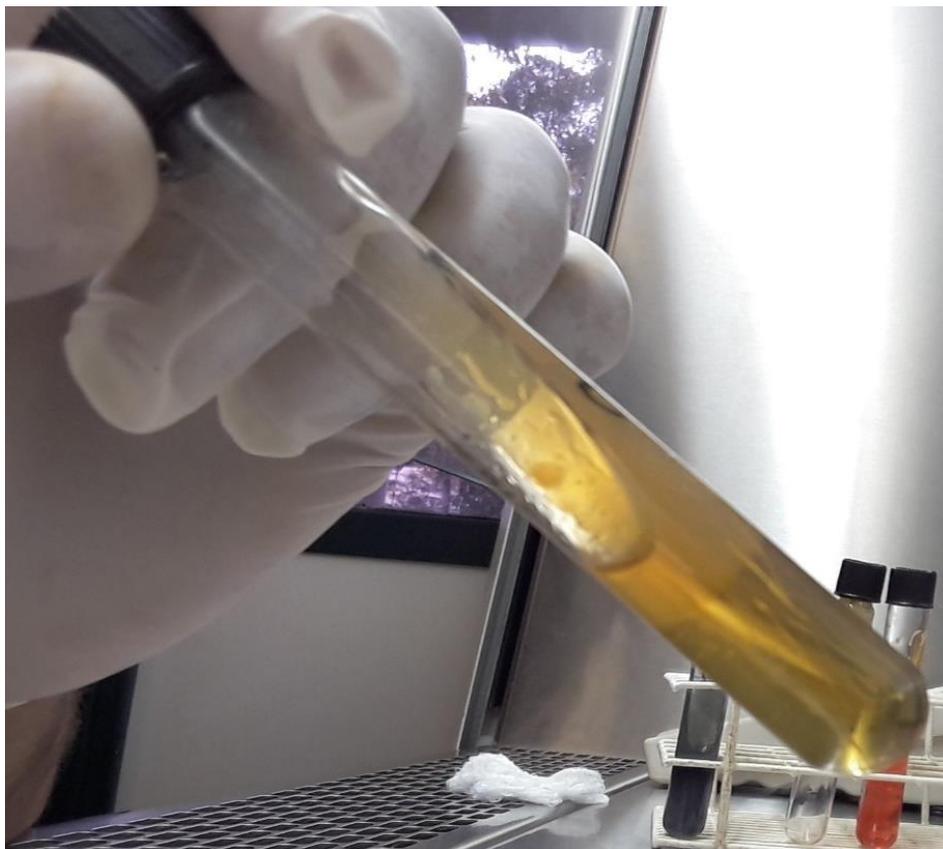
O preparo do inóculo bacteriano foi baseado na escala de turbidez de Mc Farland (tubo 0,5), que se fundamenta na turvação correspondente a uma determinada concentração bacteriana em meio líquido, que se relaciona a grandeza de aproximadamente 10^8 UFC (Unidades Formadoras de Colônia) por mL (NOGUEIRA; MIGUEL, 2010; CLSI, 2019).

Dependendo do tipo bacteriano, foi alcançado este grau na escala, retirando-se de duas ou três colônias do micro-organismo e diluindo em aproximadamente três mililitros de solução salina a 0,9%, homogeneizando em agitador de tubos. Foi utilizada uma escala para determinar os padrões de referência de turbidez por comparação visual e, em caso de dúvida, foi utilizado o turbidímetro (DENSICHECK®) (OPLUSTIL, 2010).

A seleção das colônias para o isolamento, foi posterior a realização da coloração de Gram, seguido de testes preliminares oxidase, catalase e coagulase dependendo das características morfotintoriais exibidas pelas bactérias (MURRAY *et al.*, 2017; KONEMAN, 2018).

As bactérias Gram-negativas foram submetidas aos meios de triagem: CV proposto por Costa & Vernin (figura 12) (COSTA; HOFER, 1972), SIM (Ácido Sulfídrico/Indol/Motilidade), Ágar base ureia (Christensen), ágar citrato (Simmons), fermentação da glicose com verificação da produção de gás e a desaminação dos aminoácidos lisina, arginina e ornitina. Para a diferenciação entre as espécies de *Aeromonas* sp. foi realizado o teste de VP (Voges-Proskauer) (CUNHA; SILVA, 2006; MURRAY *et al.*, 2017; KONEMAN, 2018).

Figura 12 – Meio CV proposto por Costa & Vernin.



Fonte: Próprio autor.

Para os BGN-NF, foram adicionadas as seguintes provas, além das anteriores: crescimento à 42°C, sensibilidade à polimixina, prova de DNAase, crescimento em NaCl 6,5% e visualização de pigmento em meio não-cromogênico (ANVISA, 2005; KONEMAN, 2018).

As bactérias Gram-positivas, após crescimento, foram submetidas às provas de catalase, coagulase, fermentação de manitol, motilidade, crescimento em NaCl 6,5% e oxidase (KONEMAN, 2018).

Após a semeadura, estes meios foram incubados em estufa a 35°C ± 1°C por 18 a 24 horas. A identificação de espécie bacteriana foi realizada através da utilização de provas bioquímicas convencionais (CUNHA; SILVA, 2006; MURRAY *et al.*, 2017; KONEMAN, 2018). As amostras identificadas foram preservadas em ágar estoque à temperatura ambiente e a -20°C em meio de BHI acrescido de 20% de glicerol, para as futuras análises de resistência aos antimicrobianos.

Para as identificações bioquímicas nos meios convencionais que apresentaram dúvidas na definição de espécie, foram realizadas identificações em método automatizado em equipamento VITEK 2® (BioMérieux) para a confirmação (figura 13).

O equipamento é constituído por um sistema de enchimento/selador de cartões, uma incubadora/leitadora e um computador com o software. Para a identificação microbiana foram utilizados cartões projetados para identificação, compostos por 47 poços (GN) que contêm substratos bioquímicos desidratados, não sendo necessário nenhum reagente adicional. O sistema VITEK apresenta um software que processa e interpreta os resultados. A identificação realizada pelo VITEK abrange mais de 500 espécies microbianas de importância clínica, ambiental e da indústria de alimentos (BIOMÉRIEUX, 2013).

As cepas bacterianas de interesse foram cultivadas em Ágar triptona de soja (TSA) e incubadas a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. Uma suspensão homogênea foi preparada a partir dessa cultura e a turvação ajustada a 0,5-0,63 da escala de McFarland por meio de um turbidímetro (DENSICHECK®).

Os cartões foram abertos e colocados no cassete, de forma que o canudo do cartão ficasse dentro do inóculo e posteriormente foram levados para câmara de vácuo do equipamento. Em seguida, este cassete foi transferido para a segunda câmara para leitura. Após a leitura do código de barras dos cartões, esses foram identificados no computador. Os resultados foram obtidos após 5-6 horas (BIOMÉRIEUX, 2013).

Figura 13 – Vista frontal do equipamento VITEK 2® (BioMérieux) e seus cartões inseridos em cassetes.



Fonte: Adaptado de BioMérieux (2013).

5.5 TESTE DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS.

A suscetibilidade dos micro-organismos isolados foi avaliada através da metodologia de difusão em ágar (disco-difusão). A partir do crescimento da cultura pura, uma alçada das

colônias foi transferida para uma solução salina e a suspensão comparada com o padrão de turvação 0,5 da escala de Mc Farland. Em seguida, foi realizada a semeadura no meio de ágar *Müller-Hinton* e os discos de antibióticos (Oxoid®) próprios para bactérias Gram-negativas foram introduzidos no meio.

Na realização do Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos (TSA), foram utilizados diversos antimicrobianos com base nos compêndios (*Guidelines*) aceitos no país: o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2019) e o *Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (BrCAST, 2019), baseado no *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST, 2019).

Devido a impasses sobre a utilização dos mesmos e às adequações normativas em nosso país, deferiu-se a favor da escolha de mais de um *guideline*. Os antimicrobianos utilizados foram: ampicilina, ampicilina+sulbactam, piperacilina+tazobactam, amoxicilina+ácido clavulânico, cefoxitina, ceftriaxona, ceftazidima, cefepime, ciprofloxacino, gentamicina, amicacina, imipenem, ertapenem, meropenem e polimixina B/colistina.

As placas foram colocadas na estufa a $35\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 18 ± 2 horas. O resultado do teste de difusão em ágar para a resistência aos antimicrobianos foi obtido através da medida do diâmetro do halo de inibição de crescimento provocado pelos discos de cada antimicrobiano colocados nas placas semeadas. De acordo com a comparação entre o diâmetro do halo de inibição e os *Guidelines* foi possível verificar se a bactéria é sensível, se apresenta resistência intermediária ou é resistente aos antibióticos testados. Os diâmetros da zona de inibição são particulares para cada droga e micro-organismo e todos os critérios interpretativos foram padronizados pelo CLSI e BrCAST (2019).

5.6 TESTES FENOTÍPICOS.

5.6.1 Sinergismo por disco-aproximação.

Para a detecção fenotípica da produção de ESBL nas enterobactérias, foi empregado o teste de aproximação de discos (JARLIER *et al.*, 1988). No teste de aproximação de discos, o preparo da suspensão e o inóculo em placa de ágar *Müller-Hinton* são realizados da mesma maneira como no teste de suscetibilidade descrito anteriormente.

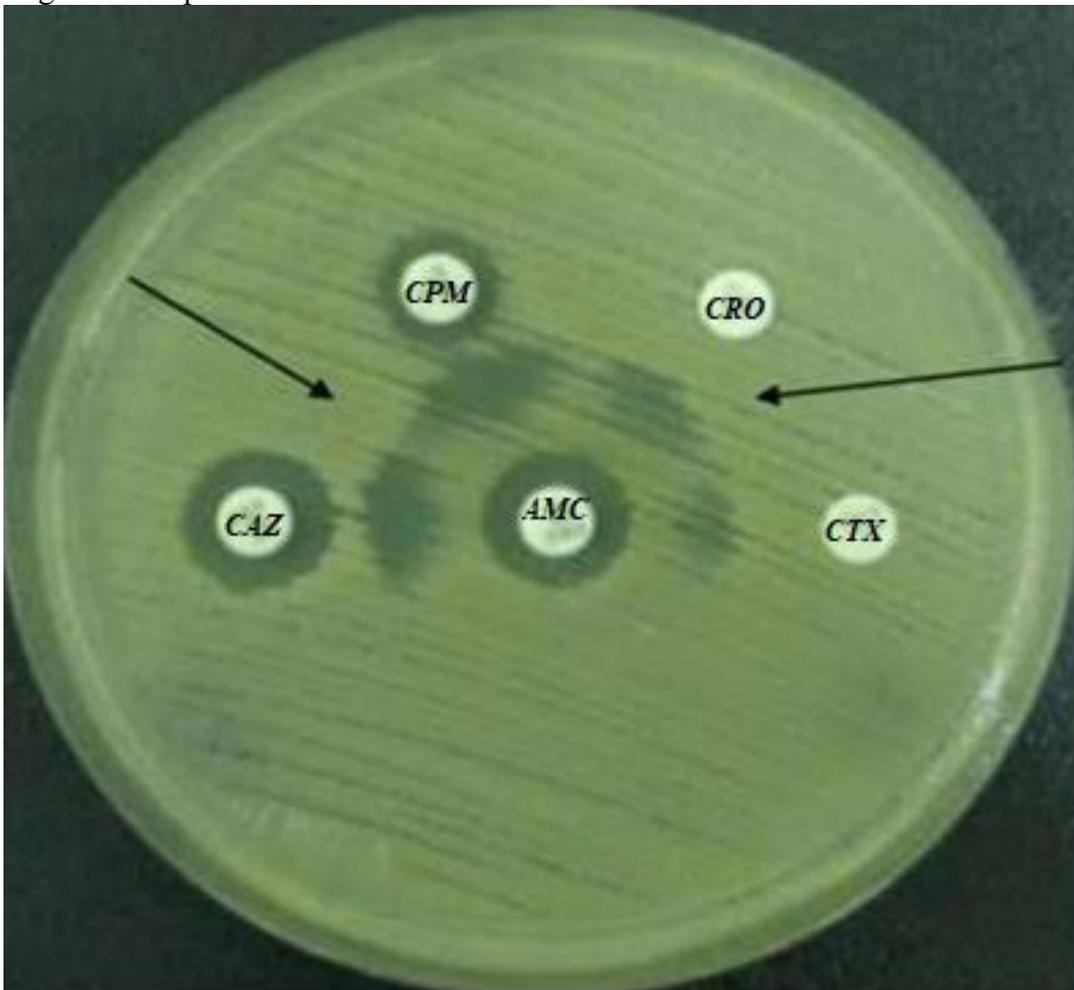
No centro da placa com ágar Mueller Hinton semeada com a amostra para teste, é colocado um disco contendo amoxicilina em conjunto com um inibidor de beta-lactamases, o

ácido clavulânico e, ao redor deste, colocados discos de antimicrobianos (cefotaxima, ceftazidima e cefepime) a uma distância de 20mm centro a centro.

As placas foram colocadas na estufa a 35°C, por 16 a 18 horas. Após a incubação, uma deformação no halo de inibição do β -lactâmico próximo ao disco contendo o ácido clavulânico é indicativa de um resultado positivo (Figura 14) (JARLIER *et al.*, 1988).

Já para o teste de detecção de β -lactamases do tipo AmpC, foram utilizados os discos de meropenem e ceftaxina, que induzem uma deformação do halo ou até mesmo um achatamento característico em caso de teste positivo (CLSI, 2019).

Figura 14 – Exemplo de teste positivo de sinergismo para confirmação de organismos produtores de ESBL.



Os antimicrobianos implantados foram amoxicilina + ácido clavulânico (AMC), ceftazidima (CAZ), cefotaxima (CTX), ceftriaxona (CRO) e cefepime (CPM). Fonte: BATOOL *et al.*, 2016.

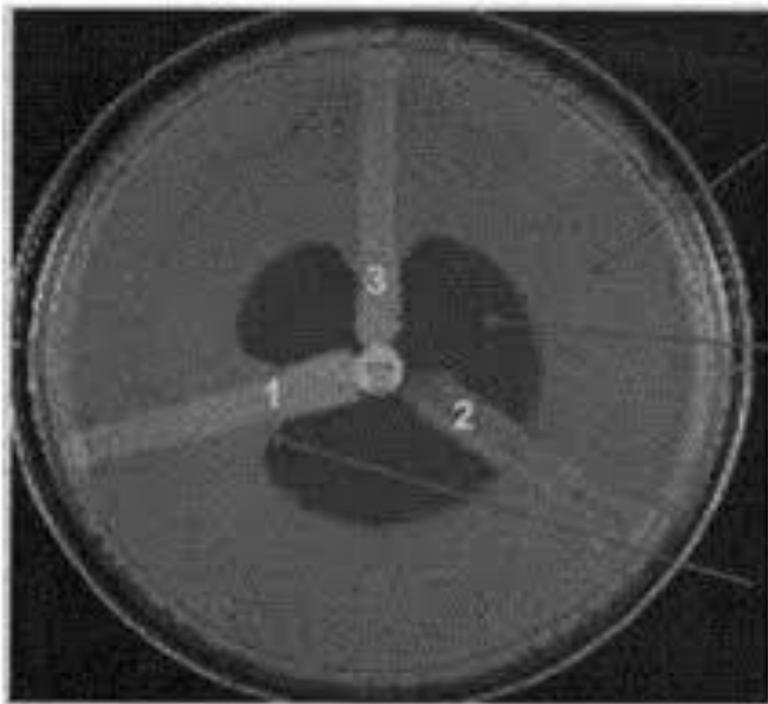
5.6.2 Teste de Hodge modificado.

Cepas bacterianas que apresentaram resistência ou sensibilidade reduzida aos carbapenêmicos, de acordo com as recomendações do CLSI (2019), no teste de difusão em ágar descrito anteriormente, foram submetidas ao teste de Hodge modificado, segundo Lee *et al.* (2001).

Uma suspensão bacteriana da cepa *Escherichia coli* ATCC (*American Type Culture Collection*) 25922 foi preparada em solução salina até atingir a turvação equivalente à escala 0.5 de Mc Farland. A suspensão foi inoculada em placa contendo ágar *Müller-Hinton* em técnica de semeadura por induto contínuo. Em seguida, um disco de ertapenem, imipenem ou meropenem (10µg – Oxoid®) foi adicionado ao centro de cada placa e, a partir da borda do disco de antibiótico, a cepa teste foi estriada em direção à extremidade da placa (CLSI, 2019).

As placas foram incubadas a 35°C, por 16 a 18 horas. Quando o crescimento da cepa de *E. coli* formou uma zona distorcida no halo de inibição do ertapenem, meropenem ou imipenem, o resultado foi interpretado como positivo. Ou seja, houve uma provável produção de carbapenemase. Quando o halo de inibição do ertapenem permaneceu inalterado, o resultado foi considerado negativo (figura 15) (CLSI, 2015).

Figura 15 – Teste de Hodge Modificado.



1) Amostra teste; 2) *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1706 como controle negativo; 3) *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1705 como controle positivo (CLSI, 2015).

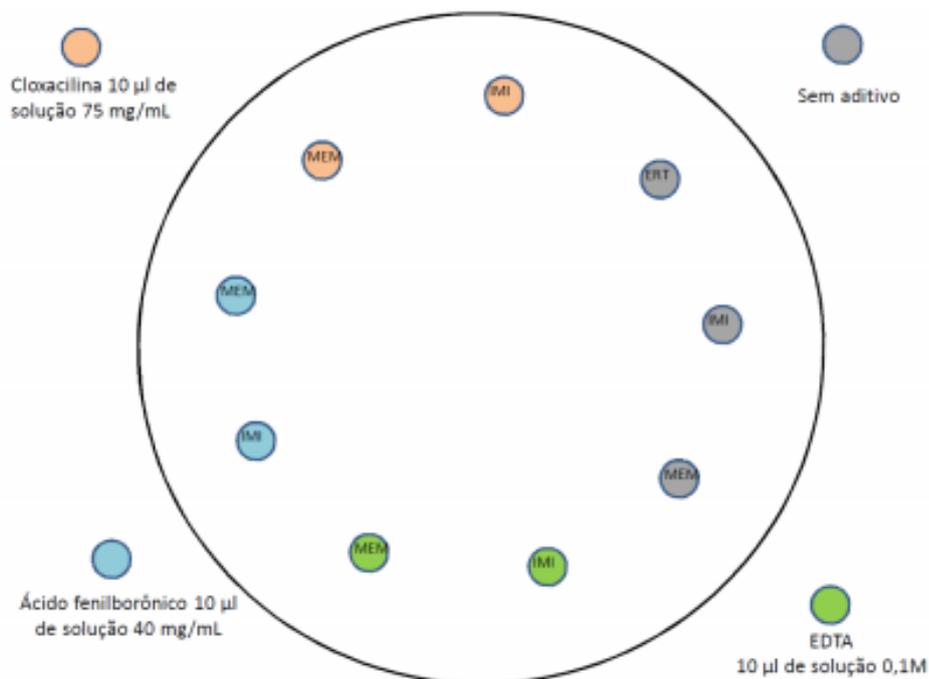
5.6.3 Teste com disco de EDTA, ácido fenilborônico ou cloxacilina

Os discos de carbapenêmicos, meropenem e imipenem, impregnados com ácido fenilborônico (AFB) e sem ele, são utilizados para a detecção fenotípica de carbapenemases de classe A, principalmente do subtipo KPC (PASTERAN *et al.*, 2009; GARBATI; GODHAIR, 2013; VALI *et al.*, 2014).

Um teste positivo é encontrado quando há diferença de ≥ 5 mm entre os discos de imipenem e meropenem puros em relação aos mesmos discos com ácido fenilborônico. Nesse teste o ácido fenilborônico realiza o bloqueio enzimático deste tipo de carbapenemase (figura 16) (ANVISA, 2013).

Já o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) tem a capacidade de quelar os íons de zinco do sítio ativo das metalobetalactamases, como a NDM. Para a detecção sugestiva de AmpC plasmidial, a cloxacilina é utilizada para tal teste a fim de observar ou não a com potenciação quando adicionada aos carbapenêmicos (PASTERAN *et al.*, 2009; GARBATI; GODHAIR, 2013; VALI *et al.*, 2014).

Figura 16- Esquema para aplicação de discos de antimicrobianos para detecção de carbapenemases.

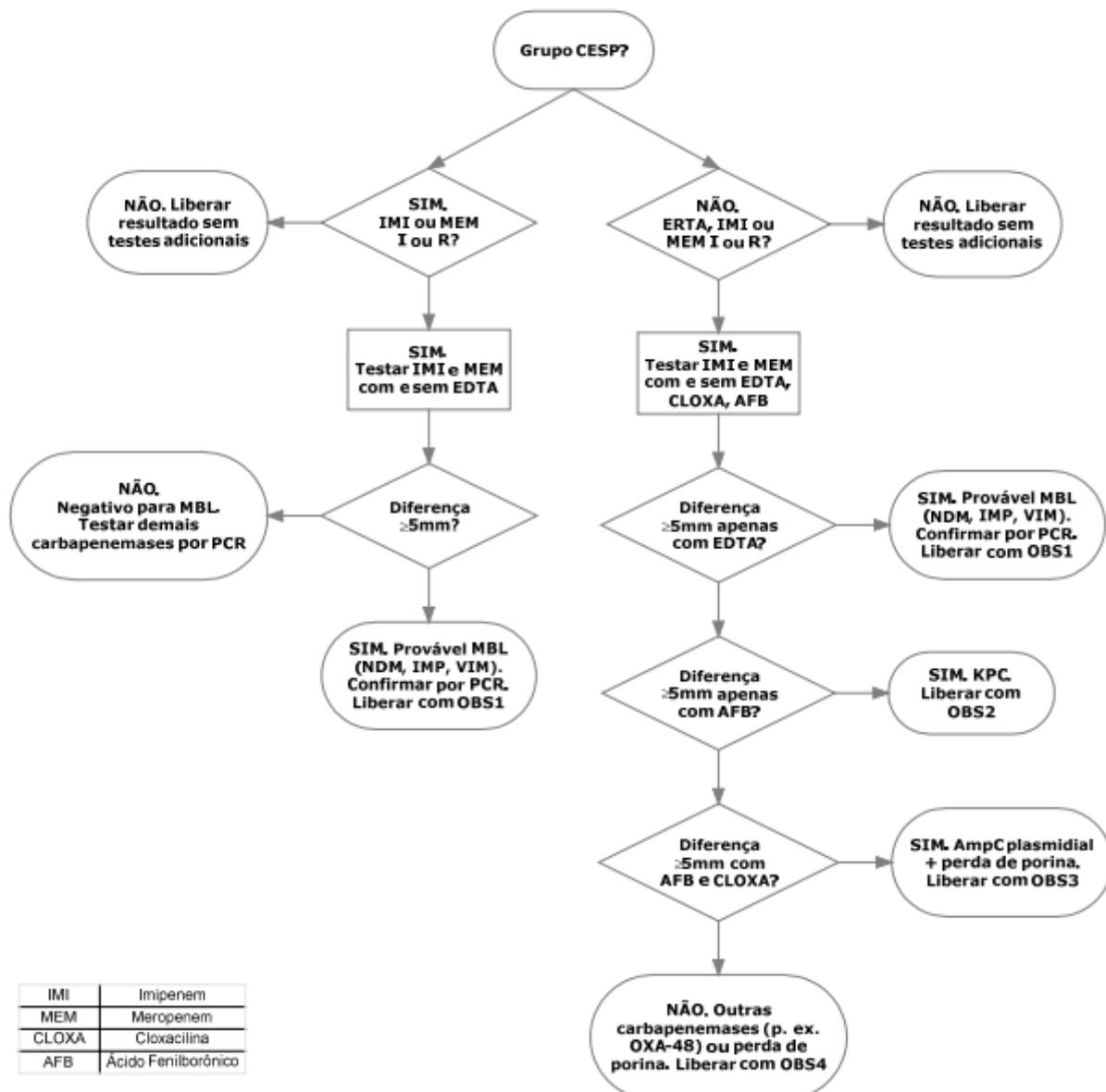


Legenda: ERT – ertapenem; MEM – meropenem; IMI – imipenem. Fonte: ANVISA, 2013.

Para triagem fenotípica dos mecanismos citados acima, seguimos os protocolos indicados pela ANVISA (2013) que orientam quanto ao uso de um fluxograma básico (figura 17), a fim de uniformizar a pesquisa.

Os testes de ESBL e AmpC foram realizados em todas as enterobactérias isoladas do meio cromogênico com o antibiótico cefotaxima, pois a resistência a alguma cefalosporinas de terceira geração é indicativo para tal. Já os testes de Hodge, com AFB, EDTA e CLOXA, foram realizados nas enterobactérias não-sensíveis a algum carbapenêmico por ser um indicativo de possível produtor de carbapenemase (ANVISA, 2013; CLSI, 2019).

Figura 17- Fluxograma para detecção de carbapenemases no laboratório clínico.



5.7 TESTES MOLECULARES.

A extração de DNA foi realizada pelo método de choque térmico. Uma colônia de cada cepa isolada, das enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos, a partir de cultura recente e originada do meio ágar nutriente, foi suspensa em 300µL de água ultrapura estéril. As células foram lisadas por aquecimento a aproximadamente 100°C por 15 minutos e os restos celulares foram removidos por centrifugação a 1.400 rpm por 15 segundos. Um volume de 5 µL do total do sobrenadante foi utilizado em cada reação de PCR. O sobrenadante que não foi utilizado de imediato foi congelado a -20°C (HASMAN *et al.*, 2005; LIMA, 2011; FREITAS, 2015).

Tabela 2 – Iniciadores utilizados nas reações de PCR para identificar a presença de genes de resistência.

Iniciadores	Sequência nucleotídica	Região alvo	Tamanho	Referência
KPC- F	ATGTCACTGTATCGCCGTC	Alelos <i>bla</i> _{KPC}	882 pb	LGMM
KPC- R	TTACTGCCCGTTGACGCC			
IMP- F	GAAGGCGTTTATGTTTCATAC	Alelos <i>bla</i> _{IMP}	587 pb	LGMM
IMP- R	GTAAGTTTCAAGAGTGATGC			
VIM- F	GTTTGGTCGCCATATCGCAAC	Alelos <i>bla</i> _{VIM}	382 pb	LGMM
VIM- R	AATGCGCAGCACCAGGATAG			
BKC- F	ACATAATCTCGCAACGGGCG	Alelos <i>bla</i> _{BKC}	512 pb	Nicoletti <i>et al.</i> , 2015
BKC- R	TCGCCGGTCTTGTTTCATCAC			
OXA-23- F	GATGTGTCATAGTATTCGTCG	GAE 3' de <i>bla</i> _{OXA-23} GAE 5' de <i>bla</i> _{OXA-23}	1064 pb	Wang; Zong; Lu, 2011
OXA-23- R	TCACAACAACATAAAAAGCACTG			
OXA-48- R	GCGTTTTATGTCTAACAGTCC	GAE 3' de <i>bla</i> _{OXA-48} GAE 5' de <i>bla</i> _{OXA-48}	744 pb	LGMM
OXA-48- F	AAGTAGCATCAGTCCATCC			
CTX-M- F	TTAATGATGACTCAGCA	Alelos <i>bla</i> _{CTX-M}	800 pb	LGMM
CTX-M- R	GATACCTCGCTCCATTTAT			

Foram realizadas reações de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) no equipamento termociclador Eppendorf AG® para a detecção das seguintes sequências gênicas: *blaKPC*, *blaIMP*, *blaVIM*, *blaBKC*, *blaOXA23*, *blaOXA48* e *blaCTX-M* (tabela 2). (YGITI *et al.*, 2001; HASMAN *et al.*, 2005; NICOLETTI *et al.*, 2015).

A reação de PCR foi realizada em um volume final de 50 µL. As reações individuais foram compostas de água ultrapura, tampão de reação 1X (Promega®), 3 mM de MgCl₂ (Promega®), 0,2 mM de dNTP (ultrapure dNTP set [dATP, dCTP, dGTP, dTTP] – Amersham®), 200 ng de cada iniciador, 1,5 U da enzima Taq DNA polimerase (Promega®) e 5 µL do DNA que foram obtidos por choque térmico, conforme exposto anteriormente (LIMA, 2011; FREITAS, 2015).

O DNA foi, inicialmente, desnaturado por aquecimento a 94°C por 5 minutos. Em seguida, o material foi submetido a 40 ciclos térmicos: 30 segundos a 94°C para desnaturação, 30 segundos a 50°C para anelamento e 72°C para extensão, com duração variando de acordo com o tamanho do alvo, considerando a relação 1 min/1Kb. A amplificação pela reação de PCR foi visualizada através de corrida do amplicon em gel de agarose (MULVEY *et al.*, 2003; HASMAN *et al.*, 2005; LIMA, 2011).

5.7.1. Eletroforese em Gel de Agarose

Os géis foram preparados dissolvendo a agarose padrão (AGARGEN®) em tampão TAE 1X (BIO-RAD®) de modo a obter uma concentração de 1,5%. Foram aplicados 10 µL do produto da PCR com 2 µL do *Loading buffer* (bromofenol blue + sucrose em água destilada) em cada poço. A eletroforese foi realizada em tampão TAE 1x sob corrente de 70 volts por 120 minutos. O peso molecular utilizado foi o NORGEN® (300pb-10.000pb) (LIMA, 2011; FREITAS, 2015).

Após a corrida, o gel foi corado com brometo de etídio (10 mg/mL) por 20 minutos e descorado em água destilada por mais 20 minutos. O gel foi observado sob luz ultravioleta e registrado utilizando ferramenta de fotodocumentação (Kodak Gel Logic 112) (LIMA, 2011). Os registros foram comparados com o padrão e analisados posteriormente para a associação dos achados moleculares aos fenotípicos.

5.8. ANÁLISES DE DADOS

A análise de dados foi realizada em três etapas: a pré-análise, a exploração do material e o tratamento dos dados, inferência e interpretação. Na pré-análise, os dados foram coletados, registrados e organizados. Na exploração do material e tratamento dos dados, os mesmos foram tabulados em Microsoft Excel[®], classificados e estratificados em formato de tabelas e gráficos. Já na fase de inferência e interpretação, foram apresentadas as variáveis descritivas, tanto qualitativas quanto quantitativas (porcentagem, média e desvio-padrão). Posteriormente, foram realizadas as possíveis correlações para comparar os achados nas estações, comprovando ou não as hipóteses levantadas.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

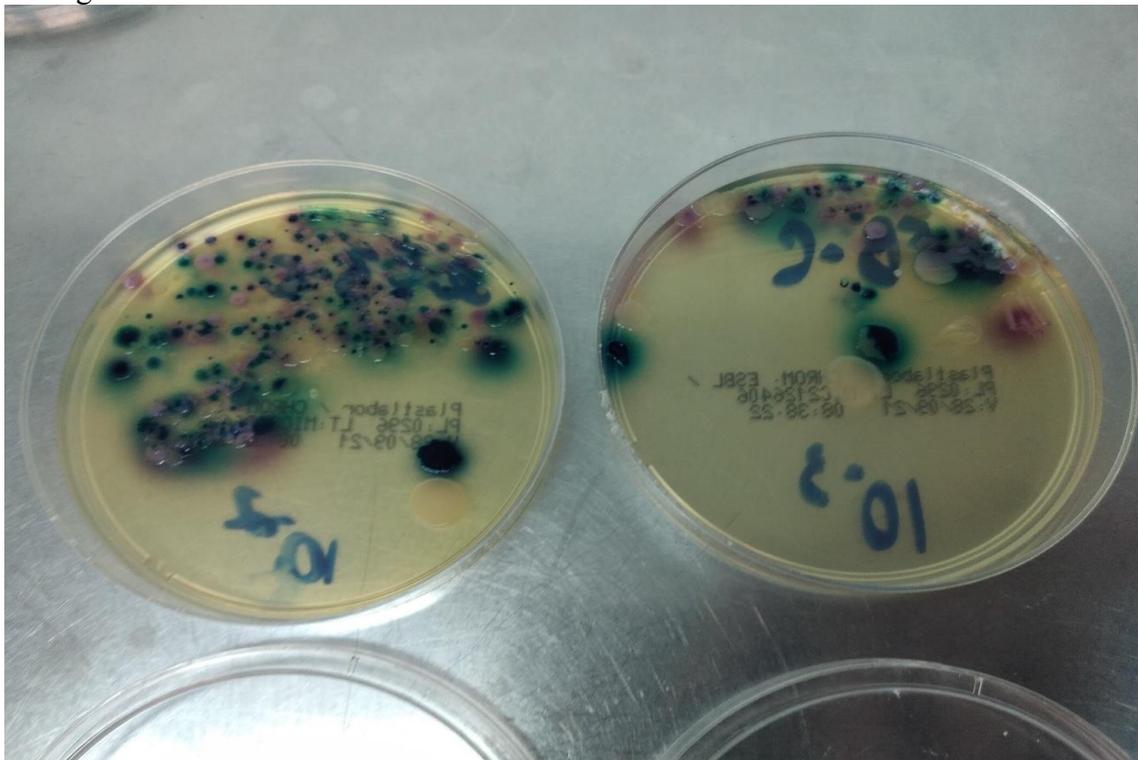
6.1. ANÁLISE QUANTITATIVA DAS BACTÉRIAS ENCONTRADAS

A contagem de colônias foi realizada tanto para bactérias totais, como para as resistentes, que cresceram em meio seletivo. Podemos observar na tabela 3, os dados quantitativos. O crescimento de colônias foi observado em determinadas diluições, dependendo se a amostra era do esgoto bruto ou tratado.

De acordo com a figura 18, temos um exemplo de crescimento de um grande número de colônias (resistentes às cefalosporinas de terceira geração), nas diluições 10^{-2} e 10^{-3} em esgoto bruto. Em contrapartida, nas amostras de esgoto tratado (figura 19), houve crescimento de colônias até a diluição de 10^{-2} somente.

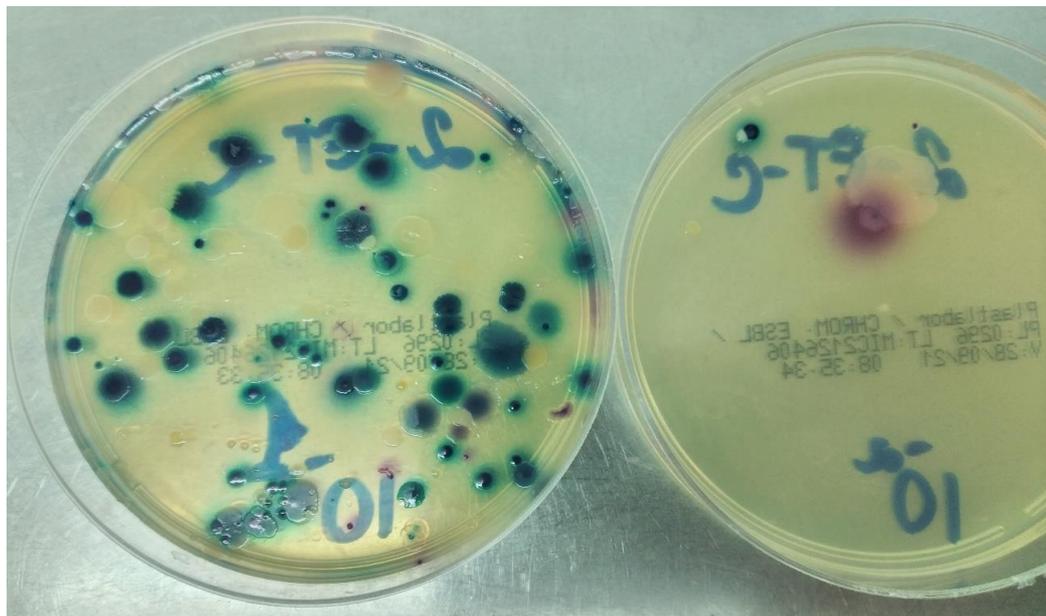
Além da contagem, a utilização dos meios cromogênicos a fim de otimizar o rastreamento, facilitou para isolar uma colônia, alocá-la em um grupo distinto ou até mesmo identificar presuntivamente. Tais resultados serão abordados no seguimento do trabalho, durante a avaliação qualitativa das culturas.

Figura 18 – Placas de meio seletivo ESBL com crescimento de duas diluições (10^{-2} e 10^{-3}) em esgoto bruto.



Fonte: Próprio autor.

Figura 19 – Placas de meio seletivo ESBL com crescimento de duas diluições (10^{-1} e 10^{-2}) em esgoto tratado.



Fonte: Próprio autor.

A grandeza do crescimento bacteriano foi de 10^5 a 10^6 UFC/mL no esgoto bruto, para bactérias heterotróficas totais. Já no esgoto tratado, houve uma variação de 10^2 a 10^5 UFC/mL para o mesmo tipo bacteriano (tabela 3).

Tabela 3 – Quantidade de UFC/mL de bactérias totais cultiváveis e resistentes, obtidas em cada amostra de esgoto.

Coleta	Tipo	Local	Totais (UFC/mL) (log ₁₀)	BGN resistentes* (UFC/mL) (log ₁₀)	% de BGN resistentes*
1	Bruto	Central	600.000 (6×10^5) (5,78)	120.000 ($1,2 \times 10^5$) (5,08)	20 %
1	Tratado	Central	430.000 ($4,3 \times 10^5$) (5,63)	20.000 (2×10^4) (4,3)	4,7%
1	Bruto	INI	2.000.000 (2×10^6) (6,30)	400.000 (4×10^5) (5,60)	20%
1	Tratado	INI	500 (5×10^2) (2,70)	AUSÊNCIA**	0 %
2	Bruto	Central	500.000 (5×10^5) (5,70)	180.000 (5×10^5) (5,25)	36%
2	Tratado	Central	380.000 (5×10^5) (5,58)	4.000 (4×10^3) (3,6)	1,1%
2	Bruto	INI	2.800.000 ($2,8 \times 10^6$) (6,45)	600.000 (6×10^5) (5,78)	21,4 %
2	Tratado	INI	800 (8×10^2) (2,90)	30 (3×10) (2,48)	3,8%
3	Bruto	Central	1.000.000 (1×10^6) (6,00)	80.000 (8×10^4) (4,90)	8%
3	Tratado	Central	650.000 ($6,5 \times 10^5$) (5,81)	300 (3×10^2) (2,48)	0,05%
3	Bruto	INI	4.000.000 (4×10^6) (6,60)	800.000 (8×10^5) (5,90)	20 %
3	Tratado	INI	1.200 ($1,2 \times 10^3$) (3,08)	50 (5×10) (1,70)	4,2%
4	Bruto	Central	850.000 ($8,5 \times 10^5$) (5,93)	60.000 (6×10^4) (4,78)	7,1%
4	Tratado	Central	500.000 (5×10^5) (5,70)	200 (2×10^2) (2,3)	0,04%
4	Bruto	INI	2.300.000 ($2,3 \times 10^6$) (6,36)	650.000 ($6,5 \times 10^5$) (5,81)	28,3%
4	Tratado	INI	300 (3×10^2) (2,48)	AUSÊNCIA**	0%

*Com crescimento em meio ChromESBL **Não houve crescimento na menor diluição. / Os números 1, 2, 3 e 4 referem-se aos dias das coletas realizadas. / BGN – Bacilos Gram-Negativos

Para fins comparativos, os valores de UFC/mL foram convertidos para a base logarítmica de 10, conforme resultados apresentados em outros trabalhos (MUNIR; WONG; XAGORARAKI, 2011; ZHANG *et al.*, 2015; MACHADO *et al.*, 2020).

Os achados para o esgoto bruto variaram de 5,7 a 6,6 \log_{10} UFC.mL⁻¹, sendo na ETE INI 6,3 a 6,6 \log_{10} UFC.mL⁻¹ e na ETE Central 5,7 a 6,0 \log_{10} UFC.mL⁻¹. Tais resultados corroboram com a pesquisa de Zhang e colaboradores (2015), que tiveram no esgoto bruto valores de 5,7 a 6,5 \log_{10} UFC.mL⁻¹. Munir, Wong e Xagorarakis (2011), apresentaram valores discretamente mais elevados para o mesmo tipo de esgoto, que variaram de 6,0 a 7,0 \log_{10} UFC.mL⁻¹. Em contrapartida, Machado e colaboradores (2020), tiveram valores mais baixos, de 4,5 a 5,6 \log_{10} UFC.mL⁻¹.

No esgoto tratado, Machado e colaboradores (2020) encontraram valores de 3,0 a 5,0 \log_{10} UFC.mL⁻¹. Tal achado é de menor grandeza e de maior intervalo de variação em relação a presente pesquisa na ETE Central, com achados de 5,58 a 5,81 \log_{10} UFC.mL⁻¹. Na ETE INI, os achados ficaram na faixa de 2,48 a 3,08 \log_{10} UFC.mL⁻¹, exibindo valor máximo próximo a faixa mínima do trabalho citado e também na pesquisa de Zhang e colaboradores (2015), que encontraram 3.01 a 5.26 \log_{10} UFC.mL⁻¹.

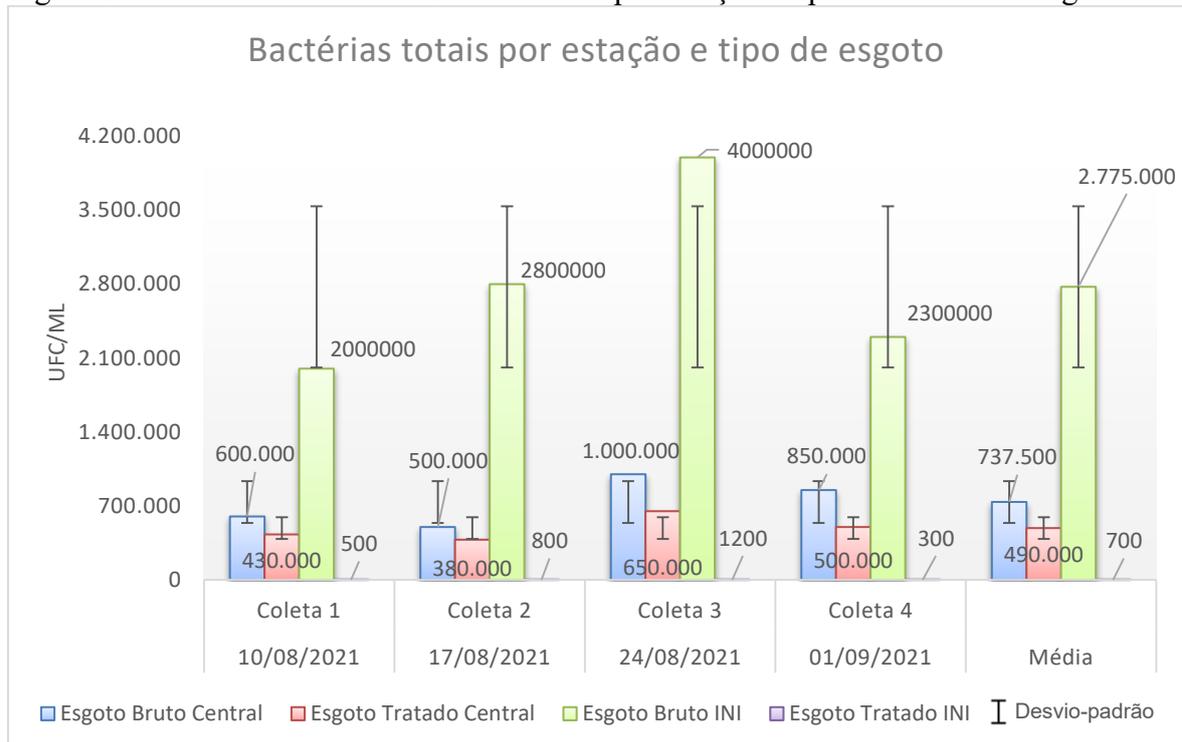
Com relação à pesquisa de Bacilos Gram-Negativos (BGN) resistentes (cultivados em meio seletivo com cefalosporinas de terceira geração), foi observado no esgoto bruto uma contagem de 10⁴ a 10⁵ UFC/mL. No esgoto tratado, esta contagem variou da ausência na menor diluição até 10⁴. Ou seja, em duas amostras as placas não apresentaram crescimento, enquanto em uma amostra o crescimento apresentado foi da grandeza de 10⁴.

Acerca da concentração de BGN resistente em cada amostra em relação ao total de bactérias cultiváveis, houve uma variação em relação ao tipo de esgoto. No esgoto bruto, esta porcentagem foi de 7,1 a 36%, sendo que a média da Estação Central foi de 17% e na Estação INI foi de 22%, apontando uma presença em maior quantidade de BGN resistentes no esgoto bruto da Estação INI.

Quando comparado ao esgoto tratado, a Estação INI apresenta uma média de 2% desses micro-organismos, frente a 1,5% da Estação Central. Entretanto, em duas das quatro amostras da Estação INI, os meios não apresentaram crescimento em sua menor diluição.

Embora as concentrações de BGN resistentes não apresentem uma diferença significativa entre as ETE, o número total destas bactérias no esgoto bruto da ETE INI é muitas vezes maior que o número encontrado no esgoto bruto da ETE Central. Como por exemplo na quarta coleta, a contagem da ETE INI foi de 650.000 UFC/mL, frente a apenas 60.000 da ETE Central.

Figura 20 – Gráfico de crescimento bacteriano por estação e tipo de amostra de esgoto.



Podemos observar na figura 20, o gráfico de crescimento bacteriano total, onde a ETE INI apresenta uma quantidade UFC/mL de colônias superior ao encontrado na ETE Central, nas quatro coletas realizadas para o esgoto bruto. Na segunda coleta por exemplo, a quantidade de UFC/mL foi de quase 6 vezes maior do que a encontrada na ETE Central.

Tal fato pode ser atribuído a dois fatores: primeiramente, pela ETE INI receber exclusivamente esgoto hospitalar e posteriormente pelo fato dos laboratórios de pesquisa atendidos pela ETE Central, não estarem funcionando com 100% de sua capacidade, pois na época da coleta do material (agosto e setembro de 2021), o cenário pandêmico não permitia a maioria das atividades presenciais.

O esgoto hospitalar direcionado a ETE INI, por conta da concentração de pacientes e pelo tipo de assistência prestada, contém um número maior de bactérias. Inclusive, a exposição destas bactérias aos antibióticos presentes neste esgoto, submetem a estes micro-organismos ao efeito de pressão seletiva, aumentando também o número de bactérias resistentes, além da troca de plasmídeos e outras estratégias de aquisição de genes de resistência (CAIRNS *et al.*, 2018; SILVA, T., 2021).

Em contrapartida, o Hospital montado para o enfrentamento do Covid-19, estava funcionando com capacidade máxima e liberando para a ETE INI uma grande quantidade de água residual (2000 L/hora), contendo uma quantidade elevada de micro-organismos devido a

sua procedência (CORREIA, 2021).

Após o tratamento da água residual, a proporção se inverteu e na ETE Central foi encontrado um número muito maior de bactérias em comparação a ETE INI. Na quarta coleta por exemplo, foram contabilizadas 500.000 UFC/mL na ETE Central, frente a 300 UFC/mL na ETE INI, que contabiliza um valor 1600 vezes menor da segunda em relação à primeira. Em todas as coletas esta proporção foi superior a 450 vezes.

Baseado nesses resultados, presume-se que quantitativamente, o tratamento realizado pela ETE INI foi mais eficaz na redução de bactérias totais quando comparada à ETE Central. Conforme citado anteriormente, os tipos de processo são diferentes e provavelmente houve mais sucesso no tratamento da ETE INI, devido à associação do tratamento biológico com à desinfecção com cloro (CORREIA, 2021).

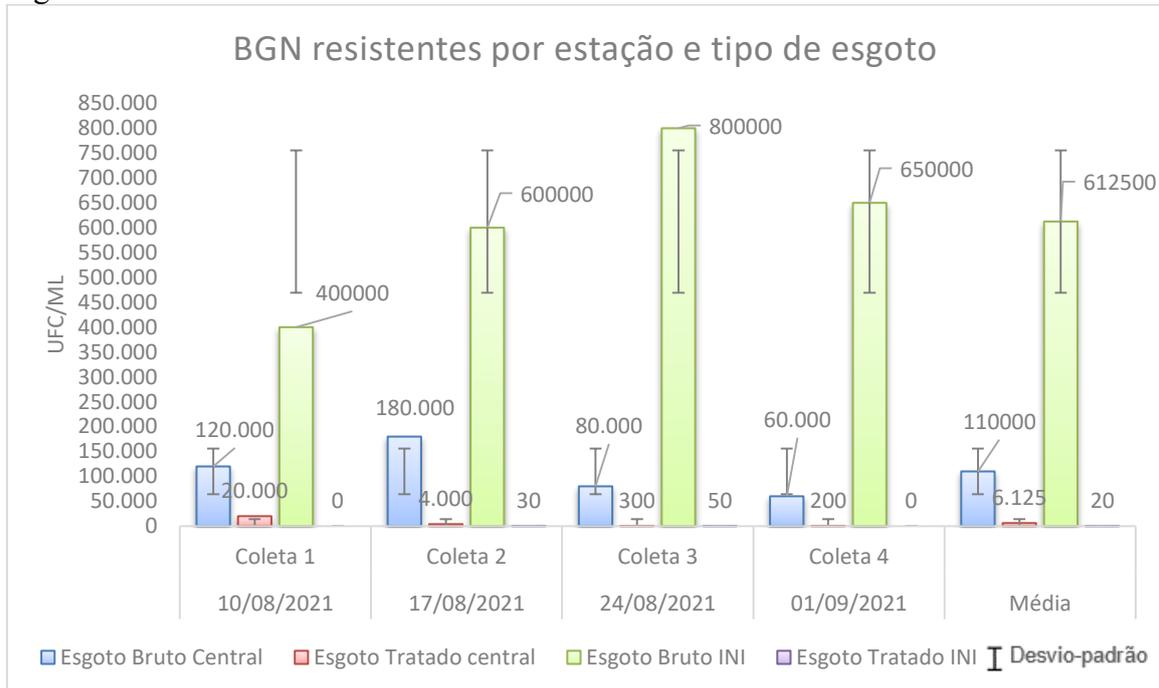
Outra hipótese a ser levantada é a da arquitetura da ETE Central ter contribuído para que o número total de bactérias após o tratamento permanecesse com baixa redução. É possível que, por apresentar um sistema aberto de tratamento e pelo esgoto tratado ficar exposto ao ambiente, o mesmo pode ter sido posteriormente contaminado por bactérias diversas.

Quando analisamos a detecção de BGN resistentes às cefalosporinas de terceira geração em esgoto bruto, foi possível visualizar através do gráfico construído a partir da estação e do tipo de esgoto (Figura 21), que também entre os resistentes, a ETE INI apresentou um número muito elevado de UFC/mL em relação à ETE Central. Esta proporção variou de 3 a 10 vezes mais UFC/mL da primeira comparada à segunda ETE. A análise mostrou ainda na terceira coleta, a detecção de 80.000 UFC/mL na ETE Central e 800.000 UFC/mL na estação INI, indicando uma proporção de 10 vezes mais BGN resistentes encontrados.

Presume-se que este achado se deve à origem hospitalar do esgoto da ETE INI. Tais bactérias são responsáveis por inúmeras infecções em pacientes atendidos por esta modalidade de serviço de saúde, assim como evidenciado em diversos estudos em ambiente hospitalar (PICÃO *et al.*, 2013; LOPES *et al.*, 2016; ANVISA, 2017).

No esgoto tratado, assim como no bruto esta proporção também se inverte, tendo uma redução drástica de BGN resistentes na ETE INI. O número de UFC/mL destas bactérias foi até 20.000 vezes menor na primeira coleta, onde a ETE Central apresentou 20.000 UFC/mL em comparação a ausência de crescimento na menor diluição realizada. Esses resultados corroboram os estudos realizados em esgoto por Machado e colaboradores (2020), onde também foi observada uma grande eficácia na redução no número de bactérias resistentes após o tratamento.

Figura 21 – Gráfico de crescimento de BGN resistentes, por estação e tipo de amostra de esgoto.



É importante ressaltar que o número zero não significa que a amostra estava livre de BGN resistentes, pois se ao invés de diluição, fosse realizado um procedimento de concentração, talvez a cultura apresentasse algum crescimento. Em contrapartida, também foi realizado no processo, o enriquecimento em meio líquido e posterior semeadura em meio seletivo em razão da cultura qualitativa. Mesmo assim, não foi observado crescimento deste tipo bacteriano nem na amostra da primeira, nem da última coleta.

Tal resultado, assim como no crescimento das bactérias totais, permite a inferência de que a eficácia da ETE INI para eliminação de BGN resistentes, foi ainda melhor do que a da estação Central na eliminação do mesmo tipo de bactérias, provavelmente pela etapa de tratamento com a desinfecção pelo cloro.

A verificação desta eficácia pode ser observada nas tabelas 4 e 5, onde são apresentados os dados de redução das bactérias totais e resistentes, tanto da ETE Central como o da ETE INI respectivamente.

Tabela 4 – Redução de UFC/mL de bactérias totais cultiváveis e resistentes, em amostras da ETE Central.

Coleta	Tipo	Totais (UFC/mL) (log ₁₀)	% de redução de Totais	BGN resistentes (UFC/mL) (log ₁₀)	% de redução de BGN resistentes
1	Bruto	600.000 (5,78)	-	120.000 (5,08)	-
1	Tratado	430.000 (5,63)	28,3%	20.000 (4,3)	83,3%
2	Bruto	500.000 (5,70)	-	180.000 (5,25)	-
2	Tratado	380.000 (5,58)	24,0%	4.000 (3,6)	97,8%
3	Bruto	1.000.000 (6,00)	-	80.000 (4,90)	-
3	Tratado	650.000 (5,81)	35,0%	300 (2,48)	99,6%
4	Bruto	850.000 (5,93)	-	60.000 (4,78)	-
4	Tratado	500.000 (5,7)	41,2%	200 (2,3)	99,7%
Média (dp)	Bruto	737.500 (228.673) (5,87)	-	110.000 (52.915) (5,04)	-
Média (dp)	Tratado	490.000 (117.473) (5,69)	33,6%	6.125 (9.417) (3,79)	94,4%

Os números 1, 2, 3 e 4 referem-se aos dias das coletas realizadas. / BGN – Bacilos Gram-Negativos/ dp – Desvio-padrão

Tabela 5 – Redução de UFC/mL de bactérias totais cultiváveis e resistentes, em amostras da ETE INL.

Coleta	Tipo	Totais (UFC/mL) (log ₁₀)	% de redução de Totais	BGN resistentes (UFC/mL) (log ₁₀)	% de redução de BGN resistentes
1	Bruto	2.000.000 (6,30)	-	400.000 (5,60)	-
1	Tratado	500 (2,70)	99,97%	AUSÊNCIA*	100%
2	Bruto	2.800.000 (6,45)	-	600.000 (5,78)	-
2	Tratado	800 (2,90)	99,97%	30 (1,48)	99,99%
3	Bruto	4.000.000 (6,60)	-	800.000 (5,90)	-
3	Tratado	1.200 (3,07)	99,97%	50 (1,70)	99,99%
4	Bruto	2.300.000 (6,36)	-	650.000 (5,81)	-
4	Tratado	300 (2,48)	99,98%	AUSÊNCIA*	100%
Média (dp)	Bruto	2.775.000 (880.814) (6,44)	-	612.500 (165.201) (5,79)	-
Média (dp)	Tratado	700 (392) (2,84)	99,97%	20 (24) (1,30)	99,99%

*Não houve crescimento na menor diluição. / Os números 1, 2, 3 e 4 referem-se aos dias das coletas realizadas. / BGN – Bacilos Gram-Negativos/ dp – Desvio-padrão

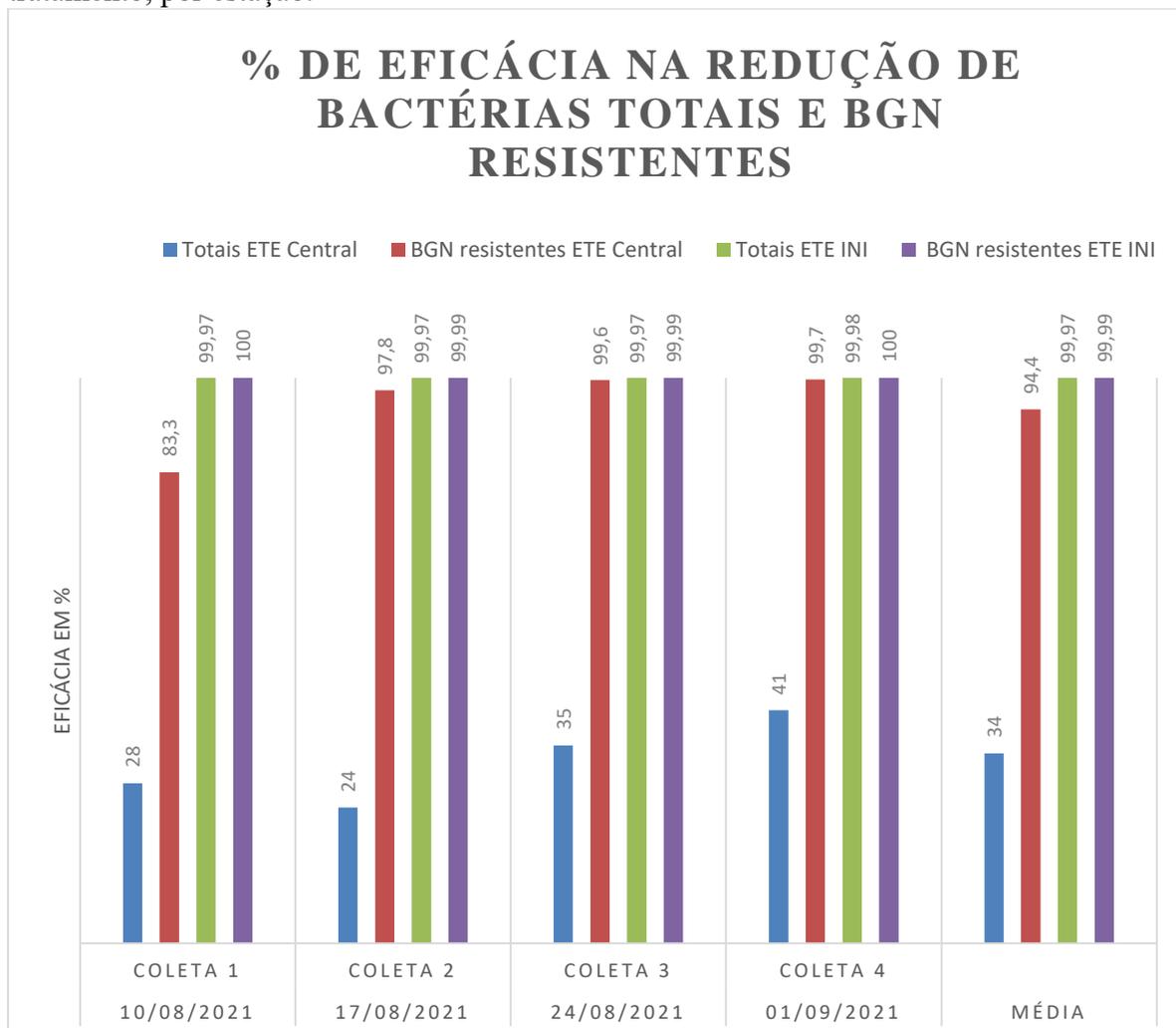
Na estação Central houve uma discrepância entre a porcentagem de redução de bactérias totais e BGN resistentes, onde observa-se uma média de 33,6% para o primeiro grupo e uma média de 94,4% para o segundo. Sendo que nas três últimas coletas, a redução de BGN resistentes foi maior que 97%. Segundo os estudos de Oliveira, Azevedo e Cavalcanti (2021), valores acima de 85% são considerados como ideais em relação a eficácia do tratamento microbiológico. Entretanto, valores maiores que 55% já são considerados satisfatórios. Baseado nesses parâmetros, mesmo sabendo que originalmente as ETE são destinadas a reduzir matéria

orgânica, a ETE Central obteve uma eficácia abaixo do esperado na redução de bactérias totais, mas muito satisfatória se considerarmos somente o grupo das resistentes.

Já na ETE INI, a redução foi homogênea para os dois tipos analisados (bruto e tratado), tanto para bactérias totais quanto para BGN resistentes. A porcentagem de redução para bactérias totais apresentou uma média de 99,97. Enquanto que para a redução de BGN resistentes foi de 99,99%, sendo duas coletas com 100% de redução.

Para melhor entendimento, podemos observar na figura 22, o gráfico de eficácia na redução de crescimento de bactérias totais e dos BGN resistentes, nas duas ETE pesquisadas. A redução das bactérias totais na ETE Central é bem discrepante dos outros dados apresentados e como falado anteriormente, pode ter sido causada por uma contaminação ambiental ou mesmo pelo tipo de tratamento realizado nesta ETE.

Figura 22 – Gráfico de eficácia na redução de bactérias totais e BGN resistentes após tratamento, por estação.



6.2. ANÁLISE QUALITATIVA DAS BACTÉRIAS ENCONTRADAS

As quatro coletas realizadas, geraram 16 amostras, de onde foram isolados, após semeadura nos meios escolhidos para detecção de micro-organismos resistentes, 62 espécimes bacterianos Gram-negativos, selecionados inicialmente por diferenças morfológicas das colônias crescidas em meio seletivo para BGN, o CHROMagar ESBL. De maneira concomitante, foi realizada triagem para bactérias Gram-positivas resistentes à oxacilina e à vancomicina respectivamente, também nos meios cromogênicos. Ou seja, todas as bactérias isoladas apresentam algum tipo de resistência devido a característica seletiva dos antibióticos presentes nos meios escolhidos para a pesquisa.

Na tabela 6 podemos observar a frequência dos micro-organismos encontrados de acordo com o grupo bacteriano, o local e o tipo de esgoto, assim como o resultado de rastreamento de MRSA e VRE.

Tabela 6 – Número de espécies encontradas em cada grupo bacteriano por amostra.

Coleta	Tipo	Local	Enterobactérias	<i>Aeromonas</i> sp.	Não-		
					fermentadores	VRE	MRSA
1	Bruto	Central	1	4	2	Ausente	Ausente
1	Tratado	Central	0	1	0	Ausente	Ausente
1	Bruto	INI	2	2	0	Ausente	Ausente
1	Tratado	INI	0	0	0	Ausente	Ausente
2	Bruto	Central	0	5	2	Ausente	Ausente
2	Tratado	Central	3	1	1	Ausente	Ausente
2	Bruto	INI	2	4	2	Ausente	Ausente
2	Tratado	INI	1	0	0	Ausente	Ausente
3	Bruto	Central	3	1	1	Ausente	Ausente
3	Tratado	Central	1	1	0	Ausente	Ausente
3	Bruto	INI	1	4	1	Ausente	Ausente
3	Tratado	INI	1	1	1	Ausente	Ausente
4	Bruto	Central	1	2	2	Ausente	Ausente
4	Tratado	Central	1	1	2	Ausente	Ausente
4	Bruto	INI	2	1	1	Ausente	Ausente
4	Tratado	INI	0	0	0	Ausente	Ausente
-	Total	-	19	28	15		
-	(%)	-	(30,6%)	(45,2%)	(24,2%)		

Todas as amostras no meio seletivo para MRA e VRE foram consideradas negativas, por ausência de crescimento na diluição de semeadura. Esses resultados se contrapõem aos encontrados por Ferreira (2015) e Terra e colaboradores (2015). Ferreira que trabalhou com esgoto hospitalar e residencial, observou resistência a vários antimicrobianos nas amostras de

S. aureus que isolou, inclusive evidenciando isolados com resistência à vancomicina. Já Terra e seus colegas, pesquisaram o lodo de uma ETE, e conseguiram recuperar percentuais significativos de *Enterococcus* multirresistentes, inclusive foram capazes de detectar VRE.

Essas diferenças se justificam não só por serem ETE com perfis diferentes, como as metodologias aplicadas para coleta e isolamento também terem sido distintas. Considerando a ausência desses micro-organismos nesse estudo, admite-se a possibilidade de que tal resultado também possa ser derivado da competição com os Gram-negativos, que nesse caso foram predominantes.

Em relação a composição de Gram-negativos no esgoto, em geral, as bactérias do gênero *Aeromonas*, representaram 45,2% de todos os BGN crescidos em meio cromogênico com cefotaxima. As enterobactérias (bactérias da ordem *Enterobacterales*) representaram 30,6% da população microbiana detectada e os BGN-NF 24,2% da composição dos BGN.

Zagui (2019), em sua pesquisa com efluente hospitalar e urbano, encontrou 75,6% de enterobactérias, 24,4% de BGN-NF e não encontrou bactérias do gênero *Aeromonas*. Estes resultados, em relação aos BGN-NF, coincidem com os da presente pesquisa, inclusive com porcentagem similar. Em contrapartida, foram discrepantes pela ausência de *Aeromonas* sp. frente a 45,2% deste trabalho.

Essa alteração poderia ser justificada pela metodologia do trabalho de Zagui (2019), que se baseou apenas na semeadura direta do material em meios diversos, sem enriquecimento ou diluição da amostra, mas em contrapartida, Rocha (2004), por meio também de semeadura direta, em estudo da Universidade de São Paulo, sobre gênero *Aeromonas* em esgoto, detectou a bactéria em até 72% das amostras, corroborando com os nossos achados, onde foi detectado o mesmo gênero em aproximadamente 81% das amostras coletadas. Portanto no caso de Zagui (2019), acreditamos que a forma de coleta ou o perfil da amostra seja diferenciado, ou mesmo sua análise qualitativa possa ter apresentado alguma falha no momento da identificação dos gêneros envolvidos.

O gênero *Aeromonas*, apesar de nem sempre ser detectado em alta porcentagem é bastante comum nesse tipo de amostra, Machado e colaboradores (2020), em estudo mais recente em Belo Horizonte - Minas Gerais, obtiveram em amostras de esgoto doméstico, 65,5% de enterobactérias, 27% de BGN-NF e apenas 7% de *Aeromonas* sp. Neste estudo foram realizadas diluições e a partir delas, procederam as semeaduras em meio sólido.

Em um estudo italiano, em esgoto de matadouros da Sicília, foram encontrados 55% de isolados de enterobactérias, 27,5% de BGN-NF e 17,5% de *Aeromonas* sp. (FACCIOLÀ *et al.*, 2021). O isolamento foi realizado a partir de concentração em filtro com posterior semeadura e

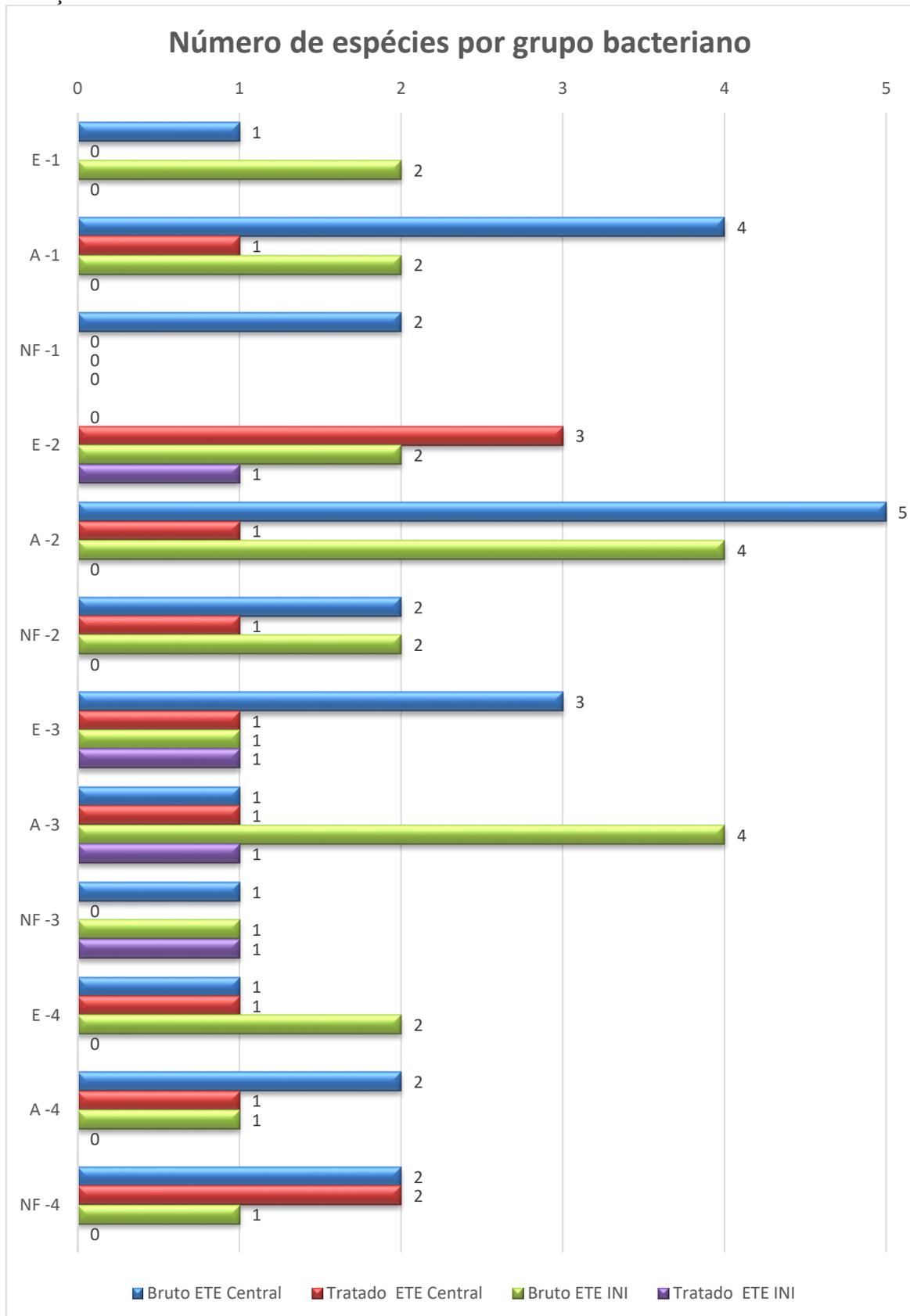
enriquecimento paralelamente ao primeiro procedimento. As diferenças entre as porcentagens podem ser explicadas pelo perfil de cada local, que apresenta sua própria prevalência de microorganismos ou até mesmo pelas diferenças metodológicas.

Na figura 23 é apresentado um Gráfico de número de espécies bacterianas por grupo, coleta, tipo de esgoto e estação. Nele, podemos visualizar a presença das enterobactérias, *Aeromonas* sp. e BGN-NF em todas as amostras da ETE Central, no esgoto bruto. Com exceção para a amostra da segunda coleta, que não apresentou crescimento para enterobactérias. O mesmo se observa para a ETE INI, no esgoto bruto, com crescimento dos três grupos pesquisados, exceto pela amostra da primeira coleta em relação aos BGN-NF.

A quantidade de isolados de *Aeromonas* sp. foi maior que os outros grupos, chegando a cinco isolados na amostra da segunda coleta, no esgoto bruto ETE Central, seguido por quatro isolados na amostra da primeira coleta, no esgoto bruto da mesma estação e nas amostras da segunda e terceira coleta, no esgoto bruto da ETE INI. Com menor quantidade de isolados, as enterobactérias tiveram no máximo três representantes e os BGN-NF, no máximo, dois isolados diferentes na mesma amostra.

Para cada isolado foi atribuído um código verificador, onde é possível identificar algumas características do mesmo, como a coleta, tipo de esgoto, local e número do isolado. Por exemplo, no identificador “1EBC1”, o número “1” está designando que é uma amostra da primeira coleta, as letras “EB” indicam que a amostra é proveniente de esgoto bruto, a letra “C” apresenta o local, que no caso foi a ETE Central e por fim, o segundo número “1” identifica o número do isolado, dentro desta amostra. Ou seja, o identificador “1EBC1” significa que a bactéria encontrada é o primeiro isolado, do esgoto bruto, da ETE Central, na primeira coleta. Estes isolados estão descritos na tabela 7, com todas as informações de coleta e com o nome de gênero e espécie.

Figura 23 – Gráfico de número de espécies bacterianas por grupo, coleta, tipo de esgoto e estação.



Legenda: E (Enterobactérias) / A (*Aeromonas* sp.) / NF (BGN- NF) / Os números seguintes às letras são referentes às coletas. Ex: A -4 (*Aeromonas* sp. da quarta coleta)

Tabela 7 – Espécies de bacilos Gram-negativos encontrados por amostra com crescimento em meio seletivo.

Coleta	Tipo de Esgoto	Localização	Isolado	Identificador	Espécie
1	Bruto	Central	1	1EBC1	<i>Escherichia coli</i>
1	Bruto	Central	2	1EBC2	<i>Aeromonas hydrophila</i>
1	Bruto	Central	3	1EBC3	<i>Acinetobacter baumannii</i>
1	Bruto	Central	4	1EBC4	<i>Aeromonas hydrophila</i>
1	Bruto	Central	5	1EBC5	<i>Pseudomonas putida</i>
1	Bruto	Central	6	1EBC6	<i>Aeromonas caviae</i>
1	Bruto	Central	7	1EBC7	<i>Aeromonas caviae</i>
1	Bruto	INI	1	1EBINI1	<i>Aeromonas caviae</i>
1	Bruto	INI	2	1EBINI2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
1	Bruto	INI	3	1EBINI3	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
1	Bruto	INI	4	1EBINI4	<i>Aeromonas hydrophila</i>
1	Tratado	Central	1	1ETC1	<i>Aeromonas hydrophila</i>
2	Bruto	Central	1	2EBC1	<i>Aeromonas sobria</i>
2	Bruto	Central	2	2EBC2	<i>Pseudomonas putida</i>
2	Bruto	Central	3	2EBC3	<i>Pseudomonas putida</i>
2	Bruto	Central	4	2EBC4	<i>Aeromonas hydrophila</i>
2	Bruto	Central	5	2EBC5	<i>Aeromonas hydrophila</i>
2	Bruto	Central	6	2EBC6	<i>Aeromonas caviae</i>
2	Bruto	Central	7	2EBC7	<i>Aeromonas sobria</i>
2	Bruto	INI	1	2EBINI1	<i>Aeromonas caviae</i>
2	Bruto	INI	2	2EBINI2	<i>Acinetobacter baumannii</i>
2	Bruto	INI	3	2EBINI3	<i>Citrobacter farmeri</i>
2	Bruto	INI	4	2EBINI4	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
2	Bruto	INI	5	2EBINI5	<i>Aeromonas sobria</i>
2	Bruto	INI	6	2EBINI6	<i>Delftia acidovorans</i>
2	Bruto	INI	7	2EBINI7	<i>Aeromonas caviae</i>
2	Bruto	INI	8	2EBINI8	<i>Aeromonas hydrophila</i>
2	Tratado	Central	1	2ETC1	<i>Escherichia coli</i>
2	Tratado	Central	2	2ETC2	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
2	Tratado	Central	3	2ETC3	<i>Aeromonas hydrophila</i>
2	Tratado	Central	4	2ETC4	<i>Kluyvera cryocrescens</i>
2	Tratado	Central	5	2ETC5	<i>Kluyvera cryocrescens</i>
2	Tratado	INI	1	2ETINI1	<i>Kluyvera cryocrescens</i>
3	Bruto	Central	1	3EBC1	<i>Aeromonas hydrophila</i>
3	Bruto	Central	2	3EBC2	<i>Enterobacter asburiae</i>
3	Bruto	Central	3	3EBC3	<i>Citrobacter freundii</i>
3	Bruto	Central	4	3EBC4	<i>Escherichia coli</i>
3	Bruto	Central	5	3EBC5	<i>Acinetobacter lwoffii</i>
3	Bruto	INI	1	3EBINI1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
3	Bruto	INI	2	3EBINI2	<i>Acinetobacter lwoffii</i>
3	Bruto	INI	3	3EBINI3	<i>Aeromonas hydrophila</i>
3	Bruto	INI	4	3EBINI4	<i>Aeromonas hydrophila</i>
3	Bruto	INI	5	3EBINI5	<i>Aeromonas caviae</i>

Continuação da tabela 7 - Espécies de bacilos Gram-negativos encontrados por amostra com crescimento em meio seletivo.

Coleta	Tipo de Esgoto	Localização	Isolado	Identificador	Espécie
3	Bruto	INI	6	3EBINI6	<i>Aeromonas hydrophila</i>
3	Tratado	Central	1	3ETC1	<i>Aeromonas hydrophila</i>
3	Tratado	Central	2	3ETC2	<i>Citrobacter freundii</i>
3	Tratado	INI	1	3ETINI1	<i>Citrobacter freundii</i>
3	Tratado	INI	2	3ETINI2	<i>Aeromonas hydrophila</i>
3	Tratado	INI	3	3ETINI3	<i>Pseudomonas putida</i>
4	Bruto	Central	1	4EBC1	<i>Kluyvera intermedia</i>
4	Bruto	Central	2	4EBC2	<i>Aeromonas hydrophila</i>
4	Bruto	Central	3	4EBC3	<i>Aeromonas caviae</i>
4	Bruto	Central	4	4EBC4	<i>Acinetobacter baumannii</i>
4	Bruto	Central	5	4EBC5	<i>Acinetobacter lwoffii</i>
4	Tratado	Central	1	4ETC1	<i>Aeromonas hydrophila</i>
4	Tratado	Central	2	4ETC2	<i>Acinetobacter baumannii</i>
4	Tratado	Central	3	4ETC3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
4	Tratado	Central	4	4ETC4	<i>Kluyvera intermedia</i>
4	Bruto	INI	1	4EBINI1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
4	Bruto	INI	2	4EBINI2	<i>Citrobacter amalonaticus</i>
4	Bruto	INI	3	4EBINI3	<i>Aeromonas caviae</i>
4	Bruto	INI	4	4EBINI4	<i>Acinetobacter lwoffii</i>

No grupo das enterobactérias, entre os 19 isolados, foram identificadas 8 espécies. 26% de *Klebsiella pneumoniae* (5), 16% de *Escherichia coli* (3), 16% de *Citrobacter freundii* (3), 16% de *Kluyvera cryocrescens* (3), 11% de *Kluyvera intermedia* (2), 5% *Enterobacter asburiae* (1), 5% *Citrobacter farmeri* (1) e 5% *Citrobacter amalonaticus* (1) do total deste grupo pesquisado.

A *Klebsiella pneumoniae* foi isolada em todas as amostras de esgoto bruto da ETE INI, entretanto não foi encontrada na ETE Central e também em nenhuma amostra de esgoto tratado de ambas as ETE. Este achado corrobora com a frequência de *K. pneumoniae* em instituições que prestam assistência em saúde, assim como nos seus resíduos. Como a ETE INI recebe esgoto hospitalar, já era esperado a ocorrência desta espécie no esgoto bruto (PICÃO *et al.*, 2013; NICOLETTI *et al.*, 2015; ZAGUI, 2019; RIBEIRO *et al.*, 2020).

A *Escherichia coli* também está entre as bactérias de maior frequência em esgoto, com a diferença de ser facilmente encontrada também em esgoto doméstico. A importância desta espécie, como citada anteriormente, faz com que seja pesquisada em vários reservatórios, assim como alimentos e água para consumo humano (LOPES *et al.*, 2016; MENDONÇA *et al.*, 2017; ZHANG *et al.*, 2020; FACCIOLÀ *et al.*, 2021). No presente trabalho, um isolado de *E. coli* foi

encontrado em esgoto tratado (a partir do meio CHROMagar ESBL), na segunda amostra da ETE Central. Em consonância com este achado, Puljko e colaboradores (2022), em um estudo croata, detectaram *E. coli* em ETE municipal, mesmo após o tratamento do esgoto.

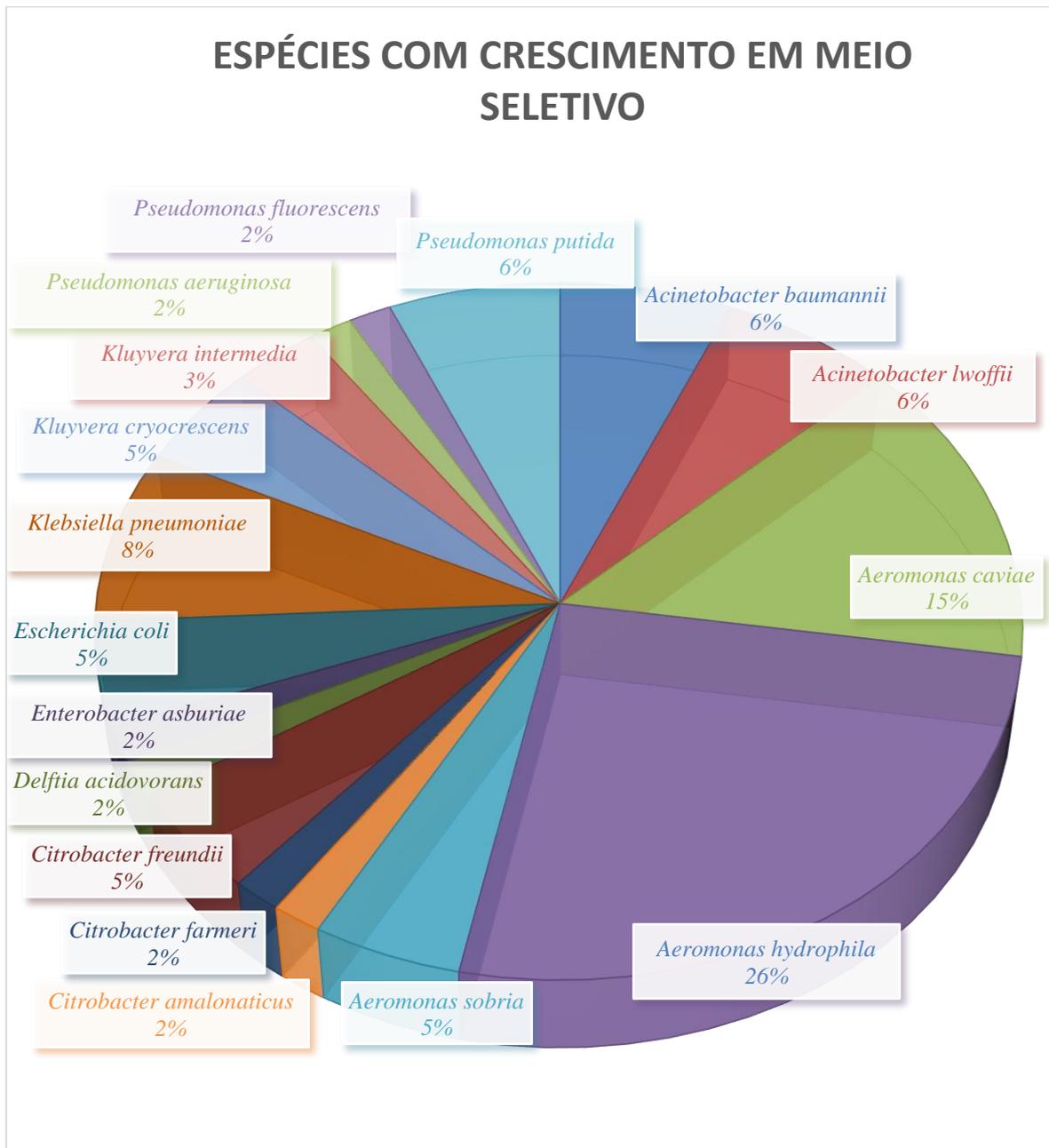
Espécies de *Citrobacter* sp., estiveram presentes nas amostras com três representantes: *Citrobacter freundii*, *Citrobacter farmeri*, *Citrobacter amalonaticus*. O gênero foi encontrado nas duas ETE, mesmo no esgoto tratado (a partir do meio CHROMagar ESBL). No estudo de Facciolà e colaboradores (2021), *Citrobacter* sp. esteve presente em 7,5% do total das bactérias pesquisadas, enquanto no presente estudo, o gênero representou 9% do total pesquisado, como pode ser observado na figura 24.

Citrobacter sp. é um gênero de importância clínica, lembrando que pertence ao grupo dos coliformes, pesquisados principalmente para qualidade de água e alimentos (MARTINS, 2021; GONZÁLEZ-ROMERO *et al.*, 2022). Ao mesmo tempo pode causar diversas infecções, inclusive as IRAS, como demonstrado nos estudos de Cabeço e Colombo (2019) sobre infecção urinária e na pesquisa de Marson e colaboradores (2020), com isolados de secreção traqueal e cavidade oral.

Kluyvera cryocrescens e *Kluyvera intermedia* somam 27% entre os achados de enterobactérias. *Kluyvera* sp. não é um gênero tão conhecido como os outros citados anteriormente, contudo é igualmente importante no que diz respeito à patogenicidade. Na China, Li e colaboradores (2019), detectaram em sua pesquisa, importantes genes de resistência à carbapenêmicos em cepas de *Kluyvera cryocrescens* isoladas de esgoto hospitalar.

Wang e colaboradores (2018), isolaram *Kluyvera* sp. em infecção do trato gastrointestinal, demonstrando que as bactérias deste gênero podem, assim como qualquer outra enterobactéria, causar infecções diversas. Em pesquisa realizada na Espanha, no mesmo ano, Hernández-García e colaboradores isolaram seis cepas hospitalares de *Kluyvera* sp. que apresentavam genes de resistência a antimicrobianos. Tal estudo corrobora com a premissa de que mesmo as espécies menos conhecidas podem ser reservatórios de genes de resistência, aumentando o risco de transmissão destes para outras espécies e/ou gêneros (SILVA, T., 2021)

Figura 24 – Gráfico de distribuição de BGN resistentes com crescimento em meio seletivo e a percentagem por espécie.



Entre as enterobactérias, o último representante isolado foi o gênero *Enterobacter*, com detecção da espécie *Enterobacter asburiae* em apenas uma amostra de esgoto bruto, na ETE Central. Este gênero, está relacionado de maneira semelhante a *Klebsiella* sp. às IRAS e a resistência bacteriana aos antimicrobianos (GIRLICH *et al.*, 2019; SALIMIYAN, *et al.*, 2020; LIMA *et al.*, 2021).

Wu e colaboradores (2021), detectaram *Enterobacter* sp. em amostras de sangue em pacientes com sepse. Já Baker e Gardner (2021) relataram uma lesão de pele infectada concomitantemente por *E. asburiae* e *Aeromonas hydrophila*. Estes dois micro-organismos

também foram encontrados juntos na terceira amostra de esgoto bruto da ETE Central e podem agir sinergicamente para o desenvolvimento e agravamento de uma infecção (BAKER; GARDNER 2021).

Com relação às *Aeromonas* spp., foram detectados 28 isolados que representam 45,2% do total de BGN, identificados em três espécies: *Aeromonas hydrophila* (16), *Aeromonas caviae* (9) e *Aeromonas sobria* (3). Estas três espécies são, de acordo com Rodrigues e Ribeiro (2004), umas das principais e primeiras descritas na literatura. Foram isoladas em todas as amostras de esgoto bruto das duas ETE, como também em todas as amostras de esgoto tratado da ETE Central e em uma amostra (terceira) de esgoto tratado da ETE INI.

A espécie *Aeromonas hydrophila* está associada a contaminação de pescado e água, todavia é também relatada em muitas infecções. Estes agravos acometem principalmente o sistema tegumentar e gastrointestinal, por conta de lesões e consumo de água e alimentos contaminados, respectivamente (GRIM *et al.*, 2014; DAMER *et al.*, 2015; BAKER; GARDNER, 2021; FRANCO-MONSREAL *et al.*, 2022).

A *Aeromonas caviae* aparece nos estudos de maneira coadjuvante, em menor frequência, como apresentado na pesquisa de Sekizuka e colaboradores (2019), que isolaram esta espécie em esgoto doméstico no Japão. Esta bactéria também foi isolada em resíduos de criação de aves na China, por Chen e colaboradores (2019).

Já a *Aeromonas sobria*, assim como na presente pesquisa, exibe uma frequência muito reduzida nos estudos sobre o gênero. Porém há um número grande de relatos em infecções em humanos, como no trabalho de Song e colaboradores (2019), onde esta espécie foi isolada em líquido peritoneal em diálise. Valcarcel e colaboradores (2021) isolaram *A. sobria* em amostras de sangue em pacientes adultos e pediátricos portadores de distúrbios hematológicos. Nestes estudos, a maioria dos isolados são de origem hospitalar, entretanto alguns são de origem ambulatorial.

A identificação das espécies de *Aeromonas* pode ser bem difícil pelos métodos convencionais. Até mesmo os métodos automatizados apresentam limitações, sendo necessário, em muitos casos, métodos moleculares para correta identificação (SOBRAL, 2018). Entre as provas bioquímicas realizadas neste estudo, o teste de Voges Proskauer é essencial para a classificação das espécies de *Aeromonas* sp. e pode apresentar resultados onde a reação positiva se apresenta fraca, como apresentado na figura 25 (MAILAFIA; NABILAH; OLABODE, 2021). Portanto, neste tipo de análise, é preciso um olhar atento e experiente de quem interpreta o resultado do teste.

Figura 25 – Teste de VP (Voges Proskauer) para identificação das espécies de *Aeromonas* sp.



Legenda: Da esquerda para a direita um teste positivo com a formação de um anel vermelho, teste fraco positivo com o anel de cor mais clara e teste negativo, com a ausência de anel. Fonte: Próprio autor

Entre os BGN-NF foram isoladas as seguintes espécies: *Acinetobacter baumannii* (4), *Acinetobacter lwoffii* (4), *Pseudomonas putida* (4), *Pseudomonas fluorescens* (1), *Pseudomonas aeruginosa* (1) e *Delftia acidovorans* (1). O gênero *Acinetobacter* e o gênero *Pseudomonas* foram responsáveis por 93% dos isolados, esse dado corrobora com a literatura, onde estes gêneros compõem a maioria dos estudos em BGN-NF (LEE *et al.*, 2001 PULIDO BELTRÁN; RODRÍGUEZ; MÉNDEZ, 2017; CANGUSSU, 2020).

Os BGN-NF foram detectados no esgoto bruto em todas as amostras da ETE Central. Na ETE INI, apenas na primeira amostra de esgoto bruto não foram encontrados. Este fato pode ser explicado pela metodologia utilizada, já que os isolados foram derivados de meio seletivo com antibiótico. Ou seja, no esgoto bruto deve existir provavelmente uma série de espécies de BGN-NF, porém não cresceram nos meios de cultura utilizados em nossa pesquisa, pois eram sensíveis às cefalosporinas de terceira geração. Já no esgoto tratado, este grupo foi detectado em duas das quatro amostras da ETE Central (segunda e quarta coleta). Por fim, na ETE INI foi isolado um BGN-NF do esgoto tratado apenas na terceira coleta.

Acinetobacter sp., gênero encontrado em nossa pesquisa de micro-organismos resistentes (Figura 24) está presente no ambiente de maneira difusa, assim como nas infecções oportunistas, principalmente em instituições de saúde. Este gênero possui grande resistência por sobreviver no ambiente, pela possibilidade de apresentar diversos fatores de virulência e

até mesmo possuem genes de resistência aos principais antimicrobianos (CANGUSSU, 2020). Sua presença em águas residuais é um risco para infecções diversas, desde gastrointestinais, pneumonia e até sepse (RIBEIRO *et al.*, 2020).

Segundo Karakonstantis e seus colaboradores (2020), *Acinetobacter baumannii* é a espécie mais conhecida e mais isoladas em todas as pesquisas relacionadas ao gênero. Detectado em 6% dos nossos achados, este micro-organismo, pode causar infecções severas e levar o indivíduo ao óbito, principalmente àqueles com a imunidade reduzida (KARAKONSTANTIS *et al.*, 2020). Pesquisas recentes sugerem que a infecção por *Acinetobacter baumannii* associada à COVID-19, potencializa os efeitos deletérios que cada uma teria isoladamente (RANGEL; CHAGAS; DE-SIMONE, 2021; RUSSO *et al.*, 2022).

De maneira semelhante, o *Acinetobacter lwoffii*, encontrado em 6% dos nossos isolados Gram-negativos, é relacionado às IRAS, porém é também encontrado contaminando alimentos e até mesmo em infecções em diversos animais, além dos humanos (CAMPOS *et al.*, 2019). Na pesquisa conduzida por Ioannou, Mavrikaki e Kofteridis (2021), foi observado que entre os casos de endocardite infecciosa causados por *Acinetobacter* sp., *Acinetobacter lwoffii* ficou em segundo lugar em frequência entre as espécies do gênero, perdendo apenas para *Acinetobacter baumannii*.

Em relação ao gênero *Pseudomonas*, encontramos três espécies: quatro isolados de *Pseudomonas putida*, um de *Pseudomonas fluorescens* e um de *Pseudomonas aeruginosa*. Estas espécies são encontradas na natureza e ao mesmo tempo podem causar inúmeras infecções, como do trato urinário, do sistema respiratório, do sistema tegumentar e até mesmo infecções generalizadas (HASSUNA, *et al.*, 2020).

Estudos apontam que *Pseudomonas putida* está presente em muitos processos de contaminação alimentar, causando grande risco de infecção pelo consumo dos mesmos. Podemos citar, por exemplo, a pesquisa de Fanelli, Caputo e Quintieri (2021), encontrando esta espécie em vegetais na Itália, inclusive formando biofilme. Georgakopoulou e colaboradores (2021), apontaram *Pseudomonas putida* como fator complicador na COVID-19, agindo com sinergismo na destruição de brônquios de grosso calibre causada pela infecção e inflamação crônicas.

A espécie *Pseudomonas fluorescens*, assim como as outras bactérias do mesmo gênero, estão amplamente disseminadas pelo ambiente e de maneira oportunista pode causar malefícios a animais, inclusive os humanos (LIU *et al.*, 2021). Hardi e colaboradores (2018), isolaram *Pseudomonas fluorescens* e *Aeromonas hydrophila* de infecção de tilápia, assim como no presente estudo isolamos a mesma combinação no esgoto tratado da ETE Central, na segunda

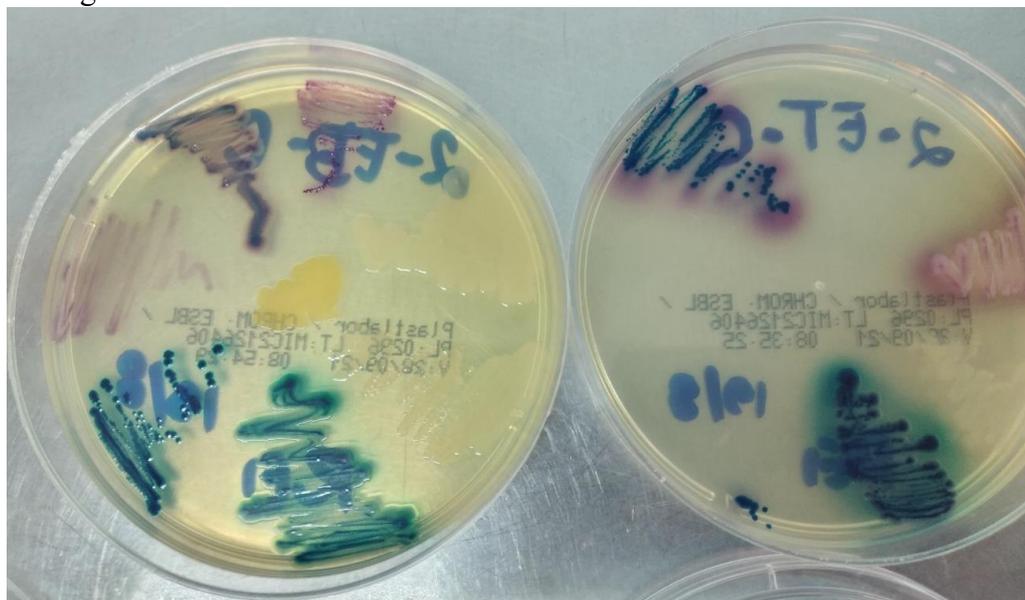
amostra. A permanência da contaminação do esgoto, mesmo após o tratamento, aumenta o risco da contaminação de animais aquáticos, ou indiretamente com o contato com a água e também do consumo por humanos de peixes infectados (HARDI *et al.*, 2018).

A *Pseudomonas aeruginosa* é a espécie mais conhecida do gênero e a mais citada na literatura, porém somente um isolado foi detectado em nosso estudo, na quarta amostra de esgoto tratado da ETE Central. A bactéria em questão está associada a diversas infecções, inclusive às IRAS, principalmente potencializando as complicações respiratórias crônicas (GARCIA *et al.*, 2020).

Já a espécie *Delftia acidovorans* foi isolada do esgoto bruto da ETE INI em uma única amostra (segunda). Esta não é tão comum de ser isolada e bem menos relatada em estudos de saúde e ambiente. Porém, apesar de raros, há relatos de infecções e também da ocorrência da mesma como contaminante em superfícies (VIJAY; WILCOX, 2018; PATEL *et al.*, 2019). Em contrapartida, essa espécie aparece em diversos estudos sobre biotecnologia e biorremediação, inclusive no tratamento de esgotos. Harris e colaboradores (2022), utilizaram enzimas produzidas por *Delftia acidovorans*, para a biorremediação de solos contaminados, demonstrando grande potencial de uso de micro-organismos para esse fim.

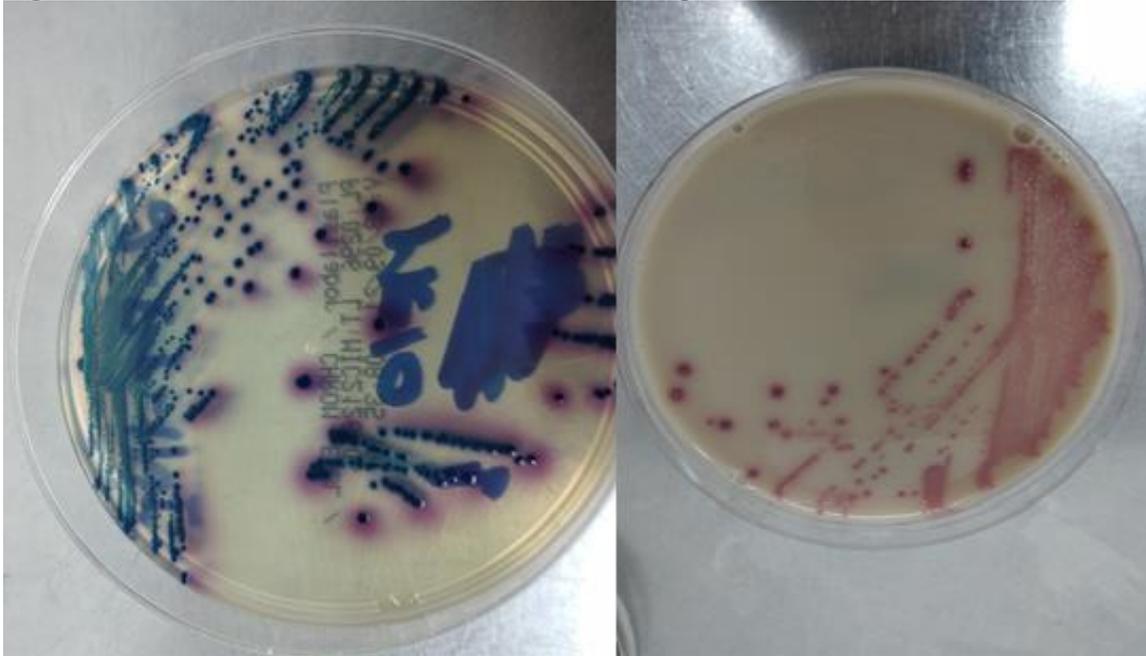
A otimização do rastreio dos BGN resistentes (figura 26), assim como o isolamento secundário das colônias para posterior identificação (figura 27) foi possível graças a utilização de meios cromogênicos seletivos. Os meios cromogênicos já estão no mercado há mais de dez anos e são amplamente utilizados na Microbiologia Clínica (MIMICA; MENDES, 2007; MAESTRI *et al.*, 2020).

Figura 26 – Placas de meio seletivo com replaqueamento de espécies isoladas em esgoto bruto e tratado.



Fonte: Próprio autor

Figura 27 – Isolamento de colônias em meios cromogênicos.



Fonte: Próprio autor

O uso destes meios em Microbiologia Ambiental, principalmente para a análise de esgoto, ainda não é muito difundido, embora tenha se mostrado muito satisfatório neste estudo para os bacilos Gram-negativos, não detectou a presença de Gram-positivos resistentes. Em contrapartida, Hsiao e colaboradores (2012), utilizaram CHROMagar MRSA para verificar a presença de MRSA no ar hospitalar e o mesmo autor, com outra equipe de pesquisa (HSIAO *et al.*, 2014), utilizou o CHROMagar VRE para análise de ar em ETE e em instalação de criação suína. Fato que corroborou para que escolhêssemos implementar essa metodologia em nosso estudo, pois segundo esses pesquisadores, a utilização dos meios cromogênicos, diminuiu o tempo entre semeadura e identificação e ajudou a selecionar as provas bioquímicas necessárias para o isolado.

6.3 PERFIL DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

Os resultados dos TSA foram divididos pelos grupos pesquisados, assim como nas identificações. Inicialmente é exibido o perfil das enterobactérias, de acordo com a tabela 8. As categorias utilizadas foram: Sensível (S), Intermediário (I) e Resistente (R). É importante lembrar que as bactérias que foram submetidas ao TSA, previamente já tinham passado pela triagem do meio cromogênico com antimicrobiano, sendo teoricamente já resistente à cefotaxima (extrapolando para as cefalosporinas de terceira geração). O TSA além de confirmar a resistência, possibilitou a testagem também de outros antimicrobianos.

Tabela 8 – Perfil de sensibilidade das enterobactérias isoladas aos antimicrobianos.

ID	Espécie	AMP	ASB	PIT	CFO	CAZ	CPM	CRO	ETP	IMI	MEM	AMI	GEN	CIP	COL
1EBC1	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	S	R	I	R	S	S	S	S	S	R	S
1EBINI2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S
1EBINI3	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S
2EBINI3	<i>Citrobacter farmeri</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S
2EBINI4	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S
2ETC1	<i>Escherichia coli</i>	R	S	S	S	R	I	R	S	S	S	S	S	R	S
2ETC4	<i>Kluyvera cryocrescens</i>	R	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	R	S
2ETC5	<i>Kluyvera cryocrescens</i>	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
2ETINI1	<i>Kluyvera cryocrescens</i>	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
3EBC2	<i>Enterobacter asburiae</i>	R	R	I	R	R	S	R	S	S	S	S	S	R	S
3EBC3	<i>Citrobacter freundii</i>	R	R	S	R	I	I	R	S	S	S	S	S	R	S
3EBC4	<i>Escherichia coli</i>	R	I	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
3EBINI1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S
3ETC2	<i>Citrobacter freundii</i>	R	R	S	R	I	I	R	S	S	S	S	S	R	S
3ETINI1	<i>Citrobacter freundii</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
4EBC1	<i>Kluyvera intermedia</i>	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
4ETC4	<i>Kluyvera intermedia</i>	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
4EBINI1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S
4EBINI2	<i>Citrobacter amalonaticus</i>	R	R	R	I	R	I	R	R	R	R	S	R	R	S

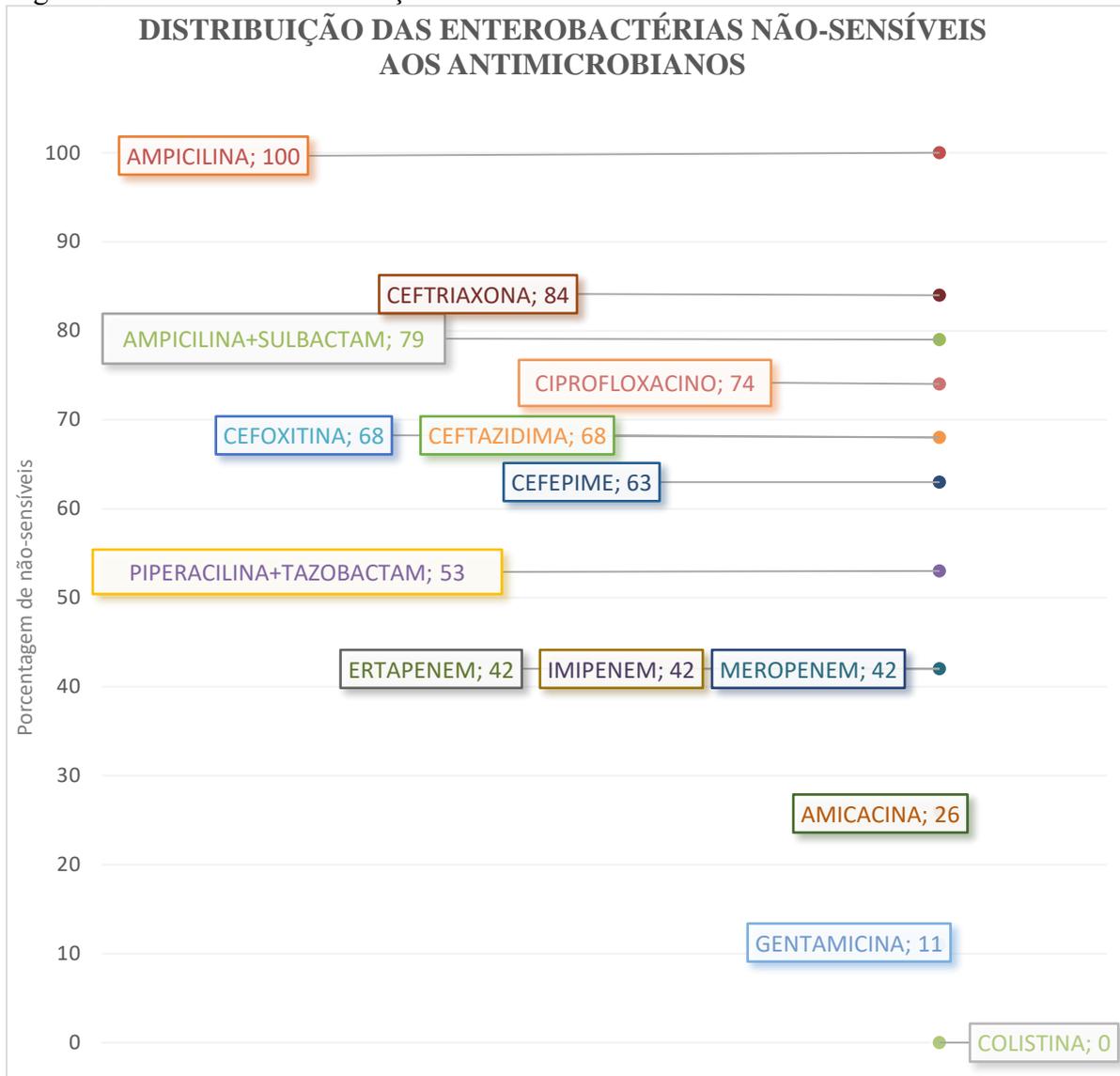
AMP (Ampicilina), ASB (Ampicilina+sulbactam), PIT (Piperacilina+tazobactam), CFO (Cefoxitina), CAZ (Ceftazidima), CPM (Cefepime), CRO (Ceftriaxona), ETP (Ertapenem), IMI (Imipenem), MEM (Meropenem), AMI (Amicacina), GEN (Gentamicina), CIP (Ciprofloxacino), COL (Colistina) / Categorias: S (Sensível), I (Intermediário) e R (Resistente).

Todos os isolados foram resistentes à ampicilina, em contrapartida foram em unanimidade sensíveis à colistina. Podemos observar na figura 28 o gráfico de distribuição das enterobactérias não-sensíveis.

O termo não-sensível é utilizado para designar as categorias R e I juntas (CLSI, 2019). Dentro do grupo dos beta-lactâmicos com inibidores de beta-lactamase, as enterobactérias apresentaram uma não-sensibilidade de 79% para ampicilina+sulbactam e 53% para piperacilina+tazobactam.

A cefoxitina apresentou 68%, frente a 84% de ceftriaxona, 68% de ceftazidima e 63% de cefepime. Aos carbapenêmicos, as enterobactérias apresentaram 42% para ertapenem, imipenem e meropenem igualmente, diante de 26% para amicacina e 11% para gentamicina. O ciprofloxacino exibiu um perfil de 74% de não-sensibilidade.

Figura 28 – Gráfico de distribuição das enterobactérias não sensíveis.



Legenda: Não-sensíveis = Resistentes + Intermediários

Em estudo de Soriano-Moreno e colaboradores (2021), realizado em esgoto hospitalar, as enterobactérias apresentaram um perfil de resistência de 77% para ampicilina+sulbactam, 100% para ampicilina e 64% para ciprofloxacino, corroborando com os achados da presente pesquisa. Por outro lado, esses autores, no tocante à resistência dos micro-organismos isolados, para cefepime (94%), ceftazidima (94%) e gentamicina (40%), apresentaram valores maiores em relação aos achados das ETE Central e ETE INI.

Em contrapartida, para imipenem (27%), meropenem (13%) e piperacilina+tazobactam (13%), os valores deste estudo peruano foram significativamente menores que o nosso estudo, sugerindo que a dispersão dos genes e a epidemiologia destas bactérias no local de estudo, podem influenciar diretamente o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos.

Tabela 9 – Perfil de sensibilidade das *Aeromonas* sp. aos antimicrobianos.

Identificador	Espécie	PIT	CFO	CAZ	CPM	CRO	IMI	MEM	AMI	GEN	CIP
1EBC2	<i>Aeromonas hydrophila</i>	S	S	R	S	R	S	S	S	S	R
1EBC4	<i>Aeromonas hydrophila</i>	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S
1EBC6	<i>Aeromonas caviae</i>	S	R	S	I	R	S	S	S	R	R
1EBC7	<i>Aeromonas caviae</i>	S	R	R	R	R	S	S	S	R	R
1EBINI1	<i>Aeromonas caviae</i>	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R
1EBINI4	<i>Aeromonas hydrophila</i>	R	S	R	S	R	S	S	S	S	R
1ETC1	<i>Aeromonas hydrophila</i>	R	S	S	I	R	S	S	S	R	R
2EBC1	<i>Aeromonas sobria</i>	R	S	I	S	R	S	S	S	S	S
2EBC4	<i>Aeromonas hydrophila</i>	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R
2EBC5	<i>Aeromonas hydrophila</i>	S	R	R	S	R	S	S	S	S	S
2EBC6	<i>Aeromonas caviae</i>	S	R	R	R	R	S	S	S	S	R
2EBC7	<i>Aeromonas sobria</i>	S	R	R	S	R	S	S	S	S	S
2EBINI1	<i>Aeromonas caviae</i>	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R
2EBINI5	<i>Aeromonas sobria</i>	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R
2EBINI7	<i>Aeromonas caviae</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
2EBINI8	<i>Aeromonas hydrophila</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
2ETC3	<i>Aeromonas hydrophila</i>	S	R	R	S	R	S	S	S	S	S
3EBC1	<i>Aeromonas hydrophila</i>	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R
3EBINI3	<i>Aeromonas hydrophila</i>	S	R	R	R	I	S	S	S	S	R
3EBINI4	<i>Aeromonas hydrophila</i>	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R
3EBINI5	<i>Aeromonas caviae</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
3EBINI6	<i>Aeromonas hydrophila</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
3ETC1	<i>Aeromonas hydrophila</i>	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S
3ETINI2	<i>Aeromonas hydrophila</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
4EBC2	<i>Aeromonas hydrophila</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
4EBC3	<i>Aeromonas caviae</i>	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R
4ETC1	<i>Aeromonas hydrophila</i>	S	R	S	S	R	S	S	S	S	R
4EBINI3	<i>Aeromonas caviae</i>	S	S	R	I	S	S	S	S	S	R

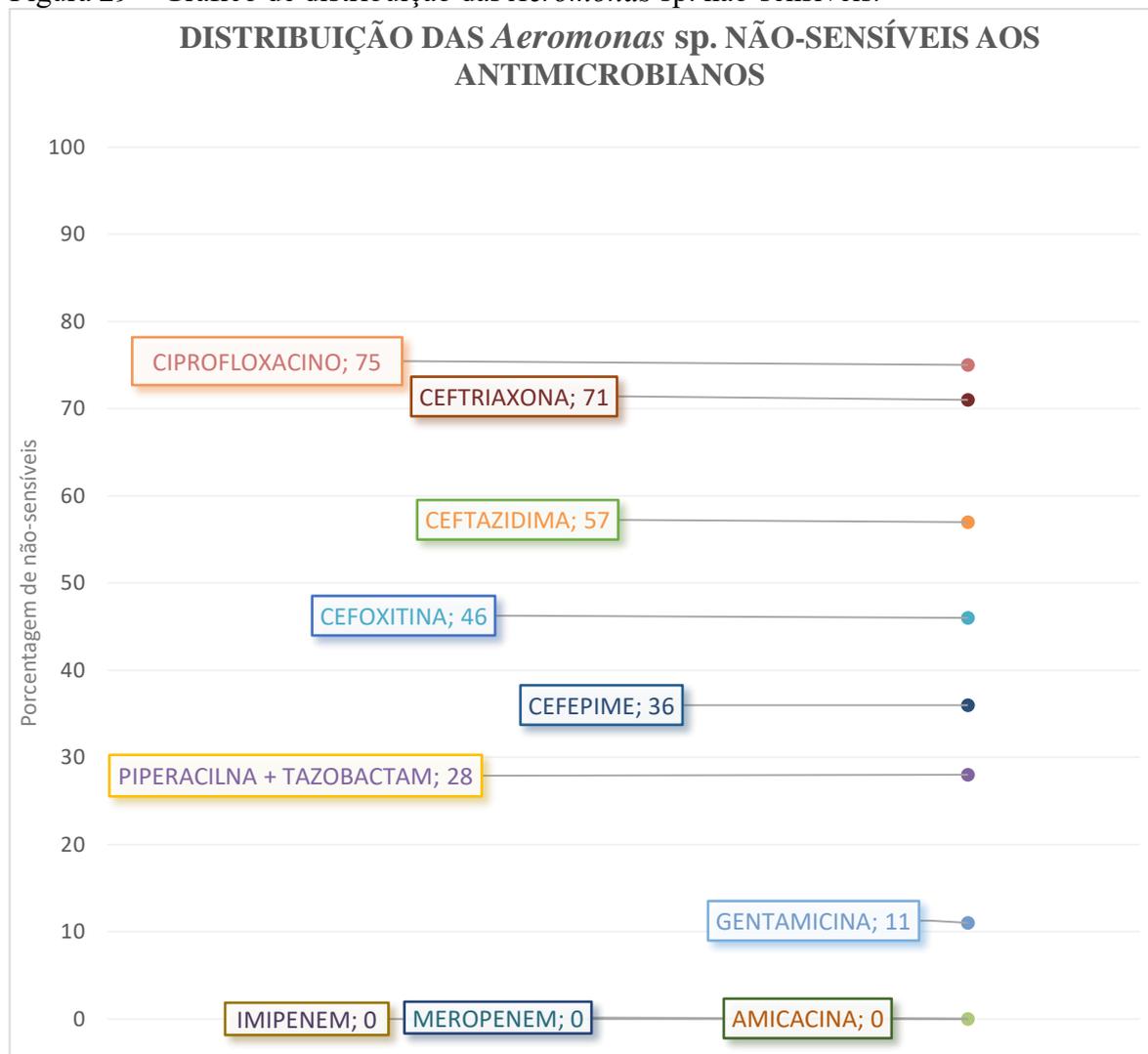
PIT (Piperacilina+tazobactam), CFO (Cefoxitina), CAZ (Ceftazidima), CPM (Cefepime), CRO (Ceftriaxona), IMI (Imipenem), MEM (Meropenem), AMI (Amicacina), GEN (Gentamicina), CIP (Ciprofloxacino) / Categorias: S (Sensível), I (Intermediário) e R (Resistente).

No grupo das *Aeromonas* sp., os isolados testados frente aos antimicrobianos foram todos sensíveis aos carbapenêmicos (meropenem e imipenem) e a amicacina, como é apresentado na tabela 9. Os isolados foram 75% não-sensíveis a ciprofloxacino, 71% a ceftriaxona, 57% a ceftazidima, 46% a cefoxitina, 36% a cefepime, 28% a piperacilina+tazobactam e 11% a gentamicina.

A distribuição das *Aeromonas* sp., em relação a não-sensibilidade aos antimicrobianos, pode ser melhor observada de maneira gráfica na figura 29. Em comparação ao TSA das enterobactérias, as *Aeromonas* sp. apresentaram um perfil mais sensível em praticamente todos os antimicrobianos, com exceção do ciprofloxacino e da gentamicina que apresentaram a

mesma porcentagem.

Figura 29 – Gráfico de distribuição das *Aeromonas* sp. não-sensíveis.



Legenda: Não-sensíveis = Resistentes + Intermediários.

Corroborando com nossos achados, que detectaram 11% em relação ao mesmo antimicrobiano, Fauzi e colaboradores (2021), isolaram *Aeromonas* sp. em peixes na Malásia e obtiveram uma resistência de 9,8% à gentamicina. Ainda no mesmo estudo, foi detectada uma resistência de 9,8% destes micro-organismos ao ciprofloxacino, valor muito abaixo dos 75% encontrados em nossa pesquisa para o mesmo antimicrobiano. Uma possível explicação para esse fato seria o uso difundido deste antimicrobiano no Brasil, aumentando consideravelmente a presença do mesmo no ambiente, ainda mais quando se trata de proximidade ao ambiente hospitalar, já que no esgoto, os genes de resistência presentes estão mais concentrados que em peixes e podem estar sendo disseminados entre os micro-organismos com mais facilidade (SILVA, T., 2021).

Na pesquisa de Eid e Hanafy (2019), 7% dos isolados de *Aeromonas* spp. foram não -

sensíveis à gentamicina, o que está em consonância com nossos resultados. Já para a amicacina, os isolados apresentaram 21% de não-sensibilidade, de encontro ao achado de total sensibilidade nesta pesquisa. As diferenças encontradas, tem como possíveis explicações, o sítio de isolamento destas bactérias, assim como o perfil de cada localidade.

Para os BGN-NF, os isolados testados foram todos sensíveis a gentamicina e apenas um isolado, do esgoto tratado da ETE INI, foi resistente a amicacina. Logo, assim como nos outros grupos, os aminoglicosídeos obtiveram um desempenho satisfatório frente aos isolados testados.

Tabela 10 – Perfil de sensibilidade dos BGN-NF aos antimicrobianos.

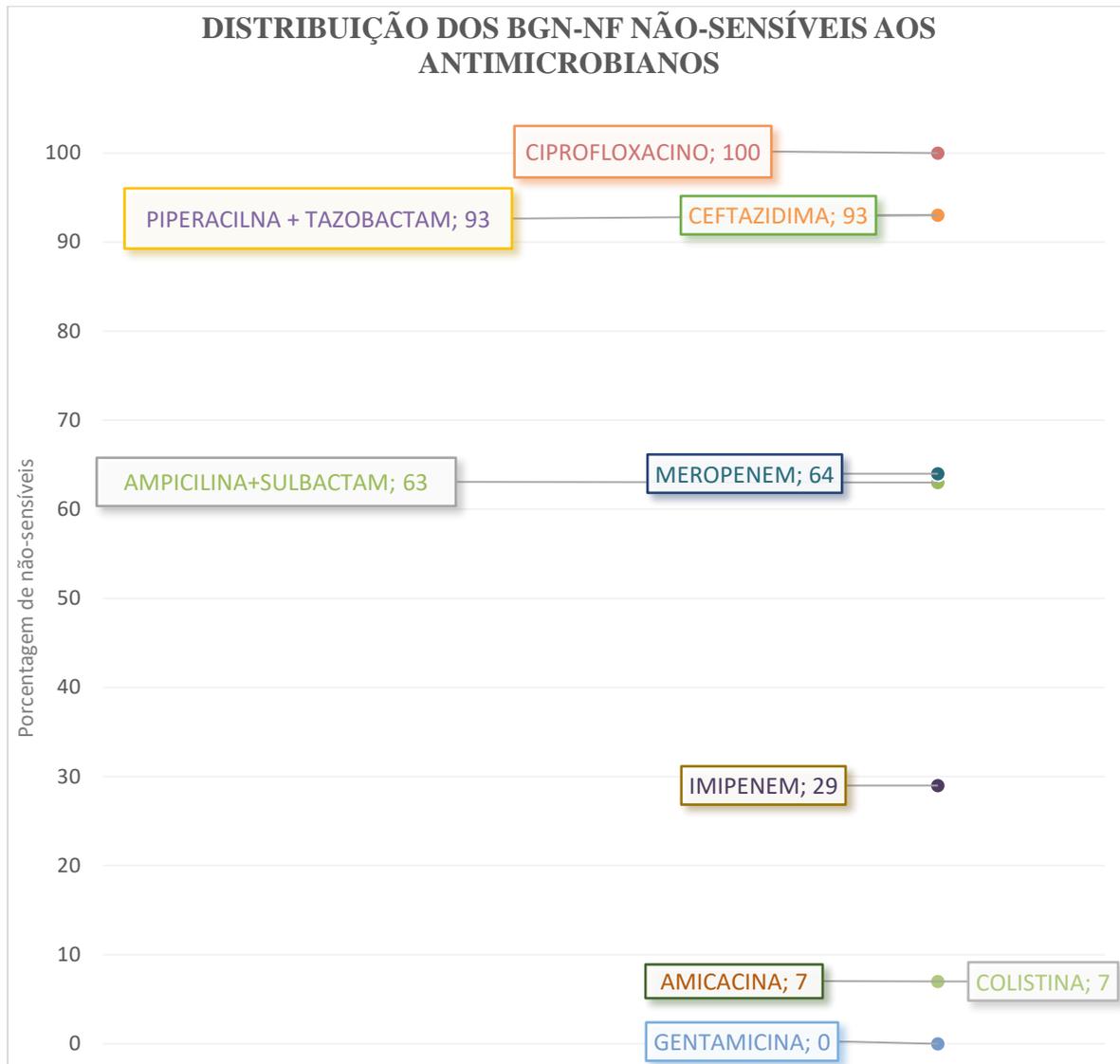
ID	Espécie	ASB	PIT	CAZ	IMI	MEM	AMI	GEN	CIP	COL
1EBC3	<i>Acinetobacter baumannii</i>	S	R	S	S	S	S	S	I	S
1EBC5	<i>Pseudomonas putida</i>	NA	I	I	S	I	S	S	R	S
2EBC2	<i>Pseudomonas putida</i>	NA	R	I	S	I	S	S	I	S
2EBC3	<i>Pseudomonas putida</i>	NA	R	I	S	S	S	S	I	R
2EBINI2	<i>Acinetobacter baumannii</i>	R	R	R	R	R	S	S	R	S
2EBINI6	<i>Delftia acidovorans</i>	NA								
2ETC2	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	NA	R	I	R	R	S	S	R	S
3EBC5	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	R	R	R	R	R	S	S	R	S
3EBINI2	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	R	R	R	S	R	S	S	R	S
3ETINI3	<i>Pseudomonas putida</i>	NA	R	R	S	R	R	S	R	S
4EBC4	<i>Acinetobacter baumannii</i>	R	R	R	S	I	S	S	I	S
4EBC5	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	S	R	R	S	S	S	S	I	S
4ETC2	<i>Acinetobacter baumannii</i>	S	S	R	S	S	S	S	I	S
4ETC3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NA	I	I	I	S	S	S	I	S
4EBINI4	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	R	R	R	S	R	S	S	R	S

ASB (Ampicilina+sulbactam), PIT (Piperacilina+tazobactam), CAZ (Ceftazidima), IMI (Imipenem), MEM (Meropenem), AMI (Amicacina), GEN (Gentamicina), CIP (Ciprofloxacino), COL (Colistina) / Categorias: S (Sensível), I (Intermediário) e R (Resistente). NA (Não Aplicável).

O perfil de susceptibilidade de cada isolado de BGN-NF está apresentado na tabela 10. O único isolado não testado foi a bactéria *Delftia acidovorans*, que não apresenta informações para a realização de TSA nos compêndios utilizados (BrCAST, 2019; CLSI, 2019; EUCAST, 2019).

Quanto à distribuição dos BGN-NF não-sensíveis aos antimicrobianos, podemos observar na figura 30, que os isolados foram de maneira unânime, não-sensíveis a ciprofloxacino. Apresentando também alta não-sensibilidade para piperacilina+tazobactam e ceftazidima, com 93% para ambos.

Figura 30 – Gráfico de distribuição dos BGN-NF não-sensíveis.



Legenda: Não-sensíveis = Resistentes + Intermediários

Ainda avaliando o perfil não-sensível destes isolados, observa-se uma taxa para meropenem e ampicilina+sulbactam de 64 e 63% respectivamente. Com uma porcentagem mais baixa, imipenem com 29%, amicacina com 7% e colistina com 7%. Um achado importante foi a detecção da resistência de um isolado à colistina, de uma bactéria identificada como *Pseudomonas putida*, derivada de amostra de esgoto tratado da ETE INI (terceira amostra).

A resistência à colistina pelos BGN-NF é um grande problema para o tratamento de infecções, principalmente em hospitais. Pois a colistina/polimixina em muitos casos é a única opção na terapêutica de infecções por Gram-negativos multirresistentes (HIGUITA-GUTIÉRREZ; JIMÉNEZ-QUICENO, 2017).

A *Pseudomonas sp.* é um dos principais micro-organismos que podem expressar esta resistência e complicar ainda mais o processo terapêutico, por minimizar as opções

antimicrobianas (ZARATE *et al.*, 2021; ROSA *et al.*, 2021). Aguiar (2020), em esgoto hospitalar e em ETE de Boa Vista – Roraima, isolou *Pseudomonas* sp. com uma sensibilidade reduzida para diversos antimicrobianos, inclusive para os carbapenêmicos.

É importante salientar que os BGN-NF já apresentam resistência intrínseca a alguns antimicrobianos, reduzindo assim as opções terapêuticas e fazendo com que sejam classificados como multirresistentes mais facilmente (DA SILVA, 2021). Por este motivo, entre os grupos analisados, os BGN-NF apresentaram maior resistência em relação às enterobactérias, assim como os dois anteriores apresentaram maior resistência em relação às *Aeromonas* sp.

No presente trabalho, oito isolados de enterobactérias apresentaram resistência aos carbapenêmicos imipenem e meropenem e foram submetidas posteriormente aos testes fenotípicos para carbapenemases. Todos foram derivados de amostras da ETE INI (sete de esgoto bruto e uma amostra de esgoto tratado). Destes oito, cinco isolados foram de *Klebsiella pneumoniae*, um de *Citrobacter freundii*, um de *Citrobacter farmeri* e um de *Citrobacter amalonaticus*. Tal resultado corrobora com diversos estudos onde apontam a *Klebsiella pneumoniae* como principal enterobactéria resistente aos carbapenêmicos (DIENSTMANN *et al.*, 2010; WEISS *et al.*, 2015; LORENZONI *et al.*, 2018; DE SOUSA; RAMALHO; CAMARGO, 2020).

Entre os critérios interpretativos, nenhum dos isolados apresentou alguma discrepância entre os dois compêndios utilizados, não existindo a necessidade de interpretação para cada um deles. Entre as bactérias pesquisadas, apesar de todas serem resistentes às cefalosporinas de terceira geração devido à seleção em meio com antimicrobiano, não foi detectado em nenhum isolado a pan-resistência (onde nenhuma das classes de antimicrobianos é ativa contra o micro-organismo testado). Todavia, dos 62 isolados, 20 foram considerados multirresistentes por apresentarem resistência a três ou mais classes de antimicrobianos (MAGIORAKOS *et al.*, 2012).

6.4 DETECÇÃO FENOTÍPICA DE ESBL, AMPC E CARBAPENEMASES

As enterobactérias resistentes às cefalosporinas foram submetidas ao teste de disco-aproximação para a detecção de ESBL e AmpC constitutiva. Já as que apresentaram não-sensibilidade aos carbapenêmicos, foram adicionalmente submetidas aos testes fenotípicos para carbapenemase, conforme apresentado na tabela 11.

Tabela 11 – Testes fenotípicos e sensibilidade à carbapenêmicos nas enterobactérias.

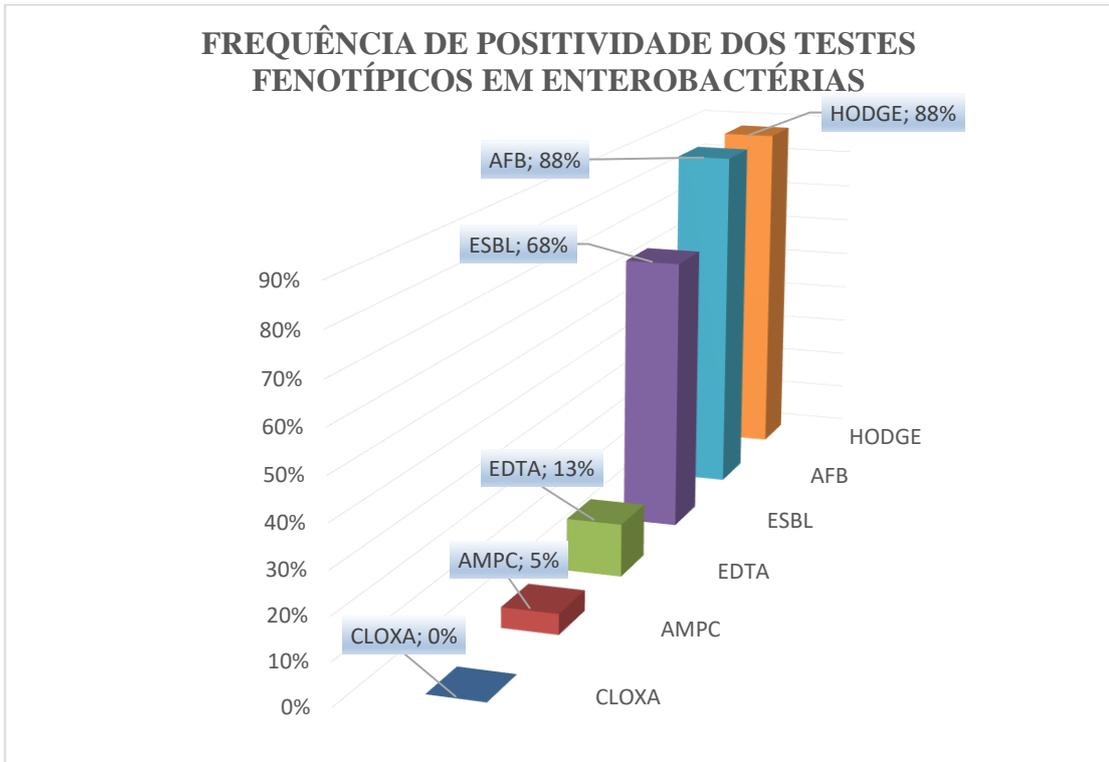
ID	Espécie	ESBL	AmpC	AFB	EDTA	CLOXA	HODGE	ETP	IMI	MEM
1EBC1	<i>Escherichia coli</i>	POS	NEG	NA	NA	NA	NA	S	S	S
1EBINI2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	POS	NEG	POS	NEG	NEG	POS	R	R	R
1EBINI3	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	POS	NEG	POS	NEG	NEG	POS	R	R	R
2EBINI3	<i>Citrobacter farmeri</i>	POS	NEG	POS	NEG	NEG	POS	R	R	R
2EBINI4	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	POS	NEG	POS	NEG	NEG	POS	R	R	R
2ETC1	<i>Escherichia coli</i>	POS	NEG	NA	NA	NA	NA	S	S	S
2ETC4	<i>Kluyvera cryocrescens</i>	NEG	NEG	NA	NA	NA	NA	S	S	S
2ETC5	<i>Kluyvera cryocrescens</i>	NEG	NEG	NA	NA	NA	NA	S	S	S
2ETINI1	<i>Kluyvera cryocrescens</i>	NEG	NEG	NA	NA	NA	NA	S	S	S
3EBC2	<i>Enterobacter asburiae</i>	POS	NEG	NA	NA	NA	NA	S	S	S
3EBC3	<i>Citrobacter freundii</i>	POS	POS	NA	NA	NA	NA	S	S	S
3EBC4	<i>Escherichia coli</i>	POS	NEG	NA	NA	NA	NA	S	S	S
3EBINI1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	POS	NEG	POS	NEG	NEG	POS	R	R	R
3ETC2	<i>Citrobacter freundii</i>	POS	NEG	NA	NA	NA	NA	S	S	S
3ETINI1	<i>Citrobacter freundii</i>	POS	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	R	R	R
4EBC1	<i>Kluyvera intermedia</i>	NEG	NEG	NA	NA	NA	NA	S	S	S
4ETC4	<i>Kluyvera intermedia</i>	NEG	NEG	NA	NA	NA	NA	S	S	S
4EBINI1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	POS	R	R	R
4EBINI2	<i>Citrobacter amalonaticus</i>	POS	NEG	POS	NEG	NEG	POS	R	R	R

ESBL (Beta-lactamases de espectro estendido), AmpC (Ampicilinase de classe C de Ambler), AFB (Ácido fenilborônico), EDTA (Ácido etilenodiamino tetra-acético), CLOXA (Cloxacilina), ETP (Ertapenem), IMI (Imipenem), MEM (Meropenem) / Categorias: POS (Positivo), NEG (Negativo), S (Sensível), R (Resistente) e NA (Não aplicável).

As frequências de positividade dos testes fenotípicos podem ser observadas na figura 31. É importante salientar que os testes de ESBL e AmpC foram realizados nos 19 isolados, enquanto que os testes de CLOXA, EDTA, AFB e HODGE foram realizados somente em oito isolados, os quais apresentaram um perfil de resistência a algum carbapenêmico.

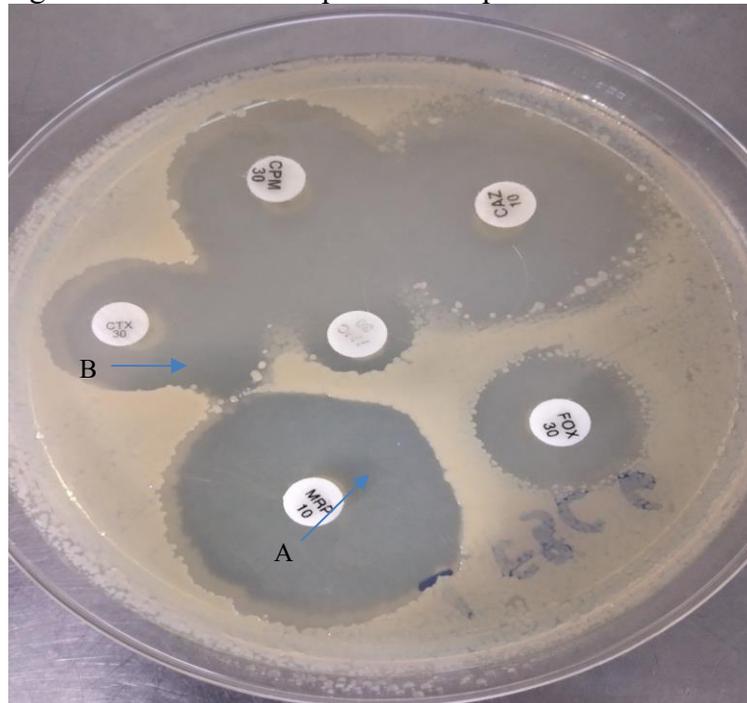
Em relação ao teste fenotípico para ESBL, obtivemos resultado positivo para 13 dos 19 isolados (68,4 %). Entre os seis negativos para este teste, cinco isolados foram do gênero *Kluyvera* e um isolado da espécie *Klebsiella pneumoniae*, derivada do esgoto bruto da ETE INI. Embora este isolado tenha sido negativo para ESBL, apresentou testes fenotípicos positivos para carbapenemases. O teste de AmpC foi positivo apenas para um isolado da espécie *Citrobacter freundii*, proveniente do esgoto bruto da ETE Central. Os testes positivos de ESBL e AmpC podem ser visualizadas na figura 32.

Figura 31 – Gráfico de frequência de positividade dos testes fenotípicos para as enterobactérias.



Legenda: CLOXA (Cloxacilina), AmpC (Ampicilinase de classe C de Ambler), EDTA (Ácido etilenodiamino tetra-acético), ESBL (Beta-lactamases de espectro estendido), AFB (Ácido fenilborônico).

Figura 32 – Testes fenotípicos de AmpC e ESBL.



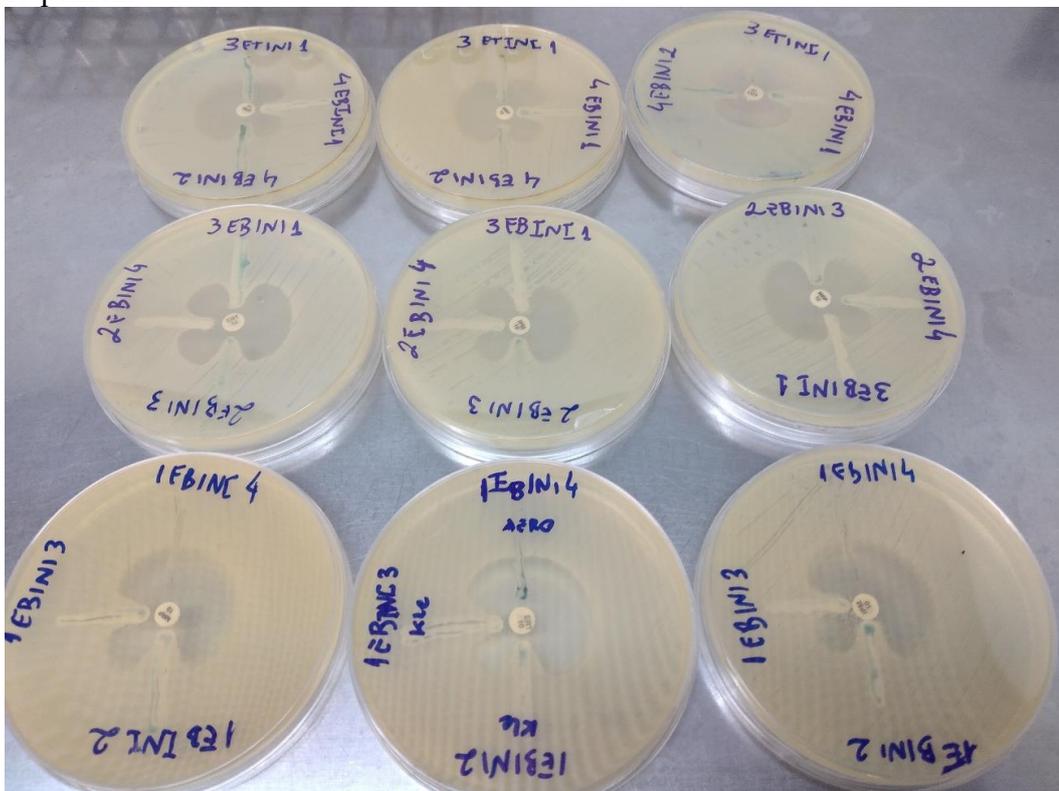
Legenda: Teste fenotípico positivo de AmpC constitutivo com formação do teste D em A e teste positivo para ESBL com distorção de halo em B.

Para os isolados de enterobactérias que não foram sensíveis a um dos carbapenêmicos testados (imipenem, meropenem e ertapenem), procedeu-se os testes fenotípicos para carbapenemase. Inicialmente foi realizado o Teste de Hodge, utilizado para triagem inespecífica deste tipo de resistência (ANVISA; 2013). Sete dos oito isolados (87,5 %) foram positivos para o teste, com exceção de um isolado de *Citrobacter freundii*, derivado de uma amostra de esgoto tratado da ETE INI.

O teste foi realizado com os três carbapenêmicos, no intuito de aumentar a sensibilidade do mesmo (CLSI, 2019). Os resultados foram os mesmos nos três antimicrobianos testados (figura 33 e 34).

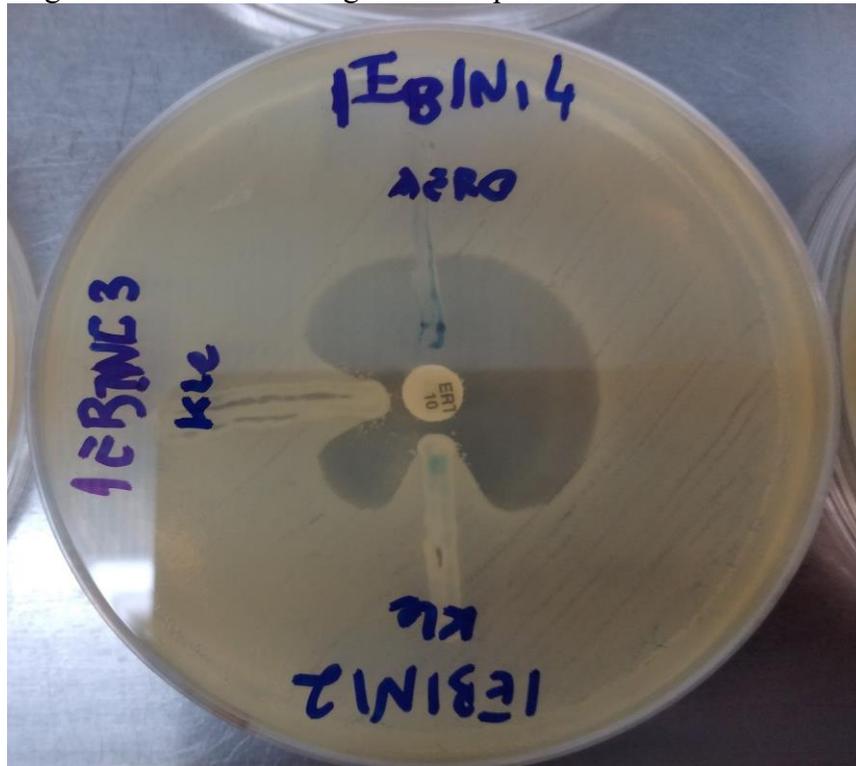
O teste com CLOXA (cloxacilina) se apresentou negativo para todas as amostras, indicando que não há indício de perdas de porinas associadas a AmpC. O teste de EDTA foi positivo apenas para um isolado de *Citrobacter freundii*, derivado de uma amostra de esgoto tratado da ETE INI. Tal resultado indica que a bactéria seja portadora de uma metalobetalactamases, sendo necessário o teste molecular para designar qual o gene produtor desta (ANVISA, 2013).

Figura 33 – Teste de Hodge com os três carbapenêmicos: imipenem, meropenem e ertapenem.



Fonte: Próprio autor

Figura 34 – Teste de Hodge com ertapenem.



Legenda: Na parte inferior e também à esquerda, verifica-se o teste positivo pela distorção do halo, na parte superior um teste negativo e na esquerda não houve inoculação. Fonte: Próprio autor

Na figura 35, podemos observar as placas com os discos de imipenem e meropenem não impregnados, os impregnados com as substâncias utilizadas e seus respectivos halos de inibição.

Figura 35 – Testes fenotípicos com ácido fenilborônico (A ou AFB), Ácido etilendiamino tetra-acético (EDTA ou E) e cloxacilina (CL ou C).

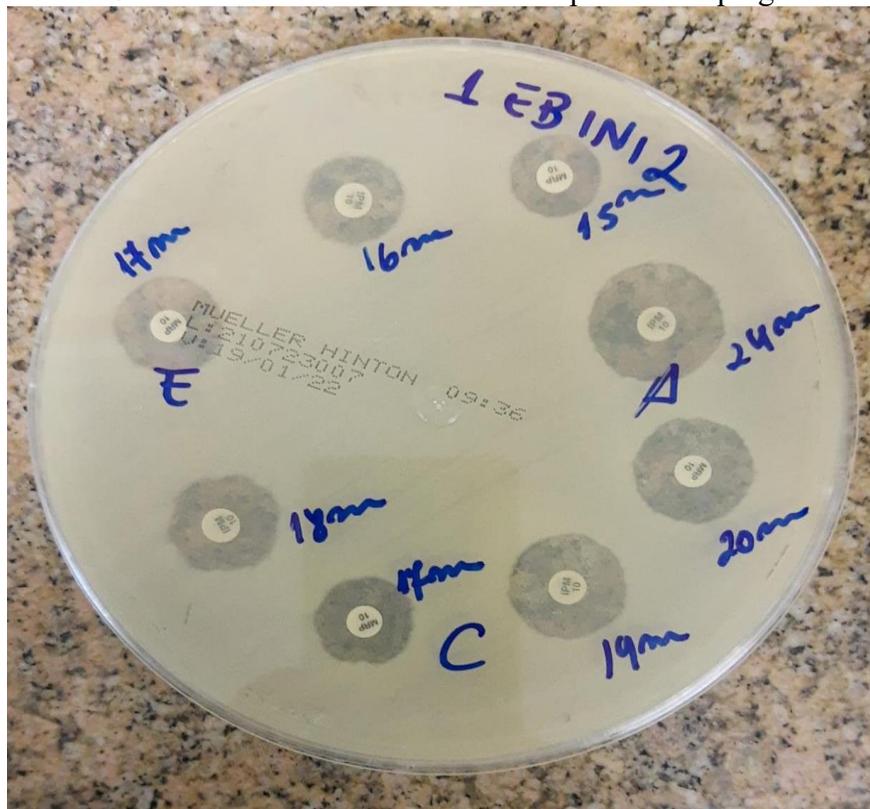


Fonte: Próprio autor

Já o teste com ácido fenilborônico (AFB) foi positivo em sete dos oito isolados (87,5 %). O único negativo, foi o isolado de *Citrobacter freundii*, o único positivo para o teste de EDTA, como citado anteriormente. Um teste positivo para AFB, indica a presença de serino-carbapenemases, sendo a KPC o tipo mais conhecido e frequente desta classe (ANVISA, 2013).

Um exemplo de resultado positivo para o teste de AFB, como visto na figura 36, foi o isolado “1EBINI2”, proveniente do esgoto bruto da ETE INI. O halo de inibição para imipenem não-impregnado foi de 16mm, já o disco impregnado com AFB foi de 24mm. O teste então apresentou uma diferença de 8mm entre os dois discos, classificando-o como positivo para carbapenemase do tipo serino, pois apresentou diferença de halo de inibição de ≥ 5 mm. Para o meropenem o halo foi de 15mm, frente a 20mm do impregnado com AFB, sendo também um teste positivo pela diferença de exatamente 5mm (ANVISA, 2013).

Figura 36 – Teste positivo para AFB, com diferença de halo de mais de 5mm entre o disco com antibiótico puro e o impregnado.



Legenda: Ácido fenilborônico (A ou AFB), Ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA ou E) e cloxacilina (CL ou C) Fonte: Próprio autor

Santos (2018), realizou em sua pesquisa, os testes de disco-aproximação para ESBL, o teste de Hodge para detecção de carbapenemases e de bloqueio enzimático para metalobetalactamases em enterobactérias, corroborando com a metodologia utilizada em nosso estudo. Entretanto, no teste de bloqueio enzimático, o quelante utilizado foi o 2-ácido mercaptopropiônico (2-MPA) e não o EDTA, conforme preconizado pela ANVISA (2013).

Já Do Nascimento e colaboradores (2019) utilizaram o bloqueio enzimático com EDTA para a detecção de metalobetalactamases em enterobactérias isoladas de hemoculturas. Batista (2020) utilizou CLOXA, EDTA e AFB, conforme preconizado pela ANVISA (2013) e igualmente utilizados na presente pesquisa. As enterobactérias estudadas derivaram de um Hospital em Foz do Iguaçu, no Paraná. Em todos os trabalhos citados, a bactéria *Klebsiella pneumoniae* foi a mais frequente associada ao teste fenotípico com AFB, indicando a provável presença de carbapenemases do tipo KPC.

É importante frisar que todos os isolados resistentes aos carbapenêmicos foram de origem da ETE INI, onde há o recebimento de esgoto hospitalar. Tal fato contribui de maneira significativa o isolamento de *Klebsiella pneumoniae* e *Citrobacter* sp. com algum teste fenotípico positivo para carbapenemases (PICÃO *et al.*, 2013; NICOLETTI *et al.*, 2015; ZAGUI, 2019; RIBEIRO *et al.*, 2020).

Os testes fenotípicos são uma importante ferramenta de triagem para tais mecanismos de resistência, haja visto que a maioria dos laboratórios de Microbiologia ainda não possuem a metodologia de biologia molecular, para a detecção dos genes produtores das enzimas em questão (ABRANTES; NOGUEIRA, 2017).

6.5. PESQUISA DOS GENES DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS BETA-LACTÂMICOS

Os testes moleculares realizados para pesquisar os genes: *blaKPC*, *blaIMP*, *blaVIM*, *blaBKC*, *blaOXA23*, *blaOXA48* e *blaCTX-M* em oitos isolados, que apresentaram resultados positivos no teste fenotípico. Com exceção de *blaKPC*, todas as outras sequências gênicas não foram detectadas, conforme observado na tabela 12.

Tabela 12 – Testes moleculares realizados nas enterobactérias resistentes à carbapenêmicos.

ID	Espécie	IMP	VIM	BKC	CTX-M	OXA48	OXA23	KPC
1EBINI2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS
1EBINI3	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS
2EBINI3	<i>Citrobacter farmeri</i>	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS
2EBINI4	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS
3EBINI1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS
3ETINI1	<i>Citrobacter freundii</i>	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
4EBINI1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
4EBINI2	<i>Citrobacter amalonaticus</i>	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS

IMP - Imipenemase / VIM - Verona Imipenemase / BKC – *Brazilian Klebsiella carbapenemase* / CTX-M – Cefotaximase isolada em *Munich* / OXA – Oxacilinas / KPC - *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase

Seis isolados (75 %), dos testados, tiveram a presença de *blaKPC*. Quatro isolados de *Klebsiella pneumoniae* (1EBINI2, 1EBINI3, 2EBINI4 e 3EBINI1), um isolado de *Citrobacter farmeri* (2EBINI4) e um de *Citrobacter amalonaticus* (4EBINI2), todos originários do esgoto bruto da ETE INI, em todas as coletas.

Tal fato indica que o gene *blaKPC* está presente de maneira constante no esgoto bruto da ETE INI, sugerindo também a presença deste no Centro Hospitalar COVID-19. Podemos observar o produto de amplificação do gene *blaKPC* na figura 36, com as seis amostras positivas para tal.

Relacionando estes resultados aos fenotípicos, todos os isolados com detecção de *blaKPC* foram também positivos para os testes com AFB e HODGE, indicando que os testes em questão foram 100% sensíveis e podem ser utilizados para a triagem deste mecanismo. Este resultado corrobora com os estudos prévios de nosso grupo (ABRANTES; NOGUEIRA, 2017), que indicaram a utilização desses testes como valiosa orientação presuntiva para avaliação da presença de carbapenemases em enterobactérias.

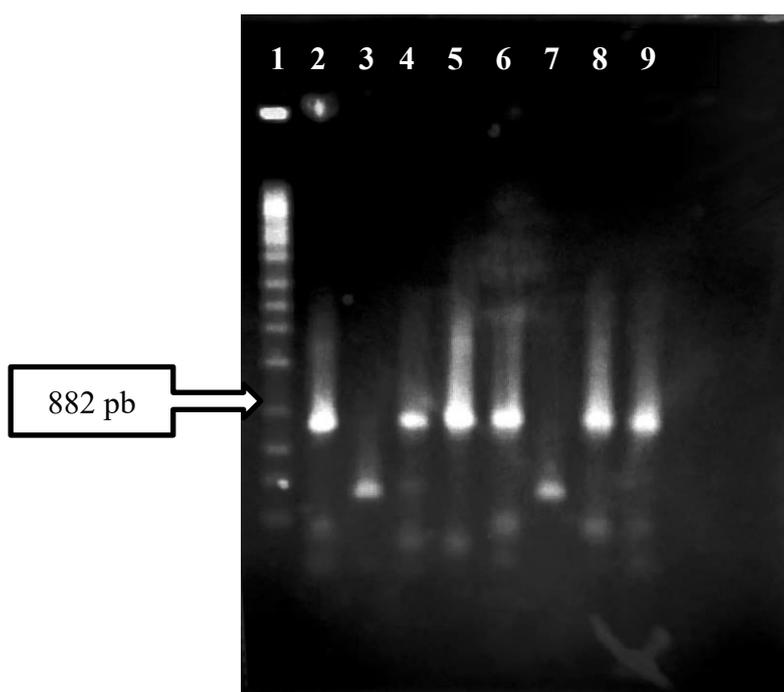
Dois isolados, *Citrobacter freundii* (3ETEINI1) e *Klebsiella pneumoniae* (4EBINI1) não apresentaram nenhuma das sequências pesquisadas. Tal fato pode ter como explicação a presença de outro gene diferente daqueles pesquisados neste estudo.

Na amostra 3ETEINI1, o teste de EDTA foi positivo e as sequências *blaVIM* e *blaIMP* (metalobetalactamases) não foram detectadas. É possível que algum outro gene de metalobetalactamases esteja presente, fazendo-se necessário testes adicionais com outras sequências. Já o isolado 4EBINI1, apresentou teste positivo para AFB e HODGE, sugerindo que mesmo que não haja detecção para *blaKPC* e *blaBKC*, é provável a presença de algum outro gene do grupo serino. Da Silva, Maçano e Picão (2018), relatam outras carbapenemases deste grupo, como GES, NMC, IMI e SME.

Ainda na figura 36, podemos observar a amplificação de bandas com valores de pares de base abaixo do padrão *blaKPC* nos isolados 3ETEINI1 e 4EBINI1. Após o sequenciamento destas cepas, a presença do gene *blaKPC* foi descartada.

Soares e colaboradores (2021) detectaram os genes *blaKPC* (57,5%), *blaVIM* (30,2%), *blaGES* (17%), *blaNDM* (15%) e *blaSPM* (2,4%) em BGN resistentes aos carbapenêmicos, isolados em um hospital pernambucano. Embora os isolados derivassem de amostras clínicas, a frequência de *blaKPC* é significativa, assim como em nosso estudo. Entretanto, *blaVIM* com 30,2% de frequência no estudo citado, em nossa pesquisa tal gene não foi detectado. Os genes *blaGES*, *blaNDM* e *blaSPM* não foram pesquisados.

Figura 36 – Produto de amplificação do gene *blaKPC* obtido através da reação em cadeia da polimerase (PCR) em diferentes amostras de enterobactérias.



Legenda: Linha 1: Padrão de peso molecular; Linha 2: 1EBINI2 (*K. pneumoniae*); Linha 3: 3ETEINI1 (*C. freundii*); Linha 4: 41EBINI3 (*K. pneumoniae*); Linha 5: 2EBINI3 (*C. farmeri*); Linha 6: 2EBINI4 (*K. pneumoniae*); Linha 7: 4EBINI1 (*K. pneumoniae*); Linha 8: 3EBINI1 (*K. pneumoniae*); Linha 9: 4EBINI2 (*C. amalonaticus*)

Batista (2020), corroborando com este estudo, obteve em sua maioria (81%) genes *blaKPC* isolados de *Klebsiella pneumoniae*. Antes dos testes moleculares foram realizados os testes fenotípicos segundo a ANVISA (2013) e obtiveram positividade para o AFB em 165 isolados. Logo em seguida, o gene *blaKPC* foi detectado em 162 isolados, demonstrando que há sensibilidade de 100%, como no nosso estudo. A especificidade não chega a esse número, porém chega a 98% no estudo citado e 85% em nossa pesquisa.

Segundo Abrantes e Nogueira (2017) os métodos fenotípicos, apesar de não serem a metodologia mais moderna e nem definitiva, como as análises moleculares para diagnóstico final das carbapenemases, contribuem de forma muito positiva e econômica no âmbito laboratorial, auxiliando indiscutivelmente na percepção da resistência bacteriana em cepas pesquisadas.

Os dados fornecidos pelos estudos aqui citados e os apresentados por esta pesquisa, corroboram com a literatura, que apresenta o tipo KPC como predominante em nosso país (DIENSTMANN *et al.*, 2010; ANVISA, 2013; BATISTA, 2020; DE SOUSA; RAMALHO; CAMARGO, 2020; SOARES *et al.*, 2021). Tais informações são essenciais para relacionar aos estudos epidemiológicos, ratificando a presença deste tipo de resistência e o risco para a Saúde Pública. Já no contexto ambiental, as presenças de bactérias portadoras de genes de resistência causam risco de transferência dos mesmos para outras bactérias, promovendo um desequilíbrio do meio pela modificação de ecossistemas (SILVA, T, 2021).

Os resultados obtidos chamam a atenção para a disseminação de micro-organismos potencialmente patogênicos e resistentes a antimicrobianos, no meio ambiente a partir dos efluentes finais (provenientes do tratamento secundário) das ETE, independentemente do tipo de sistema adotado. Fica evidente que para reduzir significativamente essa liberação, este deveria passar por tratamento adicional e desinfecção.

Na ETE INI já é realizada a desinfecção com o cloro, sendo eficaz na redução da carga microbiana do esgoto, inclusive das bactérias resistentes aos principais antimicrobianos. Entretanto há a necessidade de avaliar o impacto ambiental que a presença desta substância possa causar ao longo do tempo, mesmo que hajam benefícios inegáveis em sua utilização e que o cloro tende a se ligar à matéria orgânica.

7. CONCLUSÕES

- Foram detectadas bactérias resistentes e multirresistentes à variados antimicrobianos. Entre elas, *Aeromonas* sp., BGN-NF e enterobactérias nas duas ETE analisadas.
- As *Aeromonas* sp. foram os micro-organismos mais frequentes nas amostras de esgoto e com um perfil de sensibilidade a antimicrobianos de resistência reduzida sugerindo origem ambiental;
- O isolamento de BGN-NF apresentou a predominância dos gêneros *Acinetobacter* e *Pseudomonas*, com resistência aumentada às cefalosporinas e aos carbapenêmicos.
- MRSA e VRE não foram detectados nas amostras de esgoto, tanto no tratado como no bruto;
- As enterobactérias apresentaram um perfil elevado de não-sensibilidade (resistente + intermediário) à maioria dos antimicrobianos testados, com destaque para as cefalosporinas de terceira geração, quinolonas e carbapenêmicos;
- Os testes fenotípicos foram eficazes na triagem dos mecanismos de resistência aos carbapenêmicos, sendo compatíveis com os testes moleculares;
- O gene *blaKPC* foi o único detectado entre os pesquisados e reflete a predominância deste nas enterobactérias em nosso país;
- A enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos foram isoladas somente no esgoto bruto e tratado da ETE INI, ratificando a origem hospitalar destes micro-organismos;
- A ETE INI contém uma contagem superior de bactérias no esgoto bruto em relação ao esgoto bruto da ETE Central. Ainda assim, a eficácia do tratamento na remoção de bactérias nos efluentes tratados ainda é maior na ETE INI, devido as especificidades do processo.
- Estudos posteriores serão necessários para obtenção de dados mais robustos e também sobre o impacto ambiental. Assim como, o desenvolvimento de novos tratamentos que assegurem o não lançamento de bactérias resistentes a antimicrobianos nos corpos aquáticos receptores.

8. DIFICULDADES/SOLUÇÕES ENCONTRADAS E PERSPECTIVAS FUTURAS

- A pandemia por COVID-19 foi o principal fator limitador do estudo, impedindo o prosseguimento da pesquisa em fluxo normal, dentro do cronograma. A ETE Central somente permitiu as coletas em meados de 2021, retardando a finalização em tempo hábil da tese dentro dos objetivos antes delimitados. Por outro lado, tivemos a oportunidade de adicionar ao estudo outra ETE (ETE INI), que por seu perfil nosocomial, acabou tornando-se crucial para o estudo.
- Existiram limitações de materiais, técnicas e outros recursos, que implicaram em dificuldades de realização dos experimentos necessários para a pesquisa molecular que seria realizada no âmbito do DCB/ENSP. Entretanto, esse problema foi contornado através das colaborações realizadas entre laboratórios.
- As identificações bioquímicas de algumas espécies bacterianas foram verdadeiros desafios, assim como a falta de parâmetros padronizados de sensibilidade microbiana para algumas espécies. A confirmação da identificação por método automatizado foi de suma importância para a melhora da acurácia desta etapa.
- A partir deste trabalho, estreitamos as colaborações com as ETE da FIOCRUZ, criando a possibilidade de novas propostas de trabalho nesta linha de pesquisa.
- Os isolados positivos fenotipicamente para carbapenemases e negativos para os genes pesquisados, foram criopreservados para futuramente submetermos à pesquisa de outros genes não contemplados neste estudo.
- Com base nos achados deste trabalho, pretende-se realizar posteriormente, um estudo ambiental mais aprofundado, relacionado ao tratamento microbiológico diferenciado de cada ETE e o impacto causado por ele no corpo hídrico receptor.

9. RECOMENDAÇÕES

Das ETE pesquisadas no presente estudo, a ETE INI apresenta maior risco biológico pela presença das bactérias Gram-Negativas resistentes aos carbapenêmicos. Em contrapartida, o tratamento realizado na estação INI é fechado, minimizando o contato com o esgoto propriamente dito. Enquanto que na Estação Central, há a geração de muitos aerossóis por conta do fato que a maioria dos processos ocorrem expostos ao ambiente, às vezes limitados apenas por grades.

Qualquer uma das bactérias resistentes, encontradas nas ETE pode provocar infecções nos colaboradores expostos ao esgoto de ambas as estações. Tais micro-organismos podem causar principalmente infecções gastrointestinais, desencadeando diarreia como principal sintoma. Então, além da eficácia da estação em eliminar essas bactérias, a segurança do pessoal ao operar e manipular direta ou indiretamente qualquer material é de suma importância.

É imprescindível reforçar o uso de Equipamentos de Proteção Individual (principalmente óculos de proteção devido aos aerossóis), assim como a observação das práticas de Biossegurança (modo de manipular amostras, desinfecção de superfícies e a própria higienização do operador após cada processo).

REFERÊNCIAS

- ABRANTES, J. A.; NOGUEIRA, J. M. R. Utilização de testes fenotípicos para a pesquisa de carbapenemases em enterobactérias: uma ferramenta para orientação clínica. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**. v.49, p. 240-244, 2017.
- ACOSTA, A. C.; COSTA, M. M.; JUNIOR, J. W. P.; MOTA, R. A. Fatores de virulência de *Staphylococcus aureus*. **Medicina Veterinária (UFRPE)**, v.11, n.4, p. 252-269, 2017.
- ADEOLU, M.; ALNAJAR, S.; NAUSHAD, S.; GUPTA R. S. Genome-based phylogeny and taxonomy of the ‘*Enterobacteriales*’: Proposal for enterobacterales ord. nov. divided into the families *Enterobacteriaceae*, *Erwiniaceae* fam. nov., *Pectobacteriaceae* fam. nov., *Yersiniaceae* fam. nov., *Hafniaceae* fam. nov., *Morganellaceae* fam. nov., and *Budviciaceae* fam. Nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 66, p. 5575–5599, 2016.
- AGUIAR, E. C. D. C. **Resistência de cepas Gram-negativas a antibacterianos em efluentes de hospitais públicos e na estação de tratamento de esgoto de Boa Vista-RR**. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais - Recursos Naturais). Universidade Federal de Roraima. Roraima, 2020.
- ALGAMMAL, A.M.; HETTA, H.F.; ELKELISH, A.; ALKHALIFAH, D.H.H.; HOZZEIN, W.N.; BATIHA, G.E.S.; EL NAHHAS, N.; MABROK, M.A. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): one health perspective approach to the bacterium epidemiology, virulence factors, antibiotic-resistance, and zoonotic impact. **Infection and Drug Resistance**. v. 13, p. 3255-3265, 2020.
- ALVES, F. C. B. **Mecanismos de ação da atividade antibacteriana da nisina e em combinações com antimicrobianos tradicionais sobre *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) e *Pseudomonas aeruginosa***. Tese (Doutorado em Biologia Geral e Aplicada – IBB). UNESP. São Paulo, 2018.
- AMBLER, R.P. The structure of beta-lactamases. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**. v. 289, n. 1036, p. 321-331, 1980.
- AMARO, A.; SILVA, A.; MUSTAFÁ, A.; COSTA, C.; MORTOZA, A.; OLIVEIRA, I. A importância de uma boa gestão de resíduos sólidos: Case report. **Facit Business and Technology Journal**. v. 8, n. 2, p. 45-52, 2018.
- ARRUDA, J.J.A.; PILETTI, N. **Toda a História: História Geral e História do Brasil**. São Paulo: Ática, 13^a ed., 2007.
- ANTONIO, N.S.; OLIVEIRA, A.C.; CANESINI, R.; ROCHA, J.R. Mecanismos de resistência bacteriana. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**. v.7, n.12, 2009.
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Detecção e Identificação de Bactérias de Importância Clínica** (Manual-Módulo V). 2005.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Nota técnica nº 01/2013 – Medidas de prevenção e controle de infecções por enterobactérias multirresistentes.** Brasília, 2013.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Plano Nacional para a prevenção e o controle de Resistência Microbiana nos Serviços de Saúde.** Brasília, 2017.

APHA, AWWA, WEF. **Standard Methods for the examination of water and wastewater.** Washington, DC. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Pollution Control Federation, 23th ed., 2017.

BAKER, C.; GARDNER, C. Diagnosis Suspected by Mechanism of Injury: Soft tissue Infection Due to *Aeromonas hydrophila* and *Enterobacter asburiae* Following Human Wastewater Exposure. **American Journal of Emergency Medicine.** p. 31-33, 2021.

BAQUERO, F. From pieces to patterns: evolutionary engineering in bacterial pathogens. **Nature Reviews Microbiology.** v.2, n.6, p. 510-518, 2004.

BAQUERO, F.; MARTÍNEZ, J.L.; CANTÓN, R. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. **Current Opinion in Biotechnology.** v.19, n.3, p. 260-265, 2008.

BATOOL, A.; BAIG, H.; USMAN, Q.M. Extended spectrum- β -lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* causing urinary tract infection. **African Journal of Microbiology Research** v.10, p. 1775-1778, 2016.

BATISTA, A. C. C. A. ***Klebsiella Pneumoniae: Análise Fenotípica e Molecular dos Mecanismos de Resistência KPC e NDM em um Hospital de Foz do Iguaçu, PR.*** Dissertação (Mestrado em Ciências). Universidade Federal da Integração Latino-Americana. Foz do Iguaçu, 2020.

BIOMÉRIEUX. Manual VITEK 2: **Informação dos produtos dos sistemas VITEK® 2 Systems,** 2013.

BONIN, M. C. B.; PENTEADO, A.L.; QUEIROZ, S.C.N. Avaliação da atividade antagonista de bactérias ácido lácticas e seus metabólitos frente a patógenos de origem animal. **Brazilian Journal of Development.** v. 5, n. 10, p. 18511-18525, 2019.

BRADFORD, P.A. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. **Clinical Microbiology Reviews.** v.14, n.4, p. 933-951, 2001.

BRAGA, B.; HESPANHOL, I.; CONEJO, J.G. L. **Introdução à Engenharia Ambiental.** São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Manual de gerenciamento de resíduos de serviços de saúde.** Brasília, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Manual de Saneamento /** Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde. – 4. ed. – Brasília, 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância de Doenças e Agravos não Transmissíveis e Promoção da Saúde. **Saúde Brasil 2018. Uma análise de situação de saúde e das doenças e agravos crônicos: desafios e perspectivas**. Brasília, 2019.

BrCAST - **Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing**, 2019.
<http://brcast.org.br>

BUSH, K.; JACOBY, G.A.; MEDEIROS, A.A. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.39, n.6, p. 1211-1233, 1995.

BUSH, K.; BRADFORD, P.A. Epidemiology of β -Lactamase-Producing Pathogens. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 33, n. 2, 2020.

CABEÇO, A.L.B.; COLOMBO, T. Bactérias causadoras de infecções urinárias e seu perfil de resistência aos antimicrobianos. **Journal of the Health Sciences Institute**. v.37, n.2, p. 113-8, 2019.

CAIRNS, J.; RUOKOLAINEN, L.; HULTMAN, J.; TAMMINEN, M.; VIRTA, M.; HILTUNEN, T. Ecology determines how low antibiotic concentration impacts community composition and horizontal transfer of resistance genes. **Communications Biology**. v. 1, p. 35, 2018.

CAMPOS, A.; LOPES, M. S.; CARVALHEIRA, A.; BARBOSA, J.; TEIXEIRA, P. Survival of clinical and food *Acinetobacter* spp. isolates exposed to different stress conditions. **Food Microbiology**. v.77, p. 202-207, 2019.

CAMPOS, J.R. **Tratamento de esgotos sanitários por processo anaeróbio e disposição controlada no solo**. Rio de Janeiro: ABES/PROSAB, 1999.

CANGUSSU, E. W. S. Importância do *Acinetobacter baumannii* no ambiente hospitalar. **Journal of Tropical Biodiversity and Biotechnology**. v.8, n.1, p. 041-046, 2020.

CASTRO, A.C.O.; OLIVEIRA, T.C.; VENTURA, M.V.A.; TAVARES, G.G. Análises da água e sua contaminação por micro-organismos influenciando a viabilidade para o consumo humano. **Cientific@ - Multidisciplinary Journal**. v.5, p. 4-13, 2018.

CEBALLOS, B.S.O.; DINIZ, C.R. **Técnicas de microbiologia sanitária e ambiental**. Campina Grande: EDUEPB. 324 p, 2017.

CHEN, C.; CHEN, L.; ZHANG, Y.; CUI, C. Y.; WU, X. T.; HE, Q.; SUN, J. Detection of chromosome-mediated tet (X4)-carrying *Aeromonas caviae* in a sewage sample from a chicken farm. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v.74, n.12, p. 3628-3630, 2019.

CLSI. **Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**. 25th Informational Supplement. CLSI document M100-S25. Wayne, PA, USA, 2015.

CLSI. **Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for**

antimicrobial susceptibility testing. CLSI/NCCLS M100–29th ed. Wayne, PA, USA, 2019.

COQUE, T.M.; OLIVER, A.; PÉREZ-DÍAZ, J.C.; BAQUERO, F.; CANTÓN, R. Gene's encoding TEM-4, SHV-2 and CTX-M10 extended-spectrum beta-lactamases are carried by multiple. *Klebsiella pneumoniae* clones in a single hospital (Madrid, 1989 to 2000).

Antimicrobial Agents and Chemotherapy. v.46, n.2, p. 500-510, 2002.

CORDEIRO, K. S.; GALENO, L. S.; MENDONÇA, C. J. S.; CARVALHO, I. A.; COSTA, F. N. Ocorrência de bactérias patogênicas e deteriorantes em sashimi de salmão: avaliação de histamina e de susceptibilidade a antimicrobianos. **Brazilian Journal of Food Technology** [online]. v. 23, 2020.

CORREIA, R.F. **Dados das ETE Fiocruz.** Mensagem recebida por renatah.fonseca@fiocruz.br em 03 de novembro de 2021. Acesso em: 01/12/2021.

COSTA, G.A.; HOFER, E. **Isolamento e identificação de Enterobactérias.** Monografia, Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 1972.

CUNHA, M.A.; SILVA, M.R. Métodos de detecção de micro-organismos indicadores. **Saúde & Ambiente em Revista.** v.1, n.1, p. 9-13, 2006.

DAMER, J.; OLIVEIRA, F.; RAZIA, L.; BOTTEGA, A.; SILVA, D.; RIGHI, R.A.; HÖRNER, R. Fasciite necrosante por *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus epidermidis* – relato de caso. **ConScientiae Saúde.**v.14, n.3, 2015.

DA SILVA, R. P. P.; MANÇANO, S. M. C. N.; PICÃO, R. C. Cronologia da emergência global de carbapenemases em bacilos Gram-negativos. **Revista Saber Digital.** v.10, n.2, p. 43-61, 2018.

DA SILVA, T. M. F.; CIPRIANO FILHO, A. M. A.; DA SILVA SOUSA, Z.; RODRIGUES, J. A. L.; DA SILVA, N. V. F.; DE FREITAS FILHO, M. M.; DA SILVA, B. N. Infecções hospitalares associadas à bacilos Gram-negativos não fermentadores em unidade de terapia intensiva: revisão narrativa. **Revista Eletrônica Acervo Saúde.** v.13, n. 3, p. e6685-e6685, 2021.

DAVISON, J. Genetic exchange between bacteria in the environment. **Plasmid.** v.42, n.2, p. 73-91, 1999.

DE MORAES SILVA, T. M.; MAGALHÃES, C. B. T.; DE OLIVEIRA, V. L. C.; FRANCO, V. M. D. Formação de biofilme em infecções pulmonares por *Pseudomonas aeruginosa*: uma revisão literária. **Revista Multidisciplinar em Saúde.** v. 2, n. 2, p. 37-37, 2021.

DE PAULA, S. B.; CAYO, R.; STRELING, A. P.; NODARI, C. S.; MATOS, A. P.; PERUGINI, M. R. E.; YAMADA-OGATTA, S. F. Detection of *bla*VIM-7 in an extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate belonging to ST1284 in Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.** v. 89, p. 80-82, 2017.

DE SOUSA, A. B. A.; RAMALHO, F. L.; CAMARGO, B. Prevalência de Infecções nosocomiais ocasionadas por *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase (KPC) em indivíduos hospitalizados. **Brazilian Journal of Health Review.** v.3, n.2, p. 1915-1932,

2020.

DIENSTMANN, R.; PICOLI, S.U.; MEYER, G.; SCHENKEL, T.; STEYER, J. Avaliação fenotípica da enzima *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) em *Enterobacteriaceae* de ambiente hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v.46, n.1, p. 23-27, 2010.

DO NASCIMENTO, A. C.; REICHARDT, V. T.; DE MELO VASCO, J. F.; RODRIGUES, L. S. Testes fenotípicos para a detecção e diferenciação de carbapenemases em *Enterobacterales* isoladas de hemoculturas de pacientes oncológicos. **Cadernos da Escola de Saúde**, v.19, n.1, p. 40-49, 2019.

DOS SANTOS, M.A.; DE PAIVA, I. C.; DA SILVA ANDRADE, E. G. *Enterococcus* Resistente à Vancomicina (VRE): perfil geral. **Revista JRG de Estudos Acadêmicos**. v. 4, n. 8, p. 127-139, 2021.

DZIDIC, S.; BEDEKOVIC, V. Horizontal gene transfer-emerging multidrug resistance in hospital bacteria. **Acta Pharmacologica Sinica**. v.24, n.6, p. 519-526, 2003.

EID, H.; HANAFY, A. S. Antibacterial resistance of *Aeromonas* species isolated from fish and water of Manzala Lake. **Suez Canal Veterinary Medical Journal**. v.24, n.2, p. 217-230, 2019.

EUCAST - **European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing**. 2019.
<http://www.eucast.org>

FACCIOLÀ, A.; VIRGA, A.; GIOFFRÈ, M. E.; LAGANÀ, P. Evaluation of Antibiotic Resistance in Bacterial Strains Isolated from Sewage of Slaughterhouses Located in Sicily (Italy). **International journal of environmental research and public health**. v.18, n.18, p. 9611, 2021.

FANELLI, F.; CAPUTO, L.; QUINTIERI, L. Phenotypic and genomic characterization of *Pseudomonas putida* ITEM 17297 spoiler of fresh vegetables: Focus on biofilm and antibiotic resistance interaction. **Current research in food science**. v.4, p. 74-82, 2021.

FAUZI, N. N. F. N. M.; HAMDAN, R. H.; MOHAMED, M.; ISMAIL, A.; ZIN, A. A. M.; MOHAMAD, N. F. A. Prevalence, antibiotic susceptibility, and presence of drug resistance genes in *Aeromonas* spp. isolated from freshwater fish in Kelantan and Terengganu states, Malaysia. **Veterinary World**. v.14, n.8, p. 2064, 2021.

FERREIRA, J. C. **Bactérias potencialmente resistentes a antibióticos, desinfetantes e radiação ultravioleta, isoladas de esgoto hospitalar e esgoto sanitário**. (Dissertação) Mestrado em Engenharia Ambiental. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2015.

FORBES, B.A.; SAHM, D.F.; WEISSFELD, A.S. **Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology**. 14 ed. St. Louis: Mosby, 2017.

FRANCO-MONSREAL, J.; LARA-ZARAGOZA, E. B.; VILLA-RUANO, N.; MOTA-MAGAÑA, L.; HERNÁNDEZ-GÓMEZ, J. R.; DEL SOCORRO SERRALTA-PERAZA, L. E. *Aeromonas hydrophila* en alimentos marinos de origen animal de establecimientos de

Puerto Ángel, Oaxaca, México. **Revista Salud Quintana Roo**. v.9, n.33, p. 4-10, 2022.

FREITAS, F. S. **Caracterização genética e genômica de *Helicobacter pylori***. Dissertação (Mestrado em Biologia Computacional e Sistemas) Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2015.

FREITAS, A. C. S.; BENZ, C. F.; NETO, O. C. Infecções sanguíneas em ambiente hospitalar e a resistência bacteriana. **Unesc em Revista**, v.5, n.1, p. 16-24, 2021

GALVÃO JUNIOR, A.C.; NISHIO, S.R.; BOUVIER, B.B.; TUROLLA, F.A. Marcos regulatórios estaduais em saneamento básico no Brasil. **Revista de Administração Pública**. v.43, n.1, p. 207-227, 2009.

GARBATI, M. A.; AL GODHAIR, A. I. The growing resistance of *Klebsiella pneumoniae*; the need to expand our antibiogram: case report and review of the literature. **African Journal of Infectious Diseases** v. 7, n. 1, p. 8–10, 2013.

GARCIA-CLEMENTE, M.; DE LA ROSA, D.; MÁIZ, L.; GIRÓN, R.; BLANCO, M.; OLVEIRA, C.; MARTINEZ-GARCÍA, M. A. Impact of *Pseudomonas aeruginosa* infection on patients with chronic inflammatory airway diseases. **Journal of clinical medicine**. v.9, n.12, p 3800, 2020.

GEORGAKOPOULOU, V. E.; AVRAMOPOULOS, P.; PAPALEXIS, P.; BITSANI, A.; DAMASKOS, C.; GARMPI, A.; SPANDIDOS, D. A. Exacerbation of bronchiectasis by *Pseudomonas putida* complicating COVID-19 disease: A case report. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v.22, n.6, p. 1-4, 2021.

GIATTI, L.L. Reflexões sobre água de abastecimento e saúde pública: um estudo de caso na Amazônia brasileira. **Saúde e Sociedade**. v.16, n.1, p. 134-144, 2007.

GIRLICH, D.; GROSPERRIN, V.; NAAS, T.; DORTET, L. CHROMagar™ ESBL/mSuperCARBA bi-plate medium for detection of ESBL- and carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* from spiked stools. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. v.95, n.2, p. 107-112, 2019.

GONZÁLEZ-ROMERO, A. C.; GUAMÁN-CHABLA, M. G.; CORDOVEZ-MARTÍNEZ, M. DEL C.; MARTÍNEZ -DURAN, E. E. Antimicrobial susceptibility profiles of bacteria isolated from agricultural crops in the Chambo river basin. **Perfiles**. v.1, n.27, p. 39-48, 2022.

GRIM, C.J.; KOZLOVA, E.V.; PONNUSAMY, D.; FITTS, E.C.; SHA, J.; KIRTLEY, M.L.; VAN LIER, C.J.; TINER, B.L.; EROVA, T.E.; JOSEPH, S.J.; READ, T.D.; SHAK, J.R.; JOSEPH, S.W.; SINGLETARY, E.; FELLAND, T.; BAZE, W.B.; HORNEMAN, A.J.; CHOPRA, A.K. Functional genomic characterization of virulence factors from necrotizing fasciitis-causing strains of *Aeromonas hydrophila*. **Applied and Environmental Microbiology**. v.80, n.14, p. 4162-4183, 2014.

GUARDABASSI, L.; PETERSEN, A.; OLSEN, J.E.; DALSGAARD, A. Antibiotic Resistance in *Acinetobacter* spp. Isolated from Sewers Receiving Waste Effluent from a Hospital and a Pharmaceutical Plant. **Applied and Environmental Microbiology**. v.64, n.9, p. 3499-3502, 1998.

- HARDI, E. H.; NUGROHO, R. A.; KUSUMA, I. W.; SUWINARTI, W.; SUDARYONO, A.; ROSTIKA, R. Borneo herbal plant extracts as a natural medication for prophylaxis and treatment of *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas fluorescens* infection in tilapia (*Oreochromis niloticus*). **F1000Research**. v.7, 2018.
- HARRIS, J. D.; COON, C. M.; DOHERTY, M. E.; MCHUGH, E. A.; WARNER, M. C.; WALTERS, C. L.; STEEL, J. J. Engineering and characterization of dehalogenase enzymes from *Delftia acidovorans* in bioremediation of perfluorinated compounds. **Synthetic and Systems Biotechnology**. v.7, n.2, p. 671-676, 2022.
- HASMAN, H.; MEVIUS, D.; VELDMAN, K.; OLESEN, I.; AARESTRUP, F.M. β -lactamases among extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-resistant *Salmonella* from poultry, poultry products and human patients in The Netherlands. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v.56, p. 115-121, 2005.
- HASSUNA, N. A.; DARWISH, M. K.; SAYED, M.; IBRAHEM, R. A. Molecular epidemiology and mechanisms of high-level resistance to meropenem and imipenem in *Pseudomonas aeruginosa*. **Infection and Drug Resistance**. v.13, p. 285, 2020.
- HERNÁNDEZ-GARCÍA, M.; LEÓN-SAMPEDRO, R.; PÉREZ-VISO, B.; MOROSINI, M.I.; LÓPEZ-FRESNEÑA, N.; DÍAZ-AGERO, C.; COQUE, T.M.; RUIZ-GARBAJOSA, P.; CANTÓN, R. First report of an OXA-48- and CTX-M-213-producing *Kluyvera* species clone recovered from patients admitted in a university hospital in Madrid, Spain. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.62, n.11, p. 01238-18, 2018.
- HIGUITA-GUTIÉRREZ, L. F.; JIMÉNEZ-QUICENO, J. N. Brotes hospitalarios de bacterias resistentes a colistina: revisión sistemática de la literatura. **Infectio**. v.21, n.4, p. 214-222, 2017.
- HORNSEY, M.; PHEE, L.; WOODFORD, N.; TURTON, J.; MEUNIER, D.; THOMAS, C.; WAREHAM, D.W. Evaluation of three selective chromogenic media, CHROMagar ESB, CHROMagar CTX-M and CHROMagar KPC, for the detection of *Klebsiella pneumoniae* producing OXA-48 carbapenemase. **Journal of Clinical Pathology**. v. 66, p. 348–350, 2013.
- HSIAO, P. K.; CHEN, W. T.; CHANG, K. C.; KE, Y. J.; KUO, C. L.; TSENG, C. C. Performance of CHROMagar *Staph aureus* and CHROMagar MRSA for Detection of Airborne Methicillin-Resistant and Methicillin-Sensitive *Staphylococcus aureus*. **Aerosol Science and Technology** v.46, p. 297–308, 2012.
- HSIAO, P. K.; CHENG, C. C.; CHANG, K. C.; YIIN, L. M.; HSIEH, C. J.; TSENG, C. C. Performance of CHROMagar VRE Medium for the Detection of Airborne Vancomycin-Resistant/Sensitive *Enterococcus* Species. **Aerosol Science and Technology**. v.48, p. 173–183, 2014.
- INSTITUTO BUTANTAN. **Guia práctico de descarte de resíduos**. 1ª ed. São Paulo, 2014.
- IOANNOU, P.; MAVRIKAKI, V.; KOFTERIDIS, D. P. Infective endocarditis by *Acinetobacter* species: A systematic review. **Journal of Chemotherapy**. v.33, n.4, p. 203-215, 2021.

ITB - INSTITUTO TRATA BRASIL. Portal Eletrônico. Disponível em <http://www.tratabrasil.org.br/saneamento-no-brasil>>. Acesso em Set 2018.

JANDA, J. M.; ABBOTT, S. L. The Genus *Aeromonas*: Taxonomy, Pathogenicity, and Infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v.23, n.1, p. 35–73, 2010.

JANDA, J. M.; ABBOTT, S. L. The Changing Face of the Family Enterobacteriaceae (Order: “*Enterobacterales*”): New Members, Taxonomic Issues, Geographic Expansion, and New Diseases and Disease Syndromes. **Clinical microbiology Reviews**. v.34, n.2, p. e00174-20, 2021.

JARLIER, V.; NICOLAS, M.H.; FOURNIER, G.; PHILIPPON, A. Extended broad-spectrum β -lactamases conferring transferable resistance to newer β -lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. **Reviews of Infectious Diseases**. v.10, n.4, p. 867-878, 1988.

KARAKONSTANTIS, S.; GIKAS, A.; ASTRINAKI, E.; KRITSOTAKIS, E. I. Excess mortality due to pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections in hospitalized patients. **Journal of Hospital Infection**. v.106, n.3, p. 447-453, 2020.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER PC, WINN J.R.W.C. **Diagnóstico Microbiológico - Texto e Atlas Colorido**. 7 ed. Rio de Janeiro: Medsi; 2018.

KOURTIS, A. P.; HATFIELD, K.; BAGGS, J.; MU, Y.; SEE, I.; EPSON, E.; NADLE, J.; KAINER, M. A.; DUMYATI, G.; PETIT, S.; RAY, S. M.; HAM, D.; CAPERS, C.; EWING, H.; COFFIN, N.; MCDONALD, L. C.; JERNIGAN, J.; CARDO, D. Vital Signs: Epidemiology and Recent Trends in Methicillin-Resistant and in Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* Bloodstream Infections - United States. **Morbidity and Mortality Weekly Report**. v.68, n.9, p. 214-219, 2019.

KÜMMERER, K. Antibiotics in the aquatic environment - A review - Part I. **Chemosphere**. v.75, n.4, p. 417-434, 2009.

LEE, K.; CHONG, Y.; SHIN, H.B.; KIM, Y.A.; YONG, D.; YUM, J.H. Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo- β -lactamase producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. **Clinical Microbiology and Infection**. v.7, n.2, p. 88-91, 2001.

LEWIS, K. Persister cells. **Annual Review of Microbiology**. v.64, p. 357-72, 2010.

LI, Y.; LUO, L.; XIAO, Z.; WANG, G.; LI, C.; ZHANG, Z.; ZHOU, Y.; ZHANG, L. Characterization of a Carbapenem-Resistant *Kluyvera cryocrescens* Isolate Carrying Blandm-1 from Hospital Sewage. **Antibiotics**. v.8, n.3, p.149, 2019.

LIMA, M.M. DE S.; FERNANDES, D.G.G., DE OLIVEIRA, E.A.; PINHEIRO, M.P.; FERREIRA, D.G.; ZAHNER, V.; CHAGAS, T.P.G.; DE MENDONÇA-SOUZA, C.R.V. Detecção de *Enterobacterales* produtoras de carbapenemases em pacientes colonizados, atendidos em um Hospital Universitário. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**. v.13, n.2, p. 10, 2021.

LIMA, N.T.; GERSCHMAN, S.; EDLER, F.C.; SUÁREZ, J.M. (Orgs.). **Saúde e Democracia – História e Perspectivas do SUS**. Rio de Janeiro. Ed. Fiocruz, 2015.

LIMA, P. M. **Caracterização genética de isolados clínicos e ambientais de *Klebsiella pneumoniae***. Dissertação (Mestrado em Biologia Parasitária) – Instituto Oswaldo Cruz, 2011.

LINTON, K.B.; RICHMOND, M.H.; BEVAN, R.; GILLESPIE, W.A. Antibiotic resistance and R factors in coliform bacilli isolated from hospital and domestic sewage. **Journal of Medical Microbiology**. v.7, p. 91-103, 1974.

LIU, X.; XIANG, L.; YIN, Y.; LI, H.; MA, D.; QU, Y. Pneumonia caused by *Pseudomonas fluorescens*: a case report. **BMC Pulmonary Medicine**. v.21, n.1, p. 1-6, 2021.

LIVERMORE, D.M. Mechanisms of resistance to β -lactam antibiotics. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**. v.78, p. 7-16. 1991.

LIVERMORE, D.M.; WOODFORD, N. The beta-lactamase threat in *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. **Trends in Microbiology**. v.14, n.9, p. 413-420, 2006.

LOFRANO, G.; BROWN, J. Wastewater management through the ages: a history of mankind. **Science of the Total Environment**. v.408, n.22, p. 5254-5264, 2010.

LOPES, T.R.; COSTA JR.I.L.; PERIOTTO, F.; PLETSCH, A.L. Antibiotic resistance in *E. coli* isolated in effluent from a wastewater treatment plant and sediments in receiver body. **International Journal of River Basin Management**. v. 14, n. 4, p. 441-445, 2016.

LORENZONI, V. V.; RUBERT, F. C.; RAMPELOTTO, R. F.; HORNER, R. Increased antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae* from a University Hospital in Rio Grande do Sul, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.51, n.5, p. 676-679, 2018.

LUZ, M.M.A.V.R.M.R. **Isolados clínicos de *Enterobacteriaceae*, da comunidade, produtores de β -lactamases de espectro alargado**. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas) - Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, 2008.

MACHADO, E.C.; LEAL C.D.; COELHO B.L.; CHERNICHARO, C.A.L.; ARAÚJO, J. C. Detecção e quantificação de bactérias resistentes aos antibióticos ampicilina e cloranfenicol em estações de tratamento de esgoto doméstico. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**. v.25, n.6, 2020.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. 14 ed. São Paulo: Pearson/Prentice Hall, 2016.

MAESTRI, G.; SCHMELING, T. B.; VALCARENGHI, D.; DE PAULA LEMOS, M. Quantificação de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e mecanismos de resistência nas mãos de manipuladores de alimentos em UANS hospitalares em SC. **Disciplinarum Scientia| Saúde**. v.21, n.1, p. 91-105, 2020.

MAGIORAKOS, A. P.; SRINIVASAN, A.; CAREY, R. B.; CARMELI, Y.; FALAGAS, M.

E.; GISKE, C. G.; MONNET, D. L. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical microbiology and infection**. v.18, n.3, p. 268-281, 2012.

MAILAFIA, S.; NABILAH, B.; OLABODE, H. O. K. Phenotypic Characterization of *Aeromonas hydrophila* Isolates in Fresh Water Fishes in FCT Using Microbact™ GNB 24E Identification Kit. **Open Access Library Journal**. v.8, n.1, p. 1, 2021.

MARSON, P.G.; RODRIGUES NEPOMUCENO, V.; EUGENIO, F.; NEVES, T.N.; GONTIJO DA SILVA, M.; PONTOJA SOARES, M.; MUNDIM, A.P. Associação entre biofilme bucal e aspirado traqueal em pacientes com pneumonia associada à ventilação mecânica. **Revista Cereus**. v.12, n.3, p. 272-288, 2020.

MARTINEZ, J.L.; BAQUERO, F. Mutation Frequencies and Antibiotic resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.44, n.7, p. 1771-1777, 2000.

MARTINS, J. C. L. **Deteção e caracterização molecular de isolados de enterobactérias resistentes a antibióticos em produtos frescos prontos a consumir**. Dissertação (Mestrado em Segurança Alimentar) Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, 2021.

MAYER, C.; ROMERO, M.; LÓPEZ-MARTÍN, M.; MURAS, A.; OTERO, A. Quorum Sensing in *Acinetobacter* Virulence. **Quorum Sensing: Microbial Rules of Life**. P. 115-137, 2020.

MEIRA, I. A.; SILVA, T. C.; FORTUNA, J. L. Pesquisa de coliformes na água de consumo das creches da rede municipal de ensino de Teixeira de Freitas, BA. **Higiene Alimentar**. v.32, n.278/279, p. 92-96, 2018.

MEIRELLES-PEREIRA, F.; PEREIRA, A.M.S.; SILVA, M.C.G.; GONÇALVES, V.D.; BRUM, P.R.; CASTRO E.A.R.; PEREIRA, A.A.; PEREIRA, J.A.A. Ecological aspects of the antimicrobial resistance in bacteria of importance to human infections. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.33, n.4, p. 287-293, 2002.

MENDONÇA, M. H. M.; ROSENO, S. A. M.; CACHOEIRA, T. R. L.; SILVA, A. F. S.; JÁCOME, P. R. L. A.; JÁCOME JÚNIOR, A. T. Análise bacteriológica da água de consumo comercializada por caminhões-pipa. **Revista Ambiente & Água**. v.12, n.3, p. 468-475, 2017.

MESA, R.J.; BLANC, V.; BLANC, A.R.; CORTÉS, P.; GONZÁLEZ, J.J.; LAVILLA, S.; MIRÓ, E.; MUNIESA, M.; SACO, M.; TÓRTOLA, M.T.; MIRELIS, B.; COLL, P.; LLAGOSTERA, M.; PRATS, G.; NAVARRO, F. Extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in different environments (humans, food, animal farms and sewage). **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v.58, n.1, p. 211-215, 2006.

MIMICA, M. J.; MENDES, C. M. Diagnóstico laboratorial da resistência à oxacilina em *Staphylococcus aureus*. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v.43, n.6, p. 399-406, 2007.

MONTEIRO, J.; SANTOS, A.F.; ASENSI, M.D.; PEIRANO, G.; GALES, A.C. First Report of KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae* Strains in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.53, n.1, p. 333-334, 2009.

MORAES, L.R.S. **Conceitos de saúde e saneamento**. Salvador: DHS/UFBA, 1993.

MUELA, A.; POCINO, I.; ARANA, J.; JUSTO, J.I.; IRIBERRI, J.; BARCINA, I. Effects of growth phase and parental cell survival in river water on plasmid transfer between *Escherichia coli* strains. **Applied and Environmental Microbiology**. v.60, n.12, p. 4273-4278, 1994.

MULCAHY, L.R.; BURNS, J.L.; LORY, S.; LEWIS, K. Emergence of *Pseudomonas aeruginosa* strains producing high levels of persister cells in patients with cystic fibrosis. **Journal of Bacteriology**. v.192, n.23, p. 6191-9, 2010.

MULVEY, M.R.; SOULE, G.; BOYD, D.; DEMCZUK, W.; AHMED, R. Multi-provincial *Salmonella* Typhimurium case control study group. Characterization of the first extended-spectrum beta-lactamase-producing *Salmonella* isolate identified in Canada. **Journal of Clinical Microbiology**. v.41, p. 460-462, 2003.

MUNIR, M.; WONG, K.; XAGORARAKI, I. Release of antibiotic resistant bacteria and genes in the effluent and biosolids of five wastewater utilities in Michigan. **Water Research**. v.45, n.2, p. 681- 693, 2011.

MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; JORGENSEN, J.H.; PFALLER, M.A.; YOLKEN, R.H. **Manual of Clinical Microbiology**. 8 ed. Washington: ASM Press, 2017.

NAAS, T.; CUZON, G.; VILLEGAS, M.V.; LARTIGUE, M.F.; QUINN, J.P.; NORDMANN, P. Genetic Structures at the Origin of Acquisition of the β -lactamase *bla*KPC Gene. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.52, n.4, p. 1257-1263, 2008.

NEVES, F. O.; MENDONÇA, F. Por uma leitura geográfico-cultural dos resíduos sólidos: reflexões para o debate na Geografia. **Cuadernos de Geografía: Revista Colombiana de Geografía**. v.25, n.1, p. 01-15, 2016.

NICOLETTI, A.G.; MARCONDES, M.F.; MARTINS, W.M.; ALMEIDA, L.G.; NICOLAS, M.F.; VASCONCELOS, A.T.; OLIVEIRA, V.; GALES, A. C. Characterization of BKC-1 class A carbapenemase from *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.59, n.9, p. 5159-5164, 2015.

NIEDERMAN, M.S. Impact of antibiotic resistance on clinical outcomes and the cost of care. **Critical Care Medicine**. v.29, n.4, p. N114–N120, 2000.

NOGUEIRA, J. M. R.; MIGUEL, L.F.S. Bacteriologia. IN: AMENDOEIRA *et al.* **Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratório de Saúde**. Vol IV 221-397, 2010.

NORDMANN, P.; CUZON, G; NAAS, T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. **The Lancet Infectious Diseases**. v.9, n.4, p. 228-236, 2009.

OLIVEIRA, R.G. Sentidos das Doenças Negligenciadas na agenda da Saúde Global: o lugar de populações e territórios. **Ciência & Saúde Coletiva**. v.23, n.7, p. 2291-2302, 2018.

OLIVEIRA, D. C. D. S., AZEVEDO, P. G. F. D., CAVALCANTI, L. A. P. Processos biológicos para o tratamento de efluentes: uma revisão integrativa. **Revista Brasileira de Gestão Ambiental e Sustentabilidade**. v.8, n.18, p. 397-415, 2021.

OMS – Organização Mundial da Saúde (WHO, World Health Organization/UNICEF). **Diarrhoea: why children are still dying and what can be done**, 2009.

ONU. State of World Population: **Unleashing the Potential of Urban Growth**. United Nations Population Fund, 2017.

OPAS - Organização Pan-Americana da Saúde. **Manual de Biossegurança Laboratorial**. Quarta Edição. Brasília, 2021.

OPLUSTIL, C. P. **Procedimentos básicos em microbiologia clínica**. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 2010.

PABLOS, M.; RODRÍGUEZ-CALLEJA, J.M.; SANTOS, J. A.; OTERO, A.; GARCÍALÓPEZ, M.L. Occurrence of motile *Aeromonas* in municipal drinking water and distribution of genes encoding virulence factors. **International Journal of Food Microbiology**. v.135, p.158–164, 2009.

PAIM, J.S. **Reforma Sanitária Brasileira – Contribuição para a compreensão e crítica**. Salvador: EDUFBA; Rio de Janeiro: FIOCRUZ. 2013.

PASTERAN, F.; MENDEZ, T.; GUERRIERO, L.; RAPOPORT, M.; CORSO, A. Sensitive Screening Tests for Suspected Class A Carbapenemase Production in Species of *Enterobacteriaceae*. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 47, n. 6, p. 1631–1639, 2009.

PATEL, D.; IQBAL, A. M.; MUBARIK, A.; VASSA, N.; GODIL, R.; SAAD, M.; MUDDASSIR, S. *Delftia acidovorans*: A rare cause of septic pulmonary embolism from catheter-related infection: Case report and literature review. **Respiratory Medicine Case Reports**. v.27, p. 100835, 2019.

PEIRANO, G.; SEKI, L.M.; PASSOS, V.L.V.; PINTO, M.C.F.G.; GUERRA, L.R.; ASENSI, M.D. Carbapenem-hydrolysing β -lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v.63, n.2, p. 265-268, 2009.

PEIXOTO, L.J.S.; SÁ, M.C.A.; GORDIANO, L.A.; COSTA M.M. *Aeromonas* spp.: fatores de virulência e perfis de resistência a antimicrobianos e metais pesados. **Arquivos do Instituto Biológico**. v.79, n.3, p. 453-461, 2012.

PEREIRA, I.; DA COSTA, Y.; DE MORAES, W.; LAPORT, M.; ALVES, M.; PELLEGRINO, F. Ambiente marinho e resistência bacteriana aos antimicrobianos: impacto à saúde humana. **Acta Scientiae et Technicae**. v.7, n.2, p. 65-80, 2020.

PFALLER, M.A.; SEGRETI, J. Overview of the Epidemiological Profile and Laboratory Detection of Extended-Spectrum β -Lactamases. **Clinical Infectious Diseases**. v.42 (Suppl 4), p. S153-163, 2006.

PICÃO, R.C.; CARDOSO, J.P.; CAMPANA, E.H.; NICOLETTI, A.G.; PETROLINI, F.V.; ASSIS, D.M.; JULIANO, L.; GALES, A.C. The route of antimicrobial resistance from the hospital effluent to the environment: focus on the occurrence of KPC-producing *Aeromonas* spp. and *Enterobacteriaceae* in sewage. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. v.76, n.1, p. 80-5, 2013.

PULIDO BELTRÁN, J. A.; RODRÍGUEZ, X. A.; MÉNDEZ, I. A. Perfil de resistencia antimicrobiana en bacilos Gram negativos no fermentadores aislados en fuentes hídricas. **Revista Médica de Risaralda**. v.23, n.2, p. 38-42, 2017.

PULJKO, A.; MILAKOVIĆ, M.; KRIŽANOVIĆ, S.; KOSIĆ-VUKŠIĆ, J.; BABIĆ, I.; PETRIĆ, I.; MARAVIĆ, A.; JELIĆ, M.; UDIKOVIĆ-KOLIĆ, N. Prevalence of enteric opportunistic pathogens and extended-spectrum cephalosporin- and carbapenem-resistant coliforms and genes in wastewater from municipal wastewater treatment plants in Croatia. **Journal of Hazardous Materials**. v.427, p. 128155, 2022.

QUEENAN, A.M.; BUSH, K. Carbapenemases: the versatile β -lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**. v.20, n.3, p. 440-458, 2007.

RANGEL, K.; CHAGAS, T. P. G.; DE-SIMONE, S. G. *Acinetobacter baumannii* infections in times of COVID-19 pandemic. **Pathogens**. v.10, n.8, p. 1006, 2021.

REY, L. **Parasitologia**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.

RIBEIRO, E. A.; DE OLIVEIRA, R. A.; DA GAMA MELO, J. D.; DA SILVA, G. T. P.; CARNEIRO, J. L. S.; DA SILVA, I. K. L. Detecção fenotípica de bactérias Gram-negativas produtoras de carbapenemases em efluente hospitalar na Amazônia no estado do Pará, Brasil. **Revista de Ciências Ambientais e Saúde**. v.47, n.1, 2020.

ROCHA, S. M. **Estudo da ocorrência do gênero *Aeromonas* em sistemas de tratamento de esgotos por lagoas de estabilização no Município de Lins - SP**. 2004. Tese (Doutorado em Serviços de Saúde Pública) - Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

RODRIGUES, D. P.; RIBEIRO, R. V.; *Aeromonas*. In: VIEIRA, R. H. F. **Microbiologia, higiene e qualidade do pescado- teoria e prática**. São Paulo: Varela, 2004.

ROQUE, O.C. **Curso de Tratamento de esgotos**. 2008.

ROSA, L. N.; DE CASTRO, A. P.; DE LIMA, W. G.; SIMIÃO, D. C.; DE PAIVA, M. C. Pneumonia associada à ventilação mecânica por *Pseudomonas aeruginosa* resistente a polimixina: Uma revisão sistemática. **Research, Society and Development**. v.10, n.13, p. e555101321480-e555101321480, 2021.

ROSSI F, ANDREAZZI DB. **Resistência Bacteriana: Interpretando o Antibiograma**. São Paulo: Atheneu, 2005.

RUSSO, A.; GAVARUZZI, F.; CECCARELLI, G.; BORRAZZO, C.; OLIVA, A.; ALESSANDRI, F.; VENDITTI, M. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections in COVID-19 patients hospitalized in intensive care unit. **Infection**. v.50, n.1, p. 83-92, 2022.

SADER, H.S.; GALES, A.C.; PFALLER, M.A.; MENDES, R.E.; ZOCCOLI, C.; BARTH, A.; JONES, R.N. Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY antimicrobial surveillance program. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**. v.5, n.4, p. 200-215, 2001.

SALIMIYAN RIZI, K.; GHAZVINI, K.; FARSIANI, H. Clinical and pathogenesis overview of *Enterobacter* infections. **Reviews in Clinical Medicine**. v.6, n.4, p. 146-154, 2020.

SAMAHA-KFOURY, J.N.; ARAJ, G.F. Recent developments in β -lactamases and extended-spectrum β -lactamases. **British Medical Journal**. v.327, n.7425, p. 1209-1213, 2003.

SANTOS, A. L. **Perfil fenotípico e genotípico de enterobactérias resistentes aos beta-lactâmicos**. Dissertação (Mestrado em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2018.

SANTOS, F.F.S.; FILHO, J.D.; MACHADO, C.T.; VASCONCELOS, J.F.; FEITOSA, F.R.S. O desenvolvimento do saneamento básico no Brasil e as consequências para a saúde pública. **Revista Brasileira de Meio Ambiente**. v.4, n.1, p. 241-251, 2018.

SASAKI, T.; HIRAI, I.; NIKI, M.; NAKAMURA, T.; KOMALAMISRA, C.; MAIPANICH, W.; KUSOLSUK, T.; SA-NGUANKIAT, S.; PUBAMPEN, S.; YAMAMOTO, Y. High prevalence of 102 CTX-M β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in stool specimens obtained from healthy individuals in Thailand. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v.65, n.4, p. 666–668, 2010.

SCARRE, C. editor. **Atlas da História Universal**. Rio de Janeiro: O GLOBO, 1995.

SCHMIDT, A.S.; BRUUN, M.S.; DALSGAARD, I., LARSEN, J.L. Incidence, Distribution, and Spread of Tetracycline Resistance Determinants and Integron-Associated Antibiotic Resistance Genes among Motile Aeromonads from a Fish Farming Environment. **Applied and Environmental Microbiology**. v.67, n.12, p. 5675–5682, 2001.

SEKIZUKA, T.; INAMINE, Y.; SEGAWA, T.; HASHINO, M.; YATSU, K.; KURODA, M. Potential KPC-2 carbapenemase reservoir of environmental *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas caviae* isolates from the effluent of an urban wastewater treatment plant in Japan. **Environmental Microbiology Reports**. v.11, n.4, p. 589-597, 2019.

SENGUPTA, N.; ALAM, S.I.; KUMAR, R.B.; SINGH, L. Diversity and antibiotic susceptibility pattern of cultivable anaerobic bacteria from soil and sewage samples of India. **Infection, Genetics and Evolution**. v11, n.1, p. 64-77, 2011.

SILVA, J.G.S.O. **Antimicrobial susceptibility and molecular characterization of resistance mechanisms of *Enterococcus* spp. from the intestinal microbiota of food producing animals**. Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina Veterinária) Universidade de Évora, 2021.

SILVA, T.S.M. **Qualidade microbiológica do Rio Carioca-RJ: isolamento e identificação de bactérias do grupo dos coliformes termotolerantes e sua susceptibilidade a antimicrobianos**. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública e Meio Ambiente). Fundação

Oswaldo Cruz, 2021.

SILVA, K C.; LINCOPAN, N. Epidemiologia das betalactamases de espectro estendido no Brasil: impacto clínico e implicações para o agronegócio. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v. 48, n. 2, 2012.

SMALLA, K.; HEUER, H.; GÖTZ, A.; NIEMEYER, D.; KRÖGERRECKLENFORT, E.; TIETZE, E. Exogenous Isolation of Antibiotic Resistance Plasmids from Piggery Manure Slurries Reveals a High Prevalence and Diversity of IncQ-Like Plasmids. **Applied and Environmental Microbiology**. v.66, n.11, p. 4854-4862, 2000.

SOARES, C. R. P.; DA SILVA, F. R. F.; JÚNIOR, J. B. O.; DE ARAÚJO, P. S. R.; FIRMO, E. F. Epidemiologia molecular de bacilos Gram-negativos multidroga resistente produtores de carbapenemases isoladas de diferentes sítios de infecção. **Research, Society and Development**. v.10, n.9, p. e30210918070-e30210918070, 2021.

SOBRAL, M. M. R. **Diversidade de *Aeromonas* spp. associadas a perfis de virulência nas águas da Lagoa Rodrigo de Freitas**. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Vigilância Sanitária) – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2018.

SONG, P.; DENG, J.; HOU, T.; FU, X.; ZHANG, L.; SUN, L.; LIU, Y. *Aeromonas sobria* peritonitis in a peritoneal dialysis (PD) patient: a case report and review of the literature. **BMC Nephrology**. v.20, n.1, p. 1-5, 2019.

SORIANO-MORENO, D. R.; YARETA, J.; ROJAS-COSI, A. F.; FAJARDO-LOYOLA, A.; LEÓN-LUNA, D.; CASTILLO-QUEZADA, I.; MARCOS-CARBAJAL, P. Efluentes hospitalarios como reservorio de enterobacterias productoras de betalactamasas y carbapenemases. **Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública**. v.38, p. 302-307, 2021.

TEIXEIRA, P.; VALLE, S. (orgs.) **Biossegurança: uma abordagem multidisciplinar** 2nd ed. rev. and enl. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2010.

TENOVER, F.C.; ARBEIT, R.D.; GOERING R.V. The molecular typing working group of the society for healthcare epidemiology of America. How to Select and Interpret Molecular Strain Typing Methods for Epidemiological Studies of Bacterial Infections: A Review for Healthcare Epidemiologist. **Infection Control & Hospital Epidemiology**. v.18, n.6, p. 426-439, 1997.

TERAN, F. J. C.; TEIXEIRA JUNIOR, W.; SANTANA, J. S.; SANTOS, G. O.; SOUSA, G. R. Ampliação da capacidade de tratamento da estação de tratamento de esgotos de Quirinópolis GO por meio da implantação da tecnologia de Reator Biológico de Leito móvel (MBBR). **Brazilian Journal of Development**. v.5, n.11, p.26220-26230, 2019.

TERRA, M. R.; DA SILVA, L. B.; IMBIRANI, J. R.; SILVEIRA, B. A.; FURLANETO, M. C.; FURLANETO-MAIA, L. Resíduos de Lodo de Esgoto: Avaliação de Risco Potencial Ambiental e para a Saúde. **Blucher Biochemistry Proceedings**. v.1, n.2, p. 115-118, 2015.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 12 ed. Porto Alegre: Artmed;

2017.

TOZE, S. PCR and detection of microbial pathogens in water and wastewater. **Water Research** v.33, n.17, p. 3545-3556, 1999.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 8 ed. Rio de Janeiro: Saraiva, 2017.

UFJF. Universidade Federal de Juiz de Fora. **Disciplina de Microbiologia**. Juiz de Fora, 2013. Disponível em: <http://www.ufjf.br/microbiologia/files/2013/05/Bact%C3%A9rias-associadas-%C3%A0s-infec%C3%A7%C3%B5es-gastrointestinais-III.pdf>

VALCARCEL, B.; DE-LA-CRUZ-KU, G.; MALPICA, L.; ENRIQUEZ-VERA, D. Clinical features and outcome of *Aeromonas sobria* bacteremia in pediatric and adult patients with hematologic malignancies: A single-center retrospective study in Peru. **Plos one**. v.16, n.8, p. e0255910, 2021.

VALI, P.; SHAHCHERAGHI, F.; SEYFIPOUR, M.; ZAMANI, M. A.; ALLAHYAR, M. R.; FEIZABADI, M. M. Phenotypic and genetic characterization of carbapenemase and ESBLs producing Gram-negative bacteria (GNB) isolated from patients with cystic fibrosis (CF) in Tehran hospitals. **Journal of clinical and diagnostic research**. v.8, n.1, p. 26, 2014.

VECCHIA, A.D.; THEWES, M.R.; HARB NAIME, R.; SPILKI, F.R. Diagnóstico sobre a situação do tratamento de esgoto hospitalar no Brasil. **Revista Saúde e Ambiente**. v.10, n.2, p. 65-69, 2009.

VIJAY, A. K.; WILLCOX, M. D. Adhesion of *Stenotrophomonas maltophilia*, *Delftia acidovorans*, and *Achromobacter xylosoxidans* to Contact Lenses. **Eye & Contact Lens**. v.44, p. S120-S126, 2018.

VON SPERLING, M. *Princípios do tratamento biológico de águas residuárias*. Vol. 1. **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos**. Belo Horizonte: DESA-UFMG, 2014.

WANG, L., JING, Y., LAI, K., AN, J., & YANG, J. A case of biliary tract infection caused by KPC-2-producing *Kluyvera ascorbata*. **Case Reports in Infectious Diseases**. v.2018, 2018.

WANG, X.; ZONG, Z.; LU, X. Tn2008 is a major vehicle carrying blaOXA-23 in *Acinetobacter baumannii* from China. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. v.69, p. 218–222, 2011.

WEISS, J.; ARIELLY, H.; GANOR, N.; PAITAN, Y. Evaluation of the NanoCHIP® Infection Control Panel test for direct detection and screening of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing bacteria and vancomycin-resistant *Enterococcus* (VRE). **Infection**. v. 43, n. 3, p. 331-338, 2015.

WU, W.; WEI, L.; FENG, Y.; XIE, Y.; ZONG, Z. Precise Species Identification by Whole-Genome Sequencing of *Enterobacter* Bloodstream Infection, China. **Emerging Infectious Diseases**. v.27, n.1, p. 161–169, 2021.

YGITI, H.; QUEENAN, A.M.; ANDERSON, G.J.; DOMENECH-SANCHEZ, A.; BIDDLE,

J.W.; STEWARD, C.D.; ALBERTI, S.; BUSH, K.; TENOVER, F.C. Novel Carbapenem-Hydrolyzing β -Lactamase, KPC-1, from a Carbapenem-Resistant Strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.45, n.4, p. 1151-1161, 2001.

ZAGUI, G. S. **Avaliação da multirresistência a antibióticos e produção de ESBL e carbapenemases em bacilos Gram-negativos de efluente hospitalar e urbano**. Dissertação (Mestrado em Enfermagem em Saúde Pública) - Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

ZARATE, M.; BARRANTES, D.; CUICAPUZA, D.; VELASQUEZ, J.; FERNÁNDEZ, N.; SALVATIERRA, G.; TAMARIZ, J. Frecuencia de resistencia a la colistina en *Pseudomonas aeruginosa*: primer reporte en el Perú. **Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública**. v.38, p 308-312, 2021.

ZHANG, L.; MA, X.; LUO, L.; HU, N.; DUAN, J.; TANG, Z.; ZHONG, R.; LI, Y. The Prevalence and Characterization of Extended-Spectrum-Lactamase and Carbapenemase-Producing Bacteria from Hospital Sewage, Treated Efluents and Receiving Rivers. **International Journal of Environmental Research and Public Health**. v.17, p. 1183; 2020.

ZHANG, S.; HAN, B.; GU, J.; WANG, C.; WANG, P.; MA, Y.; CAO, J.; HE, Z. Fate of antibiotic resistant cultivable heterotrophic bacteria and antibiotic resistance genes in wastewater treatment processes. **Chemosphere**. v.135, p. 138-145, 2015.

APÊNDICE A – RESUMO DO ARTIGO 1

Artigo de Revisão/Review

Resistência bacteriana aos antimicrobianos: uma revisão das principais espécies envolvidas em processos infecciosos

Bacterial resistance to antimicrobials: a review of the main species involved in infectious processes

Jaime Antonio Abrantes¹

Josefí Maria da Rocha Nogueira²

Resumo

Os mecanismos de resistência bacteriana podem existir de maneira intrínseca ou adquirida, porém em ambos os casos podem dificultar a terapia antimicrobiana preconizada para tratamento de infecções. Este artigo tem como objetivo apresentar estudos recentes sobre o assunto. Foi realizada uma revisão da literatura sobre resistência bacteriana aos antimicrobianos, utilizando as bases de dados MEDLINE, LILACS, Scopus e Web of Science. A busca identificou o total de 16 artigos, que foram publicados entre os anos de 2017 a 2021. A maioria dos artigos sobre Gram-negativos tratou do grupo das enterobactérias, assim como os de Gram-positivos tratou dos gêneros *Staphylococcus*, *Enterococcus* e *Streptococcus*. A resistência bacteriana foi encontrada em cefalosporinas, carbapenêmicos, quinolonas, aminoglicosídeos, entre outros. Em relação aos mecanismos de resistência, as β -Lactamases de espectro estendido (ESBL), enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos (ERC), *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) e *Enterococcus* resistentes à vancomicina (VRE) foram relatados e observa-se que a maioria dos trabalhos corrobora que seu rastreamento visa minimizar a transmissão em instituições de saúde.

Palavras-chave

Farmacoresistência Bacteriana; Infecções Bacterianas; Microbiologia

INTRODUÇÃO

As infecções bacterianas, em todo o mundo, são responsáveis pelo uso difundido de medicamentos da categoria antimicrobiana. Tais bactérias, relacionadas aos diversos tipos de infecções existentes, podem apresentar resistência aos antimicrobianos mais utilizados e, assim, prejudicar na terapêutica deste processo.⁽¹⁾

Os microrganismos são capazes de desenvolver mecanismos para que os fármacos não produzam o efeito desejado. Atualmente, é possível observar a existência de diferentes espécies bacterianas que produzem efeitos locais e sistêmicos, que têm ampliado seu espectro de resistência com o passar dos anos, como cocos Gram-positivos, bacilos Gram-negativos, bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR), bacilos fermentadores ou não de glicose e bactérias de diversos outros grupos heterogêneos.⁽²⁻⁴⁾

Os mecanismos de resistência podem se apresentar de maneira intrínseca, quando as bactérias já possuem, em sua constituição, informações para apresentar o mecanismo responsável pela ineficácia do antimicrobiano, como também de maneira adquirida, onde o microrganismo recebe de outra célula, da mesma espécie ou não, informações que podem causar esta resistência. Esta informação recebida pode ser, por exemplo, um fragmento de material genético, que futuramente expressará uma enzima que degrade a molécula do fármaco utilizado contra a bactéria em questão.^(5,6)

Em contrapartida, na célula bacteriana as moléculas dos antimicrobianos se comportarão de acordo com os sítios de ação específicos de sua classe, assim como a própria bactéria agirá de acordo com a sensibilidade ou o tipo de resistência que esta apresenta. Essa capacidade é expressa laboratorialmente através de um perfil fenotípico

¹ Doutoranda/Fiocruz (Laboratório de Microbiologia – ENSP – FIOCRUZ).

² Doutoranda/Fiocruz (Chefe do Laboratório de Microbiologia – ENSP – FIOCRUZ).

Instituição: Fundação Oswaldo Cruz – Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca – ENSP/Fiocruz – DCB – Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Recebido em: 18/06/2021

Aprovado em: 21/09/2021

DOI: 10.21877/2448-3877.202102156

APÊNDICE B – RESUMO DO ARTIGO 2



Identificação e perfil de susceptibilidade de *Aeromonas* sp. isoladas de Estações de Tratamento de Esgoto utilizando meio cromogênico com antimicrobiano

Identification and susceptibility profile of *Aeromonas* sp. isolated from Sewage Treatment Stations using chromogenic medium with antimicrobial

DOI: 10.34117/bjdv8n5-362

Recebimento dos originais: 21/03/2022
Aceitação para publicação: 29/04/2022

Jaime Antonio Abrantes

Doutorado em Saúde Pública e meio Ambiente

Instituição: Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca - Fundação Oswaldo Cruz

Endereço: Rua Leopoldo Bulhões, 1480, prédio de laboratórios da ENSP, sala 21a

E-mail: jaime.abrantes@ensp.fiocruz.br

Tatiane Mendes Varela Ramos

Doutoranda em Saúde Pública e Meio Ambiente/ Mestre em Ciências Biológicas

Instituição: Fundação Oswaldo Cruz- Instituto Oswaldo Cruz.

Endereço: Rua Maravilha, 362 apto 510, Bangu, Rio de Janeiro

E-mail: tatmendes34@gmail.com

Taíssa de Souza Menezes da Silva

Doutoranda em Saúde Pública e Meio Ambiente/ Mestre em Ciências - ENSP, FIOCRUZ

Instituição: Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca - Fundação Oswaldo Cruz

Endereço: Rua Leopoldo Bulhões, 1480, prédio de laboratórios da ENSP, sala 13

E-mail: taissa.silva@posgrad.ensp.fiocruz.br

Joseli Maria da Rocha Nogueira

Doutorado em Ciências - área: Saúde Pública

Instituição: Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca - Fundação Oswaldo Cruz

Endereço: Rua Leopoldo Bulhões, 1480, prédio de laboratórios da ENSP, sala 14

E-mail: joseli@ensp.fiocruz.br

RESUMO

O gerenciamento de resíduos deve ser realizado corretamente, caso contrário, há o aumento de casos de doenças infectocontagiosas e até mesmo o impacto ambiental. Micro-organismos potencialmente patogênicos podem estar presentes no esgoto, causando uma série de infecções e como consequência, efeitos deletérios à saúde humana e até o óbito. É o caso do gênero *Aeromonas*, que embora seja tolerável dentro dos padrões de potabilidade da água, pode causar diversas doenças em homens e animais e ainda disseminar genes de resistência nesse tipo de ambiente. O objetivo do presente trabalho foi identificar a presença de *Aeromonas* sp. isoladas em Estações de Tratamento de Esgoto (ETE), utilizando meio cromogênico com cefalosporina de terceira geração e



realizando posteriormente o Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos (TSA). A Estação Central e a Estação INI (Instituto Nacional de Infectologia), ambas localizadas na Fundação Oswaldo Cruz, foram eleitas para a realização do estudo. A semeadura foi diretamente da amostra em CHROMagar ESBL e após enriquecimento da mesma em BHI, foi realizada nova semeadura no meio cromogênico citado. A identificação, após triagem, foi baseada em provas bioquímicas, seguida pelo TSA baseado nos compêndios atualmente aceitos. Foram identificados 28 isolados *Aeromonas hydrophila* (16), *Aeromonas caviae* (9) e *Aeromonas sobria* (3), resistentes a cefotaxima (presente no meio seletivo), porém 75% não-sensíveis a ciprofloxacino, 71% a ceftriaxona, 57% a ceftazidima, 46% a ceftoxitina, 36% a cefepime, 28% a piperacilina+tazobactam e 11% a gentamicina. Os resultados apresentaram baixa resistência dos isolados testados apesar de já crescerem em meio seletivo com antimicrobiano. Entretanto, apresentou frequência aumentada em praticamente todas as amostras, ressaltando a preocupação com infecções relacionadas a este gênero. O meio cromogênico utilizado otimizou a triagem de *Aeromonas* sp., fazendo com que o mesmo seja de grande importância também em amostras ambientais.

Palavras-chave: *Aeromonas*, cromogênico, antimicrobianos, farmacoresistência bacteriana.

ABSTRACT

Waste management must be carried out correctly, otherwise there is an increase in cases of infectious diseases and even the environmental impact. Potentially pathogenic microorganisms can be present in sewage, causing a series of infections and, as a consequence, deleterious effects on human health and even death. This is the case of the genus *Aeromonas*, which, although tolerable within the standards of potability of water, can cause several diseases in humans and animals and also disseminate resistance genes in this type of environment. The objective of the present work was to identify the presence of *Aeromonas* sp. isolated in Sewage Treatment Stations (STS), using chromogenic medium with third-generation cephalosporin and later performing the Antimicrobial Sensitivity Test (AST). The Central Station and the INI Station (National Institute of Infectious Diseases), both located at the Oswaldo Cruz Foundation, were chosen to carry out the study. Sowing was carried out directly from the sample in CHROMagar ESBL and after enrichment in BHI, a new sowing was carried out in the aforementioned chromogenic medium. Identification, after screening, was based on biochemical evidence, followed by AST based on currently accepted textbooks. We identified 28 isolates *Aeromonas hydrophila* (16), *Aeromonas caviae* (9) and *Aeromonas sobria* (3), resistant to cefotaxime (present in the selective medium), but 75% non-sensitive to ciprofloxacin, 71% to ceftriaxone, 57% to ceftazidime, 46% ceftoxitin, 36% cefepime, 28% piperacillin+tazobactam and 11% gentamicin. The results showed low resistance of the tested isolates despite already growing in selective medium with antimicrobial. However, it showed an increased frequency in practically all samples, highlighting the concern with infections related to this genus. The chromogenic medium used optimized the screening of *Aeromonas* sp., making it of great importance also in environmental samples.

Keywords: *Aeromonas*, chromogenic, antimicrobials, bacterial pharmacoresistance.