



UNIVERSIDADE FEDERAL DE RORAIMA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS NATURAIS
MESTRADO EM RECURSOS NATURAIS

EDIMILLA CARNEIRO DA CUNHA AGUIAR

**RESISTÊNCIA DE CEPAS GRAM-NEGATIVAS A ANTIBACTERIANOS EM
EFLUENTES DE HOSPITAIS PÚBLICOS E NA ESTAÇÃO DE TRATAMENTO DE
ESGOTO DE BOA VISTA – RR**

BOA VISTA, RR

2020

EDIMILLA CARNEIRO DA CUNHA AGUIAR

**RESISTÊNCIA DE CEPAS GRAM-NEGATIVAS A ANTIBACTERIANOS EM
EFLUENTES DE HOSPITAIS PÚBLICOS E NA ESTAÇÃO DE TRATAMENTO DE
ESGOTO DE BOA VISTA – RR**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre do curso de Mestrado em Ciências Ambientais (Recursos Naturais) do Programa de Pós-graduação em Recursos Naturais da Universidade Federal de Roraima.

Orientadora: Profa. Dra. Fabiana Granja

Co-orientadora: Profa. Dra. Márcia Brazão e Silva Brandão.

BOA VISTA, RR

2020

DEDICATÓRIA

*À minha mãe Herneida, sempre dedicada,
e ao meu sobrinho Henrique pra que sirva
de inspiração a gerações futuras da família.*

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer primeiro a Deus, que me concedeu bençãos desde a seleção no mestrado, disciplinas, projeto, execução e finalmente este manuscrito. À Ele toda honra e toda a glória desta conquista, em nome de Jesus Cristo.

Agradeço sempre à minha mãe, Herneida de Souza Carneiro da Cunha, que incansavelmente me incentivou a ir além, me deu todo o suporte em casa, me levou para as aulas e para o laboratório, esteve presente em cada parte, compreendendo que eu precisava dedicar meu tempo e esforços para esta conquista. Agradeço ao marido dela, Jose Gregorio, que me acompanhou em campo, sempre dando o suporte técnico quando precisei. Ademais, agradeço a toda minha família, principalmente meus irmãos que me auxiliaram em alguns momentos dessa caminhada.

Nada dessa pesquisa seria possível sem a equipe imbatível que reunimos. Por isso agradeço a minha orientadora Fabiana Granja, por ter topado essa proposta comigo, pela confiança, pelos conselhos, pelo incentivo e pelos ensinamentos. Agradeço minha co-orientadora Márcia Brazão e Silva Brandão, a rainha da bacteriologia, me ajudou na parte mais complicada da coleta, esteve comigo durante os procedimentos microbiológicos, sempre me ensinando a melhor forma, sendo parceira nos momentos de agonia.

A equipe não estaria completa se não fossem pelos alunos da graduação em Ciências Biológicas Daniel Silva e Silva e Pablo Oscar Amézaga Acosta Junior, ambos muito prestativos, atentos aos ensinamentos, temerosos com os procedimentos e sempre disponíveis para aprender mais. Meus queridos graduandos e futuros colegas de profissão que completaram a equipe BAC.

Nesta caminhada fui surpreendida com a parceria do meu querido irmão científico Wilson Pereira Lima Junior, que esteve comigo em todos os momentos, éramos inseparáveis, apesar de trabalhar em projetos diferentes. Executamos sequenciamento de DNA juntos, aprendendo cada vez mais sobre um dos procedimentos mais extensos da Biologia Molecular. A ele agradeço o suporte emocional e operacional, pela amizade, pelos momentos divertidos, pela companhia, pelas vezes que me ensinou coisas que era só eu pesquisar no google, mas sempre me incentivando a andar com minhas próprias pernas. A dissertação é o produto do meu mestrado, mas meu maior presente foi esse irmão científico.

Agradeço a toda a equipe de bacteriologia e meio de cultura do Laboratório Central de Roraima (LACEN-RR), bem como a diretoria, por permitir que a equipe BAC executasse os procedimentos microbiológicos em suas dependências e por contribuir em parte com insumos nessa parte da pesquisa.

Agradeço aos meus outros colegas do Centro de Estudos da Biodiversidade (CBio) que me incentivaram, em especial, aos meus colegas do LaBMol, pelos momentos de descontração no laboratório e pela união na hora do trabalho. Agradeço aos meus professores e ex-professores do CBio e do PRONAT, que sempre foram muito gentis quando precisei. Agradeço aos meus colegas de pós-graduação, entrei numa turma maravilhosa a qual nunca vou esquecer nossos lanches nas aulas que duravam o dia todo, o apoio que oferecíamos uns aos outros e por torcermos pelo sucesso de cada um.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos que possibilitou minha dedicação exclusiva ao curso de mestrado e a esta pesquisa.

RESUMO

Os efluentes hospitalares podem ter uma alta carga de bactérias patogênicas portadoras de genes codificadores de resistência aos antibacterianos como os β -lactâmicos, principais fármacos empregados no tratamento empírico de infecções, por ter amplo espectro de ação. A resistência a esses fármacos tem aumentado, sendo relatada no mundo inteiro. Fármacos, materiais contaminados, material biológico e excretas de pacientes acabam sendo eliminados via resíduos líquidos, transformando os efluentes hospitalares na principal fonte de disseminação de resistência bacteriana no ambiente. Quando o estabelecimento de saúde não faz o tratamento prévio desses efluentes antes de serem lançados na rede de esgoto da cidade, constituindo em um veículo pelo qual as bactérias multirresistentes podem chegar à estação de tratamento de esgoto. Como esses sítios são considerados locais ótimos para a transferência horizontal de genes de resistência entre patógenos oportunistas e bactérias nativas, a possibilidade de chegar ao corpo hídrico receptor e transformá-lo em reservatório é uma grande ameaça ambiental. Esse trabalho teve por objetivo avaliar a sensibilidade a antibacterianos de bactérias Gram-negativas em efluentes de hospitais públicos e na Estação de Tratamento de Esgotos da cidade de Boa Vista-RR, por meio da detecção microbiológica e molecular, visando avaliar a qualidade de efluentes dos hospitais públicos e comparar com os efluentes urbanos. Para isso, foram realizadas coletas de efluentes em dois hospitais públicos da cidade e na estação de tratamento. As amostras foram semeadas em ágar MacConkey e incubadas a 35°C por 24h. Após purificação das colônias, essas foram submetidas a identificação fenotípica pela série bioquímica e antibiograma pela técnica de disco difusão. Em seguida, foi extraído o DNA para realização de reação em cadeia da polimerase (PCR) para os genes codificadores de ESBL *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} e *bla*_{CTX-M}, e realizada PCR e sequenciamento do gene RNAr 16S para a identificação genotípica das espécies. *Klebsiella pneumoniae* mostrou-se prevalente nos efluentes hospitalares e no pré-tratamento de efluentes urbanos na estação de tratamento. No pós-tratamento, *Enterobacter cloacae* foi prevalente. Somente na identificação genotípica foi possível identificar espécies do gênero *Aeromonas* em ambos efluentes. O perfil de sensibilidade a antibacterianos revelou a presença de cinco cepas ESBL nos efluentes hospitalares e nenhuma nos efluentes urbanos. No entanto, a detecção de genes de resistência revelou seis cepas portadoras de pelo menos um dos genes estudados em efluentes urbanos. Nos efluentes hospitalares, onze cepas foram identificadas como portadoras de pelo menos um dos genes, incluindo duas cepas (*Escherichia coli* e *K. pneumoniae*) portadoras dos três genes simultaneamente. Em um dos hospitais foram encontradas 100% das cepas portando genes de resistência no tanque de confluência do hospital, que faz emissão direta na rede de esgoto da cidade. Esses resultados apontam para os efluentes hospitalares como importantes fontes de disseminação de genes de resistência a β -lactâmicos e que, apesar da diluição, algumas cepas portadoras desses genes chegam à estação de tratamento de esgoto. Medidas de controle e vigilância devem ser adotadas para minimizar os impactos ambientais da propagação dessas bactérias.

Palavras-chave: ESBL. Enterobactérias. *Aeromonas*. Esgoto. Multirresistência.

ABSTRACT

Hospital effluents may have a high load of pathogenic bacteria carrying genes encoding antibacterial resistance, such as β -lactams, the main drugs used in the empirical treatment of infections, as they have a broad spectrum of action. Resistance to these drugs has increased, being reported worldwide. Drugs, contaminated materials, biological material and patient excreta are disposed of via wastewater, turning hospital wastewater into the main source of spread of bacterial resistance in the environment. When the hospital does not pre-treat these effluents before they are released into the city's sewage network, it constitutes a vehicle through which multi-resistant bacteria can reach the sewage treatment station. As these sites are considered hotspot for the horizontal transfer of resistance genes between opportunistic pathogens and native bacteria, the possibility of reaching the receiving water body and transforming it into a reservoir is a major environmental threat. This work aimed to evaluate the sensitivity to antibacterials of Gram-negative bacteria in effluents from public hospitals and in the sewage treatment plant in the city of Boa Vista-RR, through the microbiological and molecular detection, aiming to evaluate the quality of effluents from public hospitals and compare with urban effluents. For this, effluent collections were carried out at two public hospitals in the city and at the treatment station. The samples were sown on MacConkey agar and incubated at 35°C for 24h. After purification of the colonies, they were submitted to phenotypic identification by the biochemical series and antibiogram by the diffusion disc technique. Then, DNA was extracted for Polymerase Chain Reaction (PCR) for the genes encoding ESBL *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} and *bla*_{CTX-M}. PCR and sequencing of the RNAr 16S gene were performed for the genotypic identification of species. *Klebsiella pneumoniae* was prevalent in hospital wastewater and in the pre-treatment of urban wastewater in the treatment plant. In post-treatment, *Enterobacter cloacae* was prevalent. Only in genotypic identification was it possible to identify species of the genus *Aeromonas* in both effluents. The antibacterial sensitivity profile revealed the presence of five ESBL strains in hospital wastewater and none in urban wastewater. However, the detection of resistance genes revealed six strains that carry at least one of the genes studied in urban effluents. In hospital effluents, eleven strains were identified as carrying at least one of the genes, including two strains (*Escherichia coli* and *K. pneumoniae*) carrying the three genes simultaneously. In one of the hospitals, 100% of the strains were found carrying resistance genes in the hospital's confluence tank, which emits directly into the city's sewage system. These results point to hospital effluents as an important source of dissemination of β -lactam resistance genes and that, despite the dilution, some strains carrying these genes reach the sewage treatment plant. Control and surveillance measures must be adopted to minimize the environmental impacts of the spread of these bacteria.

Keywords: ESBL. Enterobacteria. *Aeromonas*. Sewage. Multidrug resistance.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
1.1	REFERENCIAL TEÓRICO.....	9
1.1.1	Água e suas aplicações urbanas	10
1.1.1.1	Usos da água.....	12
1.1.2	Tratamento de efluentes urbanos	14
1.1.2.1	Efluentes hospitalares.....	16
1.1.3	Bactérias patogênicas	18
1.1.3.1	Infecções bacterianas.....	21
1.1.3.2	Bactérias patogênicas no ambiente aquático	22
1.1.4	Tratamento de infecções bacterianas	23
1.1.4.1	Principais classes de antibacterianos	24
1.1.4.2	Beta-lactâmicos	26
1.1.4.3	Dificuldade no desenvolvimento de novas drogas	28
1.1.5	Resistência bacteriana a antibacterianos	29
1.1.5.1	Beta-lactamases de Espectro Estendido (ESBL).....	30
1.1.5.2	Elementos genéticos da produção de ESBL.....	31
1.1.5.3	Resistência bacteriana no ambiente aquático	32
1.1.6	Identificação fenotípica e genotípica de bactérias	34
1.2	OBJETIVOS.....	35
1.2.1	Objetivo Geral	35
1.2.2	Objetivos Específicos	35
1.3	ESTRUTURAÇÃO DO ESTUDO	36
2	CAPÍTULO I	37
3	CAPÍTULO II	56
4	CAPÍTULO III	75
5	CONCLUSÕES	93
	REFERÊNCIAS	94
	APÊNDICES	103
	ANEXOS	109

1 INTRODUÇÃO

As atividades antrópicas configuram a principal fonte de poluição do ambiente natural, através do despejo de altas concentrações de componentes existentes na natureza e substâncias sintéticas. A contaminação de rios e igarapés gera uma preocupação ambiental, pois a água é um recurso natural utilizado para diversos fins econômicos, além de ser fundamental para o consumo humano (PEÑA-GUZMÁN et al., 2019).

O ciclo de utilização urbana da água inicia-se na captação de água, uso e esgotamento de águas residuais até uma estação de tratamento de esgoto, pois os efluentes urbanos possuem uma alta carga de micro-organismos patogênicos e substâncias nocivas ao ambiente natural. No Brasil, geralmente é aplicado o método de lagoas de estabilização para eliminar o excesso de matéria orgânica e bactérias patogênicas, em processo autodepurativo baseado no metabolismo de bactérias do ambiente, para despejar os efluentes tratados em um corpo hídrico receptor. No entanto, as águas residuais pós-tratamento podem ainda apresentar tanto matéria orgânica quanto patógenos que são liberados em igarapés e rios (PEÑA-GUZMÁN et al., 2017).

Em efluentes urbanos podem estar presentes diversas bactérias patogênicas provenientes de fontes variadas, como doméstica, industrial e hospitalar. Os efluentes hospitalares, em especial, possuem uma alta concentração de patógenos provenientes de excretas de pacientes internados e material biológico contaminado que foi descartado via esgoto.

Alguns casos de infecção bacteriana, principalmente as que são adquiridas no ambiente hospitalar, apresentam complicações no tratamento e podem levar o paciente para a Unidade de Terapia Intensiva (UTI). Estas infecções geralmente podem ser causadas por bactérias multirresistentes a antibacterianos. Infecções por bactérias resistentes à terapia antibacteriana levam ao prolongamento da internação do paciente, restrição das opções de tratamento e à morbimortalidade (LEITE et al., 2017). Vários mecanismos de resistência podem ocorrer, um deles é o enzimático, em que ocorre inativação do antibacteriano quando este penetra a bactéria. Estas enzimas são codificadas por genes presentes em elementos genéticos móveis, como os plasmídeos (BLAIR et al., 2015).

As estações de tratamento de esgoto são consideradas importantes sítios para aquisição e disseminação de resistência a antibacterianos no ambiente natural. Nos casos em que os efluentes hospitalares são descarregados diretamente na rede de esgoto urbano, eles se tornam um importante contribuinte de resistência bacteriana na estação de tratamento de esgotos de um município. Através desta via, a multirresistência pode estar sendo disseminada no ambiente aquático natural (LORENZO et al., 2018).

Em Boa Vista (RR), o Hospital Geral de Roraima (HGR) e o Hospital da Criança Santo Antônio (HCSA) não realizam o tratamento prévio de seus efluentes, que são lançados

diretamente na rede de esgotos e chega até a Estação de Tratamento de Esgotos da Companhia de Águas e Esgotos de Roraima (CAER). Nesta estação, as águas residuais são tratadas por lagoas de estabilização antes de serem lançadas no Rio Branco. O potencial de contaminação por bactérias resistentes dos efluentes tratados e que estão sendo despejados no Rio Branco deve ser analisado, visando à manutenção da qualidade da água do principal rio de Roraima.

O objetivo desta pesquisa é avaliar a sensibilidade a antibacterianos de bactérias Gram-negativas em efluentes de hospitais públicos e na estação de tratamento de esgotos da cidade de Boa Vista-RR, a fim de verificar se ocorre contaminação da água em ambiente natural. Esta pesquisa propõe alertar sobre a necessidade de um tratamento prévio dos efluentes hospitalares que representam risco de contaminação ambiental.

1.1 REFERENCIAL TEÓRICO

A água é um recurso natural indispensável para a vida e manutenção dos ecossistemas. Como seres vivos complexos, a humanidade além de consumir água, a utiliza para fins econômicos, com aplicações na indústria alimentícia, agricultura, usos domésticos, comerciais, hospitalares, entre outros. Para esses usos, a água tem como fonte natural principalmente rios e lagos, consistindo essencialmente em água doce. Estes corpos d'água contam com um processo de autodepuração natural, que minimiza danos causados pela contaminação. Como a água é considerada um recurso renovável e não-renovável a depender de sua reserva e com distribuição desigual, sua preservação é de suma importância para as futuras gerações (PRADINAUD et al., 2019).

Grandes centros e áreas urbanas geram uma carga considerável de águas residuais contaminadas, que necessita de manejo para ser devolvida a natureza, pois a autodepuração da água não consegue acompanhar a alta descarga constante de efluentes urbanos. Alguns dos contaminantes biológicos encontrados são bactérias patogênicas, que podem causar doenças infecciosas graves. Uma preocupação mundial para a saúde pública é o aumento da resistência bacteriana a antibacterianos, que são os únicos fármacos eficazes no combate a infecções bacterianas. Águas residuais contaminadas por bactérias carregando genes de resistência vêm sendo cada vez mais relatada em efluentes urbanos, representando uma importante fonte potencial de bactérias multirresistentes para os corpos d'água receptores (WALIA et al., 2016).

Para uma melhor compreensão sobre esse assunto, o texto a seguir aborda os principais pontos dentro da temática exposta, começando com a importância da água, sua distribuição e aplicações, com foco no uso urbano. Dando prosseguimento com enfoque no tratamento de águas residuais urbanas, dados do Brasil sobre o despejo de efluentes em corpos hídricos, o

tratamento mais utilizado e os problemas de contaminantes microbiológicos nos efluentes hospitalares. Em seguida, a temática se afunila para as bactérias patogênicas de interesse clínico, como se distribuem em ambiente aquático e as principais doenças causadas. Para entender em linhas gerais sobre o tratamento, há uma abordagem sobre os antibacterianos de amplo espectro de ação mais empregados na terapia contra infecções bacterianas, com enfoque nos Beta-lactâmicos. Uma pequena seção aborda sobre o desenvolvimento de novos fármacos para infecções bacterianas, seguido de uma seção sobre a resistência bacteriana a antibacterianos, e como esta vem avançando. Finalizando com uma abordagem genética sobre a resistência bacteriana a antibacterianos e identificação genotípica de espécies de bactérias.

1.1.1 Água e suas aplicações urbanas

A água é um dos recursos naturais mais essenciais tanto para a sobrevivência humana e manutenção do ecossistema quanto para finalidades econômicas das sociedades. O planeta Terra é composto por 71% de água, mas apenas 2,53% é água doce e a maioria restante é água salgada, indisponível para consumo e demais usos. Dois terços da água doce disponível no planeta está sob forma sólida nas calotas polares, impossibilitando seu acesso, restando apenas 0,70% de água doce em rios, lagos, igarapés, subterrânea e na atmosfera na forma de vapor (SHIKLOMANOV, 1998; UNESCO, 2003).

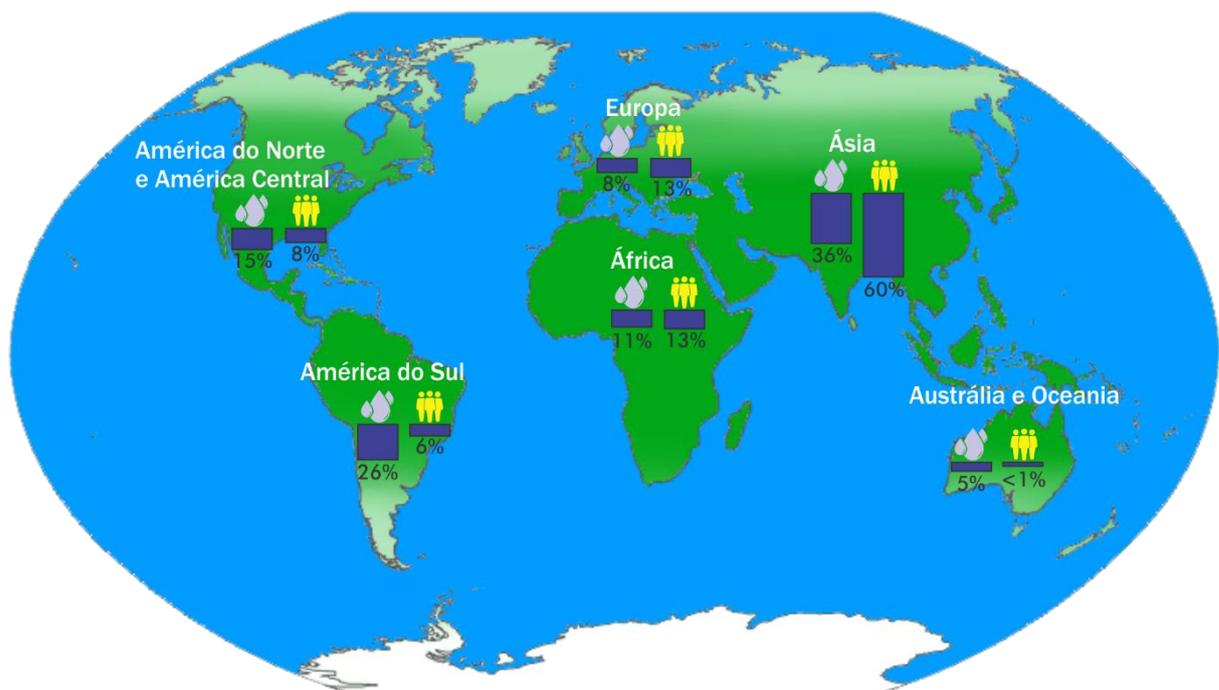
Pradinaud et al. (2019) pontuam em seu trabalho que os recursos são classificados de acordo com sua capacidade de se regenerar. Os recursos não renováveis são aqueles que não se regeneram em tempo hábil da vida humana, portanto são finitos. Já os recursos renováveis podem se regenerar no tempo da vida humana ou são constantemente renovados. Acontece que a água tem uma taxa de regeneração que varia de alguns dias a milhares de anos, a depender do seu reservatório. A água de um corpo hídrico pode se renovar dentro de duas semanas, afinal conta com um processo de autodepuração. Esse processo é possível graças aos fatores bióticos, como micro-organismos, fitoplâncton, macrófitas, invertebrados e peixes, que atuam ativamente na autodepuração. Essa propriedade é extremamente importante para manter a qualidade da água e estabilidade do ecossistema (OSTROUMOV, 2017).

Além da disponibilidade em reservas limitadas e diferentes taxas de renovação, os recursos hídricos são distribuídos de forma desigual mundialmente, o que contribui para escassez de água em algumas regiões do mundo. A precipitação é o principal fator que rege a disponibilidade regional de água doce, e é altamente influenciada pela vegetação, topografia, ventos e proximidade com o litoral (UNESCO, 2003). Além disso, a distribuição populacional

nos continentes influencia na demanda pela água. A figura 1 ilustra a disponibilidade de água e o stress populacional nos continentes.

Algumas regiões possuem alta disponibilidade de água e um stress populacional baixo, como é o caso da América do Sul, enquanto o contrário ocorre no continente asiático. Se considerar as condições de acesso a água tratada e o crescimento populacional de países em desenvolvimento esse problema se agrava ainda mais. O primeiro relatório do Programa Mundial de Avaliação da Água (UNESCO, 2003) destaca pessoas em situação de pobreza não tem acesso a água tratada ou tem um acesso limitado a água de forma geral, aumentando a vulnerabilidade a doenças. Este relatório estima que 50% da população pobre de países em desenvolvimento são expostas a fontes de água poluída.

Figura 1 – Distribuição da disponibilidade de água global e do stress populacional de cada continente.



Fonte: adaptado de UNESCO (2003).

No continente Sul-americano encontra-se o Brasil, um país de proporções continentais, com ampla variação climática e na vegetação. O Brasil possui 12 regiões hidrográficas: Amazônica, Tocantins-Araguaia, Paraguai, Paraná, Uruguai, Atlântico Nordeste Ocidental, Atlântico Nordeste Oriental, Parnaíba, São Francisco, Atlântico Leste, Atlântico Sudeste e

Atlântico Sul. A região Amazônica está localizada na região Norte do país e possui o maior total de estações pluviométricas e fluviométricas, mas é a região com menor densidade demográfica do país (ANA, 2019). A região Norte possui o clima tropical, quente e úmido, com temperatura média anual variando entre 24°C a 26°C e precipitação média de 2.000 mm anual. A condição climática é um dos determinantes para a formação da floresta amazônica nesta região (TUCCI; HESPANHOL; NETTO, 2001).

Na região Norte do Brasil e dentro da Amazônia Legal Brasileira, está Roraima, o estado mais setentrional do país, e a capital Boa Vista é a única do país acima da linha do equador. O estado apresenta uma vegetação em transição de sul a norte de floresta para campinas e campinaranas, lavrado na porção nordeste e as cadeias de serras ao extremo norte. A capital Boa Vista está localizada na vegetação de lavrado, sob a coordenada latitude: 2.81954, longitude: -60.6714 2° 49' 10" Norte, 60° 40' 17" Oeste. Esta localização é uma superfície aplainada em que se observam diversas formações lacustres. O clima de Boa Vista é tropical úmido, com precipitação média anual em torno de 1.750 mm, com período chuvoso de abril a setembro e período seco de outubro a março, sendo janeiro o mês mais seco. Para o município de Boa Vista, o Rio Branco é o principal abastecedor de água da cidade e comunidades ribeirinhas (MENESES; DA COSTA, COSTA, 2007; SILVA et al., 2007).

1.1.1.1 Usos da água

Para fins econômicos, a água possui aplicações principalmente na agricultura, usos domésticos, industriais, energéticos, para uso animal e na mineração. O setor que mais consome água é a agricultura, responsável por 70% do consumo de água doce no mundo voltados para irrigação (UNESCO, 2009). No Brasil, a Lei nº 9.433/97 rege a Política Nacional de Recursos Hídricos, estabelecendo a água como um bem de domínio público, um recurso limitado e dotado de valor econômico, garante que a gestão dos recursos hídricos atenda ao uso múltiplo da água. O Conjuntura dos Recursos Hídricos no Brasil, 2019, estima que 66,1% da água consumida no país é utilizada para a agricultura, seguido de 11,6% pelo uso animal, 9,5% pelo consumo industrial, 9,1% pelo abastecimento urbano, 2,5% consumidos pelo abastecimento rural, 0,9% pela mineração e 0,3% em termelétricas. Apesar de ser o terceiro em consumo, o abastecimento urbano é o segundo setor que mais retira água, correspondendo a 24,4% da água retirada em 2018, e o primeiro em retorno, que totaliza em 42,6% da água que retorna na forma de resíduos líquidos (ANA, 2019).

Os usos doméstico e industrial são frequentemente associados ao prévio tratamento de água, para oferecer este recurso com qualidade para a população, distribuindo com eficiência e

equidade. Para estabelecer a classificação da qualidade da água, são analisados os parâmetros físicos, químicos e microbiológicos estabelecidos pela Resolução CONAMA nº 357/05: Oxigênio Dissolvido (OD), Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO), Potencial Hidrogeniônico (pH), Sólidos Totais Dissolvidos (STD), Condutividade, Turbidez, coliformes fecais e coliformes totais. A água deve atender aos requisitos de qualidade para uma distribuição segura. Esses parâmetros são utilizados para calcular o Índice de Qualidade da Água (IQA), que é influenciado pelo controle da poluição hídrica, regime de chuvas e escoamento superficial (ANA, 2019).

O baixo acesso a água tratada é considerado uma ameaça à saúde pública, relatado pelo Programa Mundial de Avaliação da Água. Uma das maiores causas de diarreia em crianças é o consumo de água contaminada, mais frequente em países em desenvolvimento, onde os índices de pobreza são mais elevados. Condições de assepsia adequadas e o consumo de água limpa e tratada são fatores que minimizam a disseminação de doenças (UNESCO, 2003). Para garantir distribuição de água de qualidade e devolver ao ambiente com impactos mínimos, as cidades se organizam em um ciclo para utilização da água.

O ciclo urbano da água inicia-se com a retirada deste recurso dos corpos d'água, sejam eles rios, lagos ou água subterrânea. Após a captação, a água é submetida a tratamentos para retirada de impurezas prejudiciais ao seu uso previsto, seja doméstico ou industrial. Essa água tratada é distribuída à população e indústrias, onde é consumida com geração de resíduos líquidos. Estes resíduos líquidos são encaminhados para a rede de esgoto da cidade até uma estação de tratamento de esgoto. Neste lugar são realizados procedimentos, mais adiante detalhados, para a retirada de poluentes, alterando a qualidade do líquido até o ponto adequado para lançamento em um corpo hídrico receptor, onde este efluente tratado é diluído e passa por autodepuração (PAL et al., 2014).

Em Boa Vista, Roraima, a Companhia de Águas e Esgotos de Roraima – CAER realiza a captação, tratamento, distribuição, tratamento de efluentes, e posterior despejo no Rio Branco. A água é utilizada pelos habitantes da cidade para diversos fins, como doméstico, comercial, pequenas indústrias e hospitais públicos e privados, e por comunidades ribeirinhas com fins principalmente domésticos (CAER, 2020).

Outra preocupação com o manejo de recursos hídricos é sua disponibilidade para as futuras gerações. A água é um recurso importante para a atividade econômica na humanidade, mas acima de tudo é um suporte insubstituível para a vida, sob a perspectiva humana e ecossistêmica. Quando a água é afetada pela atividade humana, os próprios humanos e o ecossistema podem ser impactados (PRADINAUD et al., 2019). Com a circulação de água pelo

ciclo urbano são necessários esforços para mitigar o lançamento de substâncias contaminantes durante o lançamento de efluentes tratados no corpo hídrico receptor (ZHOU et al., 2016).

1.1.2 Tratamento de efluentes urbanos

As atividades antrópicas constituem a principal fonte de poluição do ambiente natural através do despejo de dejetos, aumentando a concentração de substâncias que ocorrem naturalmente e lançando compostos sintéticos sem ocorrência natural. Os efluentes provenientes da comunidade, de indústrias, comércios, laboratórios e hospitais apresentam alto grau de contaminação por diversos micro-organismos patogênicos, alta concentração de nutrientes, sólidos suspensos, sais e materiais que demandam oxigênio (EDOKPAYI et al., 2015; QI et al., 2020).

Considerando a carga de poluentes que o esgoto bruto carrega, as estações de tratamento de esgoto têm o objetivo de remover agentes nocivos à natureza antes de despejar águas residuais em corpos hídricos (ZHANG et al., 2016). A carga gerada de esgoto está diretamente relacionada com a população, estimada de acordo com o parâmetro da Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO), que caracteriza a quantidade de matéria orgânica. No Brasil, são geradas aproximadamente 9,1 mil toneladas de DBO/dia, e 48% desse total vem de 106 municípios com uma população acima de 250 mil habitantes (ANA, 2017). A água de corpos hídricos próximos aos grandes centros urbanos apresenta um Índice de Qualidade da Água (IQA) geralmente ruim ou péssimo (ANA, 2019), ressaltando a necessidade de controle da poluição hídrica nas regiões próximas às cidades.

As redes coletoras de esgoto alcançam 61,4% da população urbana brasileira, destes, 42,6% são tratados antes de serem lançados no corpo hídrico. Nos casos em que o despejo acontece no mesmo corpo hídrico de onde há a retirada de água, o esgotamento é sempre feito a jusante da coleta. No Brasil existem 2768 Estações de Tratamento de Esgoto (ETE) em 1592 cidades, que atende uma população estimada em 71,1 milhões de brasileiros. Existem diversas tecnologias para tratamento de esgoto, mas a maioria das estações no Brasil utilizam lagoas de estabilização, que tem um baixo custo, mas necessitam de uma área grande para sua implantação (ANA, 2017). Para o tratamento de esgoto, são realizados processos físicos, químicos e microbiológicos. No caso das lagoas de estabilização, predominam tratamentos microbiológicos.

A retirada de poluentes de águas residuais pela ETE consiste em um tratamento preliminar, primário e secundário. O tratamento preliminar consiste em um processo físico para remoção dos sólidos grosseiros e da areia através de gradeamento, peneiras e caixas de areia,

aplicado a toda água residual que chega a estação. Os materiais sólidos são retirados em intervalos para não sobrecarregar o sistema. Em seguida, a água residual livre de materiais grosseiros é submetida ao tratamento primário, em que há remoção dos sólidos sedimentáveis, como óleos, graxas, por volta de 40% da matéria orgânica. Este processo ocorre através da ação da gravidade em tanques de flotação a ar, decantadores e tanques sépticos (ABDEL-RAOUF; AL-HOMAIDAN; IBRAHEEM, 2012).

O tratamento secundário é realizado pelas lagoas de estabilização, divididas em anaeróbicas, facultativas e de maturação. A lagoa anaeróbica é responsável pela decomposição parcial da matéria orgânica através do metabolismo de bactérias anaeróbicas. Este tipo de lagoa possui dimensões menores, porém são muito profundas para favorecer o ambiente anóxico e o crescimento de algas deve ser o mínimo possível para evitar aumento de O_2 no ambiente aquático. Os micro-organismos anaeróbicos possuem baixa taxa de metabolismo e reprodução lenta, o que faz com que o processo seja lento, e o efluente permanece por 2 a 5 dias (PESCOD; MARA, 1985).

As lagoas facultativas recebem as águas residuais da lagoa anaeróbica para decomposição da matéria orgânica dissolvida. Primeiramente ocorre a formação de um lodo composto de matéria orgânica que sedimenta e é metabolizado por bactérias anaeróbicas que colonizam o fundo da lagoa. A matéria orgânica que fica dissolvida na coluna d'água é metabolizada por bactérias heterotróficas na presença de oxigênio mais próximas à superfície. A manutenção de oxigênio nesta lagoa é realizada pelas algas que fornecem O_2 e pelas bactérias aeróbicas que utilizam esse O_2 . Nesta lagoa estão presentes as bactérias facultativas, que podem realizar seus processos metabólicos tanto na presença quanto na ausência de O_2 . Estas lagoas são extensas e há um fluxo contínuo de entrada de águas residuais por uma extremidade e saída por outra (PESCOD; MARA, 1985).

Para remoção de micro-organismos patógenos das águas residuais é utilizada a lagoa de maturação, em que fatores como luz solar, temperatura, pH, escassez de alimentos, predadores, competição e compostos tóxicos podem ser utilizados nesse processo. Esta lagoa geralmente é rasa para potencializar a remoção de patógenos (PESCOD; MARA, 1985).

A Resolução CONAMA nº 430/2011 delimita os parâmetros para o lançamento de efluentes no corpo hídrico receptor, em que estabelece uma eficiência de remoção mínima de 60% de DBO. No Brasil, são 364 ETEs que contam com o tratamento em lagoa anaeróbica e lagoa facultativa, e são predominantes no país, com eficiência de 60 a 80% de DBO. A região Norte do Brasil é a mais carente em serviços coletivos de esgotamento sanitário e tratamento e efluentes, que atendem apenas 33% da região (ANA, 2017).

Roraima possui apenas uma ETE localizada na capital Boa Vista que é gerida pela Companhia de Águas e Esgotos de Roraima – CAER, de competência estadual. As águas residuais são tratadas por lagoas de estabilização facultativas e de maturação e, em seguida, os efluentes tratados seguem por um emissário de 4,5 km que desagua no Rio Branco, que tem grande poder de autodepuração (CAER, 2020). Apenas 15% do esgoto gerado em Roraima é tratado e o Atlas Esgotos: Despoluição de Bacias Hidrográficas do Brasil, 2017, classifica o poder de diluição dos esgotos em Boa Vista como ruim ou péssimo (ANA, 2017).

Os efluentes urbanos são lançados constantemente no corpo hídrico receptor, podendo acarretar impactos negativos a jusante. Yustiani et al. (2018) concluíram em seu trabalho que os poluentes urbanos tóxicos podem inibir a atividade dos micro-organismos responsáveis pela autodepuração da água do corpo hídrico receptor, levando a lentidão desse processo e diminuição da qualidade da água. Pradinaud et al. (2019) destacam que até mesmo um rio com fluxo constante pode sofrer impactos negativos irreversíveis. No Brasil, tem o exemplo do Rio Doce, que recebeu alta carga de rejeitos de mineração em novembro de 2015 e ainda possui alta carga de metais pesados que são nocivos para o ser humano (CARVALHO et al., 2017).

1.1.2.1 Efluentes hospitalares

Oferecer uma água de qualidade para hospitais torna-se essencial para a saúde do paciente e procedimentos cirúrgicos que ocorrem diariamente. A água pode ser utilizada em cirurgias e exames, para manutenção do paciente internado, higienização sanitária do hospital, podendo ser controlada pelo número de altas, cirurgias, intervenções de emergências e hospitalizações por ano (GÓMEZ-CHAPARRO; SANZ-CALCEDO; ARMENTA-MÁRQUEZ, 2018).

A principal contribuição de contaminantes de resíduos líquidos provenientes de hospitais é de fármacos e micro-organismos patogênicos. No hospital, as excretas de pacientes e materiais biológicos desprezados no esgoto geralmente estão contaminadas com bactérias patogênicas. Além disso, um terço dos pacientes internados em hospitais estão sob terapia antibacteriana, como estes fármacos não são muito bem metabolizados pelo organismo humano, são eliminadas significativas concentrações pela excreta (RAFRAF et al., 2016).

Muitos trabalhos relatam que efluentes hospitalares possuem uma alta concentração de medicamentos e são a principal fonte de bactérias patogênicas no ecossistema aquático (LORENZO et al., 2018; WALIA et al., 2016; ZAGUI et al. 2020). Resíduos de fármacos dispensados no ambiente aquático gera uma pressão seletiva na qual aumenta a frequência de micro-organismos resistentes aos fármacos, impactando diretamente no ecossistema. Além disso, o ambiente hospitalar é associado a maior frequência de bactérias patogênicas

multirresistentes a antibacterianos (BUELOW et al., 2018). Então os efluentes hospitalares não só modificam o ambiente, por meio do descarte de fármacos, como fornece micro-organismos capazes de resistir a essa modificação.

Os efluentes hospitalares possuem alta carga de bactérias patogênicas multirresistentes e constituem uma rota de disseminação no ecossistema natural. Quando o hospital não conta com um sistema local de tratamento de efluentes, esses escoam pelo esgotamento sanitário da cidade, misturando-se aos efluentes urbanos e chegando até a estação de tratamento de esgoto da cidade. Os efluentes hospitalares misturam-se aos urbanos que são encaminhados para a ETE, e as bactérias patogênicas multirresistentes encontram as bactérias não patogênicas comuns do ambiente, como aquelas responsáveis pela degradação da matéria orgânica no tratamento de efluentes por lagoas de estabilização (WALIA et al., 2016).

As estações de tratamento de esgoto são consideradas lugares ótimos para a aquisição e disseminação de multirresistência a antibacterianos no ambiente. Isso porque recebe continuamente descarga de bactérias multirresistentes e resíduos de fármacos; e as condições são favoráveis tanto para a seleção quanto para a troca horizontal de genes entre as bactérias durante o processo de tratamento (LORENZO et al., 2018). A multirresistência a antibacterianos vai ser abordada com mais detalhes adiante, mas aqui é um exemplo, pois as bactérias são conhecidas por desenvolver resistência não só a antibacterianos, mas para sobreviver em ambientes extremamente seletivos (ZAGUI et al., 2020).

A contaminação de corpos d'água com bactérias patogênicas torna-se um problema ambiental, pois diminui a qualidade da água que é um recurso utilizado com diversos fins. Apesar dos esforços para tratar as águas residuais nas ETEs, matéria orgânica e bactérias potencialmente patogênicas podem estar presentes no pós-tratamento e chegar aos corpos d'água receptores. Em um estudo realizado em quatro estações de tratamento de águas residuais e seus respectivos corpos d'água receptores no Sul da África, Teklehaimanot et al. (2015) relatam a presença de bactérias patogênicas das espécies: *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Morganella morganii*, *Aeromonas hydrophyla*, *Enterobacter cloacae*, *Vibrio alginolyticus*, *Pseudomonas aeruginosa*.

Apesar da carga de bactérias que chega na estação pelos efluentes urbanos não tratados, Bhatt et al. (2020) relatam que a qualidade microbiológica do efluente tratado final é fortemente influenciada pelo tratamento adotado, sendo o tratamento com biorreator de membrana associado a desinfecção com cloro o mais eficiente na remoção bacteriana. No Brasil, a *E. coli* é utilizada como indicador microbiológico da água, principalmente por ser uma espécie colonizadora do intestino humano e sua presença significativa indica contaminação fecal (ANA, 2019). Porém, no estudo de Bhatt et al. (2020) os autores concluíram que os indicadores

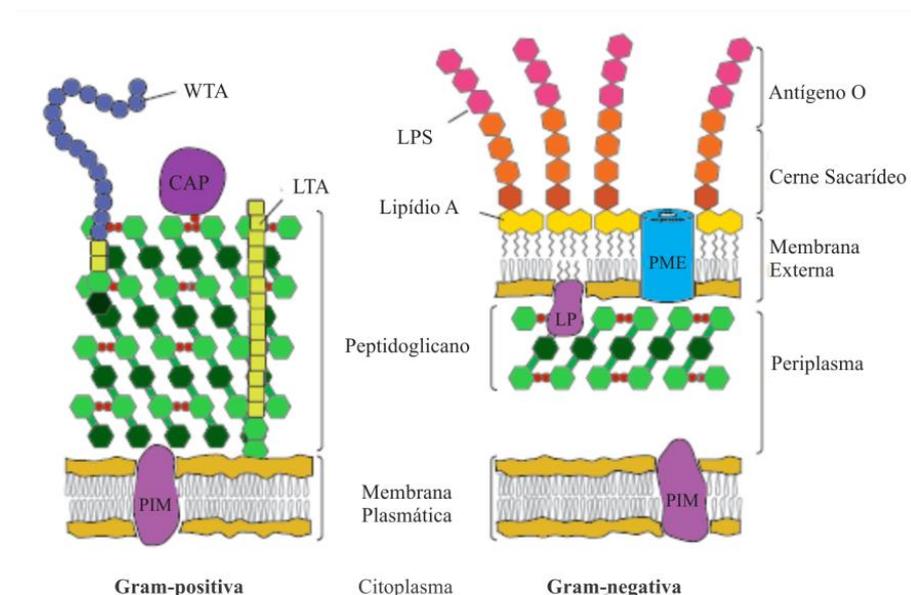
bacterianos foram removidos numa taxa maior que os patógenos emergentes, o que indica uma fraca correlação entre os indicadores e os patógenos. Ou seja, o parâmetro microbiológico da água pode estar dentro das diretrizes estipuladas pela legislação, mas ainda ter a qualidade comprometida por patógenos emergentes.

A grande preocupação ambiental é transformar o ecossistema aquático natural num reservatório de bactérias patogênicas multirresistentes a antibacterianos e comprometer a saúde de seus consumidores. Uma comunidade diretamente afetada na Amazônia brasileira é a ribeirinha, que muitas vezes consome água diretamente do corpo hídrico sem nenhum tratamento, causando muitas mortes nesses povos, pois não contam com acesso fácil a saúde pública (VELASCO, 2020).

1.1.3 Bactérias patogênicas

Bactérias são seres unicelulares, procariontes, desprovidos de envoltório nuclear e dividem-se em dois grandes grupos: Gram-positivas e Gram-negativas (Figura 2). A morfologia da parede celular de Gram-positivas é composta por uma espessa camada de peptidoglicano, enquanto nas Gram-negativas existe uma fina camada de peptidoglicano seguida de uma membrana externa de composição semelhante à bicamada fosfolipídica, exceto pela presença dos Lipopolissacarídeos (LPS). Entre a membrana celular das Gram-negativas e a parede celular existe o espaço periplasmático (DONG et al., 2014).

Figura 2 – Estrutura constituinte da parede celular e membranas de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.



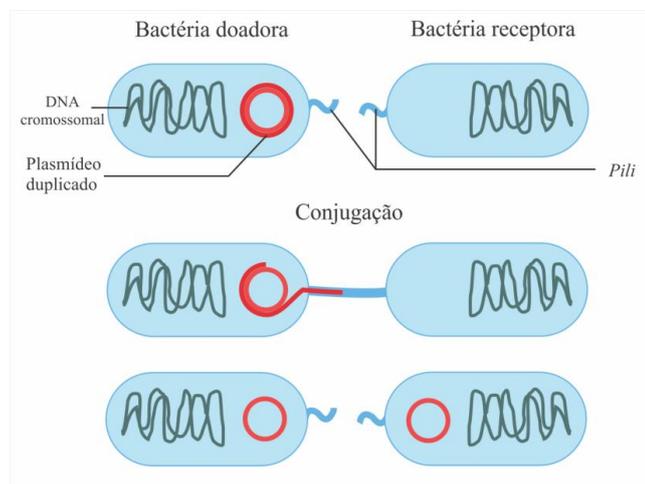
Fonte: Modificado de Silhavy et al. (2010).

Legenda: WTA = Ácido Tecóico de Parede; CAP = Proteína Covalentemente Ligada; LTA = Ácido Lipotecóico; PIM = Proteína Integral de Membrana; LP = Lipoproteína; PME = Proteína da Membrana Externa; LPS = Lipopolissacarídeo.

O composto LPS é formado pelo antígeno-O, um polímero glicano ligado ao cerne sacarídeo que é ancorado à membrana externa pelo lipídeo A. Este último é uma endotoxina que possui radicais variáveis entre as cepas bacterianas, conferindo a alta virulência das bactérias Gram-negativas em relação às Gram-positivas, e o antígeno-O promove uma resistência aos mecanismos de defesa do hospedeiro. Assim, os LPS desempenham um papel chave na interação da bactéria com o hospedeiro e na cronificação da infecção (MALDONADO; SÁ-CORREIA; VALVANO, 2016).

Outra particularidade das bactérias é possuir aparatos para realizar transferência horizontal de genes. As bactérias contam com um DNA extragenômico, relativamente menor e circular denominado plasmídeo. Este material genético possui informações adicionais para a bactéria, geralmente associados a resistência em ambientes adversos. Os plasmídeos são copiados de forma independente do DNA genômico e a cópia é transferida a outra bactéria através de uma estrutura denominada *pili* sexual (Figura 3).

Figura 1 - Esquema simplificado da conjugação bacteriana.



A conjugação pode ocorrer entre diferentes espécies, em que uma simples célula doadora é capaz de converter toda a população de células receptoras em doadoras. A efetividade deste processo resulta em uma disseminação epidêmica de genes presentes em plasmídeos. Este está diretamente associado ao aumento da virulência das bactérias, pois a maioria dos genes que conferem resistência a antibacterianos são plasmidiais (LOPATKIN et al., 2016).

Em sua maioria, os Gram-negativos possuem formato de bacilo, ou seja, uma morfologia celular cilíndrica e alongada. A família Enterobacteriaceae é a mais representativa de bacilos Gram-negativos de interesse clínico. Podem ser móveis ou imóveis, a depender da presença de flagelos na espécie; são aeróbicos ou facultativos e fermentadores de açúcares; e seu habitat preferencial é o trato gastrointestinal. Patógenos desta família são geralmente do gênero *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Citrobacter*, *Providencia*, *Morganella*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, *Yersinia* e *Plesiomonas* (PATERSON, 2012).

A espécie *E. coli* é a enterobactéria de maior interesse clínico, como o patógeno mais comum em infecções urinárias; científico, sendo empregada em pesquisa com clonagem gênica; e ecológico, como principal bioindicador microbiológico da água. Embora seu habitat preferencial seja o trato gastrointestinal, sobrevive bem no ambiente natural. Essa espécie consegue crescer em ambientes com temperatura de $>30^{\circ}\text{C}$, possui versatilidade na aquisição de nutrientes, podendo ter como fonte alternativa de carbono até compostos aromáticos (JANG et al., 2017).

Outro bacilo Gram-negativo de interesse clínico que não pertence à família de enterobactérias é a espécie *Pseudomonas aeruginosa*. O gênero *Pseudomonas* é universalmente distribuído no ambiente natural e a espécie *P. aeruginosa* é o patógeno oportunista mais relacionado a infecções hospitalares. Trata-se de um bacilo móvel, reto ou levemente curvado com comprimento de 1 a 3 μm e largura de 0,5 a 1,0 μm (PIER, 2012). Esta espécie é capaz de crescer em várias condições ambientais, como solo e água. Possui um grande genoma (6,3 Mb) que lhe confere a habilidade de sobreviver a diferentes condições, como utilizar várias fontes de carbono com vários metabolismos energéticos, sobrevivendo em ambientes aeróbicos e anaeróbicos (ARAI, 2011).

Outras *Pseudomonas* estão associadas à precipitação de fosfato de cálcio no ambiente e presentes em raízes de plantas (FISHMAN et al., 2018). No crescimento em placa, as bactérias desse gênero possuem pigmentos que dão coloração a colônia, como azul, através do pigmento piocianina, e algumas cepas possuem coloração vermelha (piorubilina) ou preta (piomelanina), e algumas produzem fluorescência, como a espécie *P. fluorescens* (PIER, 2012).

O gênero *Acinetobacter* possuem 59 espécies, dentre as quais, cinco estão relacionadas a infecções em humanos. As espécies de interesse clínico compreendem aquelas do Complexo *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* (Complexo ABC), que compreende as espécies *A. calcoaceticus*, *A. baumannii*, *A. pittii*, *A. nosocomialis*, *A. seifertii* e *A. dijksboorniae*. A primeira espécie ainda não foi relatada em infecções, enquanto as cinco seguintes são as frequentemente envolvidas em infecções (MOUBARECK; HALAT, 2020). Antes, *A. pittii* e *A. nosocomialis* eram conhecidas como *Acinetobacter* genoespécie 3 e 13TU,

respectivamente, pois são fenotipicamente semelhantes a *A. baumannii*, mas possuem características clínicas, epidemiológicas e de resistência a fármacos diferentes (ZHANG; ZHANG; QIAO, 2013).

A espécie *A. baumannii* está muito associada a infecções nosocomiais, tornando-se um patógeno emergente de grande interesse. Trata-se de um cocobacilo Gram-negativo, desprovido de flagelos, estritamente aeróbico, não fermentador, oxidase negativa e catalase positiva (MOUBARECK; HALAT, 2020). Uma característica importante desse gênero é a formação de biofilme, que consiste em um agregado de micro-organismos que aderem um ao outro ou a uma superfície na qual produzem sua própria matriz extracelular. Esse agregado ajuda a bactéria a resistir a desinfecção e facilita a troca horizontal de genes (CAMP; TATUM, 2010).

1.1.3.1 Infecções bacterianas

Infecções bacterianas causadas por bacilos Gram-negativos acometem principalmente o trato urinário, intra-abdominal e respiratório. Infecções do trato urinário são as mais comuns entre homens e mulheres, apesar de afetar com mais facilidade as mulheres. A espécie *E. coli* é o patógeno mais comum nessas infecções, em que este bacilo é introduzido pela flora intestinal e ao conseguir colonizar a região periuretral, acessa a uretra fixando-se na superfície de células epiteliais da bexiga. Outros patógenos da família Enterobacteriaceae, como os dos gêneros *Klebsiella*, *Enterobacter* e *Proteus* podem causar infecções urinárias relacionadas ao uso de cateter e em infecções nosocomiais (MCLELLAN; HUNSTAD, 2016).

Os casos de infecção urinária associados ao uso de cateter geralmente estão relacionados com o prolongamento da internação do paciente, aumento dos custos no tratamento e aumento do risco de morbidade e mortalidade. Além disso, a falta de experiência do profissional, falta de conhecimento e baixa adesão ao protocolo recomendado para o procedimento podem ser fatores que contribuem para a infecção urinária associada a uso de cateter (GALICZEWSKI; SHURPIN, 2017). A assepsia de instrumentos, profissional bem paramentado e ambiente hospitalar limpo são importantes fatores que contribuem para diminuição da circulação de bacilos Gram-negativos no hospital.

As infecções intra-abdominais são aquelas que acometem qualquer órgão abdominal, como estômago, duodeno, fígado, apêndice, intestino, peritônio e vesícula biliar (HASSINGER et al., 2017). Estas infecções podem se desenvolver na comunidade ou podem ter origem hospitalar, geralmente associado ao pós-cirurgia, que podem complicar o quadro clínico do paciente. Mas Guilbart et al. (2016) encontraram que 72% das infecções intra-abdominais com complicação foram adquiridas da comunidade e 28% adquiridas no hospital, em que acometeu principalmente a região do trato gastrointestinal inferior, com apendicite e diverticulite. Os

autores também relataram que 50% dos casos de infecção intra-abdominal observados foram causados por bacilos Gram-negativos, como *E. coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Hafnia alvei*, *Citrobacter*, *Morganella morgani* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Outra região geralmente acometida por infecções bacterianas é o trato respiratório inferior, causando pneumonia. Normalmente, as bactérias patogênicas têm como porta de entrada o trato respiratório superior no qual se multiplicam e disseminam pelo trato respiratório inferior, onde se estabelecem na mucosa (MAN et al., 2019). A pneumonia, então, é uma inflamação aguda ou crônica do parênquima pulmonar, em que os bronquíolos e alvéolos são preenchidos com exsudato inflamatório, dificultando a troca gasosa ou hematose, levando a insuficiência respiratória (ASSUNÇÃO et al., 2019).

Infecções do trato respiratório inferior são um dos maiores problemas para a saúde pública de países em desenvolvimento, como principal causa de morbimortalidade em pacientes internados. A pneumonia costuma aparecer como infecção secundária principalmente em pacientes internados na Unidade de Terapia Intensiva (UTI). Muitas dessas infecções são causadas por instrumentos invasivos, como cateter intravenoso e ventilação mecânica (ASSUNÇÃO et al., 2019; MAN et al., 2019). Mota et al. (2017), em sua pesquisa realizada em um hospital universitário de Minas Gerais, Brasil, concluíram que a incidência de pneumonia associada a ventilação mecânica foi de 23,3% em pacientes internados na UTI. Os autores observaram que quanto mais tempo o paciente usava o ventilador mecânico, maior a chance de desenvolver pneumonia e a maioria dos casos evoluíram para óbito.

Os principais patógenos envolvidos em pneumonia incluem Gram-negativas da família Enterobacteriaceae, *P. aeruginosa* e *A. baumannii*. Assunção et al. (2019) encontraram prevalência da espécie *P. aeruginosa*, seguida de *A. baumannii* e *K. pneumoniae* como principais bacilos Gram-negativos em infecções nosocomiais do trato respiratório inferior. Mota et al. (2017) também encontraram similar frequência de *P. aeruginosa*, mas a prevalência foi da Gram-positiva *Staphylococcus aureus*. Já Nepal et al. (2018) encontraram prevalência da espécie *K. pneumoniae*, seguida de *P. aeruginosa*, bacilos do grupo *Acinetobacter*, bem como, em menor frequência, enterobactérias como *E. coli*, *Citrobacter koseri*, *Klebsiella oxytoca* e *Enterobacter* spp., em infecções do trato respiratório inferior.

1.1.3.2 Bactérias patogênicas no ambiente aquático

Água é essencial para higiene das pessoas, bem como para o consumo, e sua má qualidade torna-se uma preocupação para a saúde pública. A Organização Mundial da Saúde estima que ocorrem 829.000 mortes por ano causadas por diarreia no mundo. Essa doença é causada por

rotavírus, *E. coli* e *Shigella* spp., em decorrência do consumo de água contaminada, tornando-se a segunda causa de morte entre crianças de até cinco anos (WHO, 2019).

Rios, lagos e igarapés são as principais fontes naturais de águas superficiais, constituindo um ecossistema aquático essencial para ciclagem de nutrientes, em que a microbiota desempenha um papel fundamental em seus processos bioquímicos (JIN et al., 2018). Mas uma grande preocupação é a presença de bactérias patogênicas entre as bactérias do ambiente. A urbanização tem sido associada ao aumento da microbiota patogênica em águas superficiais (YUAN et al., 2019). Em países em desenvolvimento esse problema é mais preocupante, pois grande parte da população não tem acesso a água tratada de qualidade, levando a surtos de doenças associadas a patógenos presentes na água (JIN et al., 2018).

O maior risco de ingestão de água não tratada é a contaminação com fezes humanas e animais. Alguns patógenos bacterianos comuns causadores de doenças infecciosas associadas a consumo de água incluem *E. coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Vibrio* spp. e *Aeromonas* spp. Este último gênero é amplamente distribuído no ambiente aquático, principalmente a espécie *A. hydrophila*, que tem se comportado como patógeno oportunista. *Citrobacter*, *Klebsiella* e *Enterobacter* são gêneros que estão em pequenos números na flora intestinal, mas amplamente distribuídos em ambientes aquáticos. As espécies do gênero *Klebsiella* podem se comportar desde como patógenos oportunistas a causadores de doenças infecciosas gravíssimas (CABRAL, 2010).

A contaminação de corpos d'água naturais com bactérias patogênicas está diretamente associado com a descarga de águas residuais. Yuan et al. (2019) concluem em seu trabalho que águas residuais domésticas e esgoto são os principais poluentes de igarapés da cidade, causando eutrofização e contaminação microbiana. A capacidade plástica das enterobactérias para se manter em diferentes ambientes as torna importantes veículos de disseminação de resistência a antibacterianos, pois podem colonizar desde águas residuais, águas superficiais a água potável, dependendo das condições (FIGUEIRA et al., 2012).

1.1.4 Tratamento de infecções bacterianas

Para combater infecções são utilizados fármacos conhecidos popularmente como antibióticos, mas aqueles que possuem ação especificamente contra as bactérias, podem ser chamados de antibacterianos. Estes compostos podem ter efeito bacteriostático, que impede a proliferação e crescimento da comunidade bacteriana que causa a infecção, sem matar os microorganismos; bactericida, que levam as bactérias à morte pela inibição de enzimas essenciais ao

funcionamento da célula, sem provocar lise; e bacteriolíticos, que cessa a proliferação e crescimento através da destruição da parede celular, levando a lise celular (TAVARES, 2009).

Os antibacterianos possuem uma classificação de acordo com a estrutura molecular, mecanismo de ação e espectro de ação. As classes mais comuns incluem as sulfonamidas, aminoglicosídeos, tetraciclinas, macrolídeos, glicopeptídeos, quinolonas, e os β -lactâmicos (ETEBU; ARIKEKPAR, 2016).

1.1.4.1 Principais classes de antibacterianos

As sulfonamidas ou sulfas foram descobertas em 1930 e constituem uma classe de antibióticos sintéticos com mecanismo de ação bacteriostático. Este fármaco interfere na biossíntese do ácido fólico nas células bacterianas, bloqueando a enzima di-hidropteroato sintase que atua na via de biossíntese de um importante cofator que fornece uma unidade de carbono na biossíntese de bases pirimidínicas, constituintes do DNA. A principal sulfamida é o sulfametoxazol que geralmente é associado ao trimetopim, com o qual tem uma sinergia. Este fármaco inibe Gram-positivas e Gram-negativas, como *Nocardia*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Salmonella*, *Shigella*, *Enterobacter* e *Chlamydia trachomatis*, e alguns protozoários (ETEBU; ARIKEKPAR, 2016; PRESCOTT, 2013).

O primeiro aminoglicosídeo isolado em 1943 foi a estreptomicina, um metabólito secundário de *Streptomyces griseus*, uma bactéria do solo. O mecanismo de ação consiste em uma ligação irreversível à subunidade 30S dos ribossomos bacterianos, interrompendo a síntese proteica. Seu espectro de ação é principalmente contra bacilos Gram-negativos, como *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Shigella*, *Salmonella* e *P. aeruginosa*, e algumas Gram-positivas. Os fármacos representantes posteriores à Eritromicina incluem a neomicina, gentamicina, tobramicina e a sisomicina. Devido a emergência de resistência, foram descobertas e introduzidas novas drogas, derivados semissintéticos, como a amicacina, arbecacina, isepamicina e a netilmicina, que constituem a segunda geração de aminoglicosídeos. Os fármacos desta classe possuem sinergia com os β -lactâmicos (BECKER; COOPER, 2012).

Outra classe de antibacterianos bacteriostáticos é a das tetraciclinas, descobertas em 1945, isoladas pela primeira vez de bactérias do gênero *Streptomyces*, sendo a clortetraciclina o primeiro composto obtido. Seu mecanismo de ação consiste em interromper a síntese proteica, ligando-se à subunidade 30S dos ribossomos, semelhante aos aminoglicosídeos. Possuem amplo espectro de ação, atingindo Gram-positivas e Gram-negativas. Os fármacos pertencentes a esta classe são a tetraciclina, oxitetraciclina, doxiciclina, minociclina, rolitetraciclina e a tigeciclina, que é semissintética (CHOPRA; ROBERTS, 2001).

Os macrolídeos foram descobertos em 1952, isolados a partir do actinomiceto *Streptomyces erythreus*. São também bacteriostáticos, com um mecanismo semelhante às tetraciclina, em que impede a síntese proteica no interior da célula bacteriana, onde o fármaco liga-se ao RNA ribossomal 23S da subunidade 50S. São bastante indicados para tratar pneumonias, bronquite crônica, sinusite aguda e faringites causadas por *Streptococcus pneumoniae*, *S. pyogenes*, *Haemophilus influenzae* e *Moraxella catarrhalis*, ou seja, seu espectro de ação é principalmente contra Gram-positivas, mas pode apresentar atividade contra Gram-negativas. Os principais membros dessa classe são a eritromicina, azitromicina e claritromicina (GAYNOR; MANKIN, 2003).

Os glicopeptídeos foram descobertos em 1953, isolados a partir de *Amycolatopsis orientalis*, uma bactéria do solo. A vancomicina foi o primeiro fármaco descoberto, com aplicação clínica até hoje. Seu mecanismo de ação é bacteriolítico, no qual a droga liga-se a um precursor do peptidoglicano, constituinte da parede celular de bactérias. Esta ligação quebra a afinidade com enzimas transpeptidases, interrompendo a biossíntese da parede celular e resultando em morte celular. Os fármacos pertencentes a esta classe incluem a teicoplanina e a semissintética telavancina. Possuem espectro de ação principalmente contra Gram-positivas, incluindo as resistentes a meticilina (YIM et al., 2014).

Em 1962, a busca por um fármaco anti-malária levou à descoberta do ácido nalidíxico como impureza do quinina, que possuía atividade antibacteriana com espectro restrito de ação. A partir da molécula básica do ácido nalidíxico foi obtida a quinolona, com ação bactericida, em que são capazes de interferir na replicação do DNA e na transcrição da bactéria. Entre as quinolonas incluem-se enoxacina, cinoxacina, norfloxacin, ofloxacin, ciproxacin e temafloxacin. Várias manipulações foram realizadas na molécula básica, resultando na flumequina, a primeira quinolona monofluorada, que posteriormente deu subsídios para o desenvolvimento da levofloxacin e ciprofloxacina. As fluoroquinolonas tiveram seu espectro de ação ampliado e potencializado principalmente contra Gram-negativas, como enterobactérias e *P. aeruginosa* (ETEBU; ARIKEKPAR, 2016; VAN DOORSLAER et al., 2014).

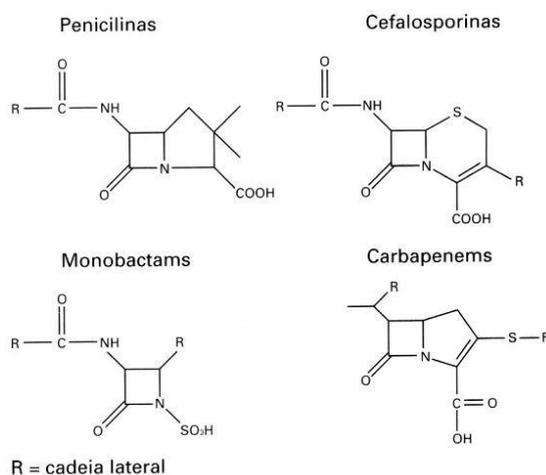
A classe mais diversificada de antibacterianos é a dos β -lactâmicos, que inclui as subclasses de penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos. São atualmente os fármacos mais utilizados para tratar doenças infecciosas causadas por bactérias. Só nos Estados Unidos, 65% de todas as prescrições de antibióticos injetáveis são β -lactâmicos. Para todas as classes, o desenvolvimento de novas drogas é acompanhado do surgimento de resistência. Com o amplo uso de antibacterianos β -lactâmicos, a resistência a esta classe também é a mais relatada (BUSH; BRADFORD, 2016).

1.1.4.2 Beta-lactâmicos

Os antibacterianos de origem β -lactâmica constituem a primeira linha de escolha no tratamento para infecções, pois são fármacos de amplo espectro de ação, podendo ser eficazes contra Gram-negativas e Gram-positivas. São classificados em classes de acordo com a sua origem: penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos. Em cada classe, os fármacos dividem-se em gerações de acordo com a cronologia da sua descoberta e potencial de ação (COLODNER et al., 2004). O mecanismo de ação bacteriolítico dos β -lactâmicos consiste em acoplar-se a um receptor PBP (*Penicillin Binding Protein*) na membrana bacteriana interna, interferindo na transpeptidação do peptidoglicano que constitui a parede celular. O peptidoglicano é um composto tridimensional dinâmico, com síntese e autólise constante, ao cessar o processo de síntese, o fármaco leva à lise celular e morte da bactéria por autólise da parede celular (ETEBU; ARIKEKPAR, 2016; PAPP-WALLACE et al., 2011).

Entre as penicilinas destacam-se as ampicilinas e amoxicilinas. O grupo com maior número de fármacos e quatro gerações é o da cefalosporinas, tendo como exemplos as ceftazidima, cefotaxima, ceftriaxona, cefepima, entre outras. Já a classe monobatâmica possui um único representante, o monobactam. E os carbapenêmicos que são tidos como o último recurso, devido ao seu alto potencial de ação, destacando-se o imipenem, meropenem e ertapenem. Na estrutura química, estes fármacos diversificam-se em radicais, mas compartilham o anel β -lactâmico, que pode ser visualizado na figura 4 (TAVARES, 2009).

Figura 4 - Estrutura do anel β -lactâmico presente nas quatro classes de antibacterianos β -lactâmicos.



Fonte: Drawz e Bonomo (2010).

As penicilinas constituem o primeiro grupo de antibacterianos β -Lactâmicos descoberto em 1928 por Alexander Fleming, microbiologista e farmacologista britânico. Fleming identificou no fungo *Penicillium notatum* a produção de um composto com atividade antibacteriana, batizando-o de penicilina, o primeiro antibiótico descoberto publicamente na história (ETEBU; ARIKEKPAR, 2016). As penicilinas são divididas em naturais e sintéticas. A penicilina G ou benzilpenicilina é de origem natural com amplas aplicações clínicas, com atividade contra Gram-positivas, contudo é ineficaz contra micro-organismos produtores de enzimas β -Lactamases.

O desenvolvimento de enzimas penicilinas levou ao desenvolvimento de penicilinas sintéticas, como as aminopenicilinas. Estas constituem o primeiro grupo de penicilinas com atividade contra Gram-negativas, além de Gram-positivas. São aminopenicilinas a ampicilina e a amoxicilina. Para aumentar o potencial de ação, foram desenvolvidas posteriormente as carboxipenicilinas (carbenicilina e a ticarcilina) e a piperacilina, indicadas para infecções hospitalares (MILLER, 2002).

Entre os β -Lactâmicos, as cefalosporinas constituem a classe com maior número de fármacos. A cefalosporina C foi a primeira a ser isolada em 1945 a partir do fungo *Cephalosporium acremonium*, pelo farmacologista italiano Giuseppe Brotzu e patenteada pelo bioquímico inglês Edward Abraham (ETEBU; ARIKEKPAR, 2016). A partir de modificações das cadeias laterais da cefalosporina C foi possível a diversificação em várias cefalosporinas semissintéticas com diferenças no perfil de toxicidade.

Com base em seu espectro de ação, as cefalosporinas são classificadas em quatro gerações: a primeira inclui a cefalexina, cefazolina, cefalotina, cefadroxil, cefradina, cefapirina e cefaclor, com maior ação sobre cocos Gram-positivos aeróbicos; a segunda geração inclui o cefprozil, cefuroxima, cefamandol, cefonicida, cefotetano e cefotixina, que, além dos cocos Gram-positivos, possuem maior ação contra micro-organismos Gram-negativos, com cefotetano e cefaxitina agindo principalmente contra bactérias anaeróbicas; a terceira geração inclui a cefixima, cefpodoxima-proxetil, ceftibuten, cefdinir, cefoperazona, cefotaxima, ceftazidima, ceftizoxima e ceftriaxona, com uma ação mais potencializada contra bactérias Gram-negativas, incluindo *Pseudomonas aeruginosa*; e a quarta geração inclui cefepima e ceftipirina, com espectro de ação estendido contra Gram-positivos e Gram-negativos, incluindo *P. aeruginosa* (MARSHALL; BLAIR, 1999).

Sykes et al. (1981) foram os primeiros a descrever um β -Lactâmico monocíclico, em que o anel β -lactâmico é encontrado sem associação a outro anel na estrutura molecular, recebendo o nome de monobactam. Este foi extraído da bactéria *Chromobacterium violaceum*, e

apresentou um espectro restrito de ação contra bactérias Gram-negativas aeróbicas, como *Neisseria* e *Pseudomonas*. O aztreonam é o único fármaco disponível desta classe no mercado (ETEBU; ARIKEKPAR, 2016). Sua estrutura monocíclica diminui a afinidade com enzimas metalo β -Lactamases, tornando-o uma boa opção de tratamento associado a inibidores de β -Lactamases (BUSH; BRADFORT, 2016).

A emergência da produção de enzimas β -Lactamases por bactérias, que inativam penicilinas e cefalosporinas resultando em resistência à terapia com esses fármacos, conduziu os pesquisadores a buscar inibidores destas enzimas. Na década de 1970, foram descobertos dois inibidores de β -Lactamases: o ácido clavulânico, isolado a partir de uma bactéria Gram-positiva *Streptomyces clavuligerus*, o primeiro inibidor usado clinicamente; e a tienamicina, isolado a partir de *S. cattleya*, considerada o primeiro carbapenem descoberto, porém instável em solução aquosa (ETEBU; ARIKEKPAR, 2016).

A tienamicina foi utilizada como composto-modelo para o desenvolvimento de carbapenêmicos sintéticos mais estáveis, como o imipenem, penipenem, meropenem, ertapenem, biapenem e doripenem. Os carbapenêmicos são conhecidos como “antibióticos de último recurso”, pois possuem amplo espectro de ação e altamente potente contra Gram-positivas, como *Staphylococcus aureus*, e Gram-negativas, incluindo *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* e enterobactérias produtoras de β -Lactamases de espectro estendido. Imipenem, meropenem e ertapenem possuem utilização global, na qual imipenem é mais potente contra Gram-positivas do que os outros; meropenem e ertapenem são mais efetivos contra Gram-negativas; o meropenem não é mais eficaz que o ertapenem contra *A. baumannii*, enquanto que ertapenem não é mais eficaz que meropenem contra *P. aeruginosa*; meropenem associado ao ácido clavulânico é um potente agente bactericida de MDR (*multidrug-resistant*) *Mycobacterium tuberculosis*, que produz naturalmente β -Lactamases contra todos os outros β -Lactâmicos (BUSH; BRADFORT, 2016; PAPP-WALLACE et al., 2011).

1.1.4.3 Dificuldade no desenvolvimento de novas drogas

Os antibacterianos atualmente aplicados no tratamento de diversas infecções foram descobertos durante a “*Golden Age*” dos antibióticos que se iniciou com a descoberta da penicilina em 1928. Após as décadas de ouro 1940 e 1950, a descobertas de novas drogas declinou nos anos 1990 e 2000. Os fármacos hoje utilizados já perderam a proteção da patente, resultando em preços mais baratos e conseqüente uso clínico exacerbado. Por mecanismos evolutivos, as bactérias começaram a apresentar resistência a estes antibacterianos, levando à falha terapêutica de mais de um fármaco aplicado de classes diferentes. Os preços baixos

facilitaram o acesso de antibióticos à população, e o uso indiscriminado submeteu a comunidade bacteriana envolvida em infecções a uma pressão seletiva, onde apenas as resistentes tiveram sucesso de sobrevivência (BETTIOL; HARBARTH, 2015).

O investimento de grandes empresas farmacêuticas concentra-se em tratamento de doenças crônicas, enquanto o desenvolvimento de novas drogas contra infecções bacterianas fica restrita a pequenas empresas farmacêuticas. Novos antibacterianos descobertos geralmente possuem um restrito espectro de ação, atingindo um gênero, uma espécie ou uma estirpe, são moléculas simples com um alvo específico e rapidamente é desenvolvida uma resistência. Além disso, não conseguem competir com o baixo preço dos fármacos de amplo espectro disponíveis no mercado. Por esses motivos, grandes indústrias farmacêuticas não investem em novos antibacterianos (FERNANDES; MARTENS, 2017). Enquanto o desenvolvimento de novas drogas permanece sem grandes descobertas e investimentos, a resistência bacteriana aos fármacos disponíveis avança.

1.1.5 Resistência bacteriana a antibacterianos

Os antibacterianos possuem também a capacidade de inibição do crescimento bacteriano, viabilizando a utilização destes fármacos no tratamento de infecções bacterianas. A sensibilidade das bactérias ao antibacteriano é definida pela Concentração Mínima Inibitória (MIC – *Minimum Inhibitory Concentration*), que corresponde à concentração mínima do fármaco capaz de inibir o crescimento bacteriano visível, geralmente expresso em µg/ml ou mg/ml (BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016).

Para saber se a bactéria é sensível ou não a um antibacteriano, são realizados os testes de sensibilidade a antibacterianos (TSA), cujo objetivo é assegurar a prescrição adequada de antibacterianos e monitorar a seleção e emergência de bactérias resistentes em indivíduos infectados (VAN BELKUM et al., 2019). Os resultados dos TSA podem ser: susceptível, indica que o antibacteriano foi capaz de inibir a bactéria, portanto pode ser administrada a dosagem normal do medicamento; intermediário, indica que a bactéria está em uma faixa de susceptibilidade em que a MIC se aproxima ou excede a dosagem normalmente administrada, e o paciente pode ter uma resposta clínica menor; e resistente, quando a bactéria não pode ser inibida pelo antibacteriano ou pelas dosagens administradas do fármaco (JORGENSEN; FERRARO, 2009).

Algumas bactérias possuem mecanismos bioquímicos, fisiológicos e morfológicos capazes de deter a ação antibactericida de fármacos aplicados no tratamento de infecções. Estes mecanismos de resistência podem ser de origem intrínseca ou adquirida. A resistência intrínseca

é um conjunto de características funcionais e estruturais inerentes à espécie bacteriana capazes de resistir à ação de algum antimicrobiano em particular (BLAIR et al., 2015). Mecanismos intrínsecos estão relacionados ao processo evolutivo da bactéria sem relação com a presença ou ausência de fármacos, cujas informações genéticas estão armazenadas no genoma e intimamente associadas à espécie (OLAITAN; MORAND; ROLAIN, 2014).

Já a resistência adquirida evolui por pressão seletiva, em que o uso excessivo e indiscriminado de antibacterianos favorece a sobrevivência de formas com resistência a esses fármacos. Está associada à informação genética armazenada em elementos móveis, como *transposons* e plasmídeos, que são transferidos horizontalmente por conjugação entre as espécies bacterianas de uma comunidade (BLAIR et al., 2015).

As bactérias que apresentam resistência aos antibacterianos podem ser classificadas em MDR (*multidrug-resistant*) quando possuem resistência a um ou mais fármacos de três ou mais classes de antibacterianos, XDR (*extensively drug-resistant*) quando são resistentes a todos os antibacterianos de no mínimo duas classes e PDR (*pandrug-resistant*) quando apresentam resistência a todos os antibacterianos de todas as classes. O perfil de resistência pode ser traçado através do Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos para determinar esta classificação da resistência (CERCEO et al., 2016).

1.1.5.1 Multirresistência causada por Beta-lactamases de Espectro Estendido (ESBL)

Bactérias produtoras de enzimas β -Lactamases de Espectro Estendido (*Extended-Spectrum Beta-Lactamases*, ESBLs) são uma preocupação mundial emergente, pois são capazes de inativar por hidrólise os antibacterianos da classe de β -lactâmicos (RAHMAN et al., 2018). Estas enzimas são classificadas de acordo com sua estrutura molecular (AMBLER, 1980) e suas características funcionais (BUSH; JACOBY; MEDEIROS, 1995).

Segundo Ambler (1980), as enzimas β -lactamases são classificadas em A, B, C e D, baseada na sequência de aminoácidos. As classes A, C e D realizam a hidrólise do anel β -lactâmico através de um radical ativo de serina, enquanto que a classe B necessita de um íon de zinco no sítio ativo da enzima para hidrolisar a estrutura, conhecidas como metalobetalactamases. Já a classificação de Bush, Jacoby e Medeiros (1995), divide por esquema numérico de 1 a 4 os grupos dessas enzimas pela ação sobre os substratos preferenciais, não descartando a classificação molecular. Os autores afirmam que facilita estabelecer uma correlação entre o quadro clínico e o perfil de resistência (BUSH; JACOBY, 2010).

O esquema numérico para a classificação funcional de betalactamases recebeu atualização por Bush e Jacoby (2010), em que descrevem os grupos: 1 das cefalosporinas, da classe molecular C, não inibidas por ácido clavulânico e tazobactam, hidrolisam tanto cefalosporinas e benzilpenicilinas quanto cefamicinas; o grupo 2 é o mais diversificado, inclui as classes moleculares A e D, composto por subgrupos com penicilinas (2a, 2b), cefalosporinas (2b), enzimas ESBL, capazes de hidrolisar penicilinas, cefalosporinas até a quarta geração e aztreonam (2be), enzimas com resistência adquirida ao ácido clavulânico (2br, 2ber), hidrolisar a cloxacilina, oxacilina, benzilpenicilina (2c, 2ce) e até enzimas carbapenemases (2f); e o grupo 3, inclui todas as metalobetalactamases, da classe B, produzem carbapenemases, não são inibidas por ácido clavulânico nem tazobactam, mas são inibidos por soluções quelantes de íons metálicos, como EDTA.

As enzimas β -Lactamases de Espectro Estendido (ESBL) são capazes de hidrolisar as penicilinas, cefalosporinas até a quarta geração e o aztreonam, e podem ser do tipo TEM, SHV e CTX-M, pertencentes ao grupo 2 e da classe molecular A (AMBLER, 1980; BUSH; JACOBY, 2010). Estas enzimas estão bastante disseminadas em espécies da família Enterobacteriaceae, particularmente *E. coli* e *K. pneumoniae*, e na espécie *P. aeruginosa* (THEURETZBACHER, 2017). A produção de ESBL por enterobactérias é uma das formas de resistência a antibacterianos mais difundidas pelo mundo (KOUDOKPON et al., 2018).

A presença de Gram-negativas ESBLs leva a complicações na saúde humana, pois limita as opções de antibacterianos que podem ser efetivos na redução da comunidade patogênica e consequente recuperação do paciente (THEURETZBACHER, 2017). A resistência bacteriana cresce em todo mundo, tornando-se uma preocupação para a saúde pública global, que necessita de investigações das fontes e mecanismos envolvidos na sua emergência e disseminação, para tomar medidas de controle.

1.1.5.2 Elementos genéticos da produção de ESBL

Como enzimas, as ESBL são codificadas por genes que geralmente encontram-se em plasmídeos. Os genes codificadores de ESBL podem ser variados, de acordo com a classificação molecular de Ambler (1980). Em enterobactérias, os genes que codificam para enzimas β -lactamases de Espectro Estendido mais frequentes são: *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} e *bla*_{CTX-M}, que conferem resistência às penicilinas, monobactams e cefalosporinas de primeira, segunda, terceira e quarta geração (OSMAN et al., 2017). Uma forma de detecção dos genes de resistência *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} e *bla*_{CTX-M} é a realização da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), que é uma técnica altamente sensível, específica, rápida e simples (DOOSTI et al., 2015).

O gene *bla*_{TEM} foi identificado pela primeira vez em 1965, em cepas de *E. coli* e seu nome deriva da paciente Temoniera, em que foi encontrado. A variante *bla*_{TEM-1} é capaz de hidrolisar penicilinas e cefalosporinas de primeira geração, já a variante *bla*_{TEM-3} possui uma atividade estendida às gerações mais atuais de cefalosporinas (SHAIKH et al., 2015).

Outro gene de codificador de ESBL, *bla*_{SHV} provavelmente tem origem cromossomal em *Klebsiella* que migrou para um plasmídeo e foi disseminado entre outras enterobactérias. Sua denominação origina-se de sua estrutura molecular que possui um radical sulfidril variável. A variante *bla*_{SHV-1} confere resistência às penicilinas, como ampicilina, tige ciclina e piperacilina (SHAIKH et al., 2015).

Já o gene *bla*_{CTX-M} possui uma maior atividade hidrolítica contra cefotaxima, que dá origem a sua nomenclatura. A presença deste gene no cromossomo de *Kluyvera* spp., um patógeno oportunista encontrado em ambiente natural, sugere uma mobilização para o plasmídeo, e conseqüente disseminação entre outras enterobactérias (SHAIKH et al., 2015). O gene *bla*_{CTX-M} é encontrado em plasmídeos com 70 kb (kilo bases) e com 160 kb de tamanho, que podem estar associados aos genes *bla*_{TEM} e *bla*_{SHV} (BONNET, 2004).

Os elementos móveis genéticos são considerados a principal causa da disseminação epidêmica de genes de resistência. Como as bactérias são capazes de duplicar os plasmídeos de forma independente ao seu genoma e transferi-los a outras bactérias, via conjugação, a disseminação de genes de resistência pode acontecer muito rápido no ambiente. Outros mecanismos de aquisição de genes também ocorrem na natureza, como a transformação, onde a bactéria é capaz de adquirir DNA livre no ambiente, e a transdução, na qual a bactéria recebe material genético de bacteriófagos (LEKUNBERRI; BALCÁZAR; BORREGO, 2018).

1.1.5.3 Resistência bacteriana no ambiente aquático

Como mencionado anteriormente, os efluentes urbanos são a principal fonte de bactérias patogênicas no ambiente aquático natural. Esse problema agrava-se quando tais bactérias são portadoras de genes de resistência a antibacterianos. O ambiente aquático representa a principal rota de disseminação de genes de resistência, implicando em um risco a saúde daqueles que consomem e utilizam a água para diferentes propósitos. Kadykalo et al. (2020) encontraram *Salmonella* spp. e *E. coli* com resistência de um antibacteriano a quatro classes de antibacterianos no Rio Grande, sudoeste de Ontario, Canadá, cuja água eram usadas para fins recreacionais e consumo humano.

Contaminação de água para consumo é uma das maiores causas de diarreia, febre tifóide e gastroenterite; caso a infecção seja causada por patógenos resistentes aos fármacos

empregados no tratamento, complica o tratamento dos pacientes (MANYI-LOH et al., 2018). Yelle, Mascarenhas e Aruna (2020) coletaram água para consumo de diversos locais públicos ao sul de Mumbai, Índia. Os autores encontraram bactérias do gênero *Klebsiella*, *Salmonella*, *Enterobacter*, *Serratia* e a espécie *E. coli*, em que 56,2% apresentavam perfil de multirresistência. Na análise molecular, foram identificados três isolados com os genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} e *bla*_{CTX-M}, com prevalência do gene *bla*_{TEM} e ocorrência simultânea ao *bla*_{CTX-M} na mesma cepa de *Enterobacter* sp.

Os corpos d'água naturais como rios e igarapés são a fonte renovável de água superficial de fácil acesso para as necessidades humanas. Hassen et al. (2020) isolaram as espécies *K. pneumoniae* e *E. coli* em águas residuais de estações de tratamento e do rio receptor dos efluentes tratados na Tunísia. Em ambos os sítios os autores encontraram essas espécies portando genes de resistência, com predominância do gene *bla*_{CTX-M}, em associação com outros genes e *integrans* que conferem resistência a antibacterianos. Sanchez et al. (2018) encontraram bactérias portadoras de genes de resistência distribuídas em nove rios e quatro igarapés diferentes no estado de São Paulo, Brasil, com prevalência do gene *bla*_{SHV}, seguido de *bla*_{TEM} e *bla*_{CTX-M}. Como essas pesquisas demonstram, os genes de resistência podem estar disseminados em corpos d'água naturais, comprometendo a qualidade da água e a saúde de seus consumidores.

Os hospitais podem ser uma considerável fonte urbana de disseminação destes genes ESBLs, representando um potencial de contaminação ambiental. Os resíduos líquidos hospitalares podem concentrar bactérias portadoras de genes de resistência que, ao serem lançados diretamente no esgotamento da cidade podem chegar à estação de tratamento de esgotos (RAFRAF et al., 2016). Em Boa Vista, Roraima, Brandão et al. (2017) detectaram, através de Reação em Cadeia da Polimerase, bactérias Gram-negativas, principalmente enterobactérias, portadoras dos genes de resistência *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} e *bla*_{CTX-M} em efluentes contidos em caixas sépticas dos efluentes do principal hospital público da cidade. Este trabalho foi um dos pioneiros na detecção genética de genes codificadores de ESBL no extremo Norte do Brasil.

Uma das grandes preocupações ambientais é a transformação dos corpos hídricos naturais, receptores de efluentes e fonte de água renovável em reservatório para a resistência a antibacterianos. Rodríguez et al. (2020) relataram a presença de enterobactérias como *Pantoea* spp., *Raoutella* spp. e *Kluyvera* spp., além das espécies de *Aeromonas*, comuns no ambiente natural e patógenos oportunistas, em efluentes de uma estação de tratamento de efluentes municipais na Colômbia. Os autores verificaram que as bactérias destes gêneros carregavam o gene de resistência, mas expressavam-se sensíveis no teste de sensibilidade a antibacterianos,

sugerindo que as bactérias podem ser portadoras de genes de resistência, mas não apresentar virulência. Uma vez que os rios e igarapés tem o potencial de veicular bactérias não patogênicas portadoras de genes de resistência a antibacterianos, este problema pode ser amplificado a outros ambientes, pois a água é um meio que interliga todos os outros ambientes (MANYILOH et al., 2018). Além disso, seus consumidores podem ser expostos a infecções de difícil tratamento, aumentando a morbimortalidade e os custos para sua recuperação.

1.1.6 Identificação fenotípica e genotípica de bactérias

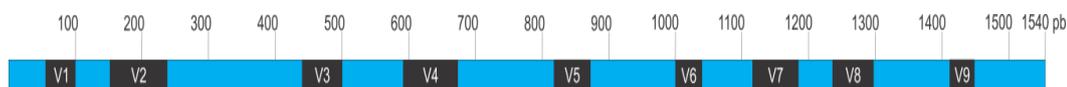
Técnicas convencionais para a identificação fenotípica de espécies bacterianas ocorrem por meio da análise do seu metabolismo. Um dos métodos utilizados para identificação fenotípica são os testes bioquímicos, onde é realizada uma série de provas que testam a capacidade do micro-organismo em degradar aminoácidos, açúcares (carboidratos) e verificação de sua mobilidade. Através desta técnica, são necessários quatro dias do isolamento à definição de espécie, através da série bioquímica (ANVISA, 2013).

Contudo, Silva et al. (2014) afirmam que métodos bioquímicos para identificação de bactérias podem fornecer resultados duvidosos, pois exige um rigoroso controle de qualidade na fabricação do meio de cultura, como pH (potencial Hidrogeniônico) adequado, esterilidade da água, quantidade de meio suficiente para traçar o perfil fenotípico e ambiente asséptico.

As recomendações da ANVISA (p. 44, 2013) para identificação bioquímica de bactérias de importância clínica determina um Padrão Bioquímico (PB), que é “a probabilidade teórica da bactéria em questão apresentar o padrão bioquímico analisado”. Ou seja, a identificação fenotípica é baseada numa interpretação do metabolismo mais frequente apresentado pela espécie bacteriana. Este PB dificilmente é absoluto para uma espécie que foi submetida a diferentes provas, sugerindo cepas de metabolismo variante dentro da espécie (ANVISA, 2013), o que pode causar uma interpretação inconclusiva. Desta forma, há a necessidade de complementação por métodos moleculares, através de uma caracterização genotípica.

A identificação genotípica de espécies bacterianas ocorre através do sequenciamento do gene RNA ribossomal 16S. Este gene codifica para o RNA ribossomal que compõe a subunidade menor dos ribossomos das bactérias e funciona como um código de barras para sua identidade. O gene RNAr 16S possui uma extensão de aproximadamente 1500 pb (pares de bases), com nove regiões variáveis intercaladas com regiões altamente conservadas, como pode ser visto na figura 5 (YANG; WANG; QIAN, 2016). As regiões conservadas e variáveis oferecem uma resolução taxonômica e filogenética das espécies bacterianas, tornando-o a principal escolha para identificação genotípica de bactérias (JO; KENNEDY; KONG, 2016).

Figura 5 - Esquema do gene RNAr 16S indicando as regiões variáveis e (V1-V9).



Fonte: adaptado de Thomas et al. (2011).

Com o avanço das técnicas de sequenciamento, softwares adequados para manipulação das seqüências e o banco de dados *GenBank* da plataforma NCBI, a identificação genotípica de bactérias tem se tornado comum nos estudos ao longo dos últimos 25 anos (GLÖCKNER et al., 2017). Bisognin et al. (2018) utilizaram a identificação da comunidade bacteriana por meio de sequenciamento do gene RNAr 16S para caracterizar microrganismos envolvidos na biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos de petróleo. O sequenciamento do gene RNAr 16S desempenha um papel importante na identificação de isolados desconhecidos ou com perfis bioquímicos ambíguos, além de melhorar a capacidade de reconhecer patógenos emergentes pouco descritos (BAJPAI et al., 2017). Identificar as espécies envolvidas em alguma atividade biológica de interesse é crucial para a tomada de decisão quanto ao seu uso a favor da humanidade.

1.2 OBJETIVOS

Essa pesquisa teve os objetivos a seguir.

1.2.1 Objetivo Geral

Avaliar a sensibilidade a antibacterianos de bactérias Gram-negativas em efluentes de hospitais públicos e na estação de tratamento de esgotos da cidade de Boa Vista-RR, através da detecção microbiológica e molecular, visando a avaliação da qualidade microbiológica de efluentes dos hospitais públicos e urbanos.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Detectar bacilos Gram-negativos entre as bactérias presentes nos efluentes hospitalares e na estação de tratamento;
- Determinar o perfil de sensibilidade a antibacterianos e produção de enzimas ESBL;
- Identificar fenotípica e genotipicamente as espécies das bactérias Gram-negativas;

- Detectar os genes de resistência a antibacterianos *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M}, relacionados à produção de ESBL.
- Comparar as cepas portadoras de genes codificadores de ESBL encontradas nos efluentes hospitalares e efluentes urbanos.

1.3 ESTRUTURAÇÃO DO ESTUDO

Este estudo foi estruturado em três capítulos para responder o objetivo geral proposto e com maior enfoque nos objetivos específicos propostos, de acordo com o tipo de efluente analisado. Sendo assim, o primeiro capítulo intitula-se “detecção de bactérias Gram-negativas produtoras de β -lactamases de Espectro Estendido (ESBL) em efluentes de hospitais públicos de Boa Vista, Roraima, Brasil” e responde aos objetivos específicos de um a quatro para os efluentes hospitalares, exclusivamente. Já o segundo capítulo, intitulado “bactérias Gram-negativas portadoras de genes codificadores de β -lactamases de Espectro Estendido (ESBL) em efluentes urbanos da estação de tratamento de esgoto da cidade de Boa Vista, Roraima, Brasil” responde aos objetivos específicos de um a quatro também, porém com enfoque apenas nos efluentes urbanos da Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) de Boa Vista. Por fim, o terceiro capítulo intitula-se “Comparação entre as bactérias Gram-negativas portadoras de genes codificadores de ESBL encontradas em efluentes hospitalares e na estação de tratamento de esgoto da cidade de Boa Vista, estado de Roraima, Brasil” e responde ao objetivo específico cinco, com uma análise comparativa das espécies de Gram-negativas encontradas nos efluentes hospitalares e urbanos da ETE e a comparação da frequência de bactérias portadoras de genes codificadores de ESBL.

2 CAPÍTULO I

Deteção de bactérias Gram-negativas produtoras de β -lactamases de Espectro Estendido (ESBL) em efluentes de hospitais públicos de Boa Vista, Roraima, Brasil.

Introdução

Os bacilos Gram-negativos são os principais causadores de infecções bacterianas em humanos, acometendo principalmente os tratos urinário, respiratório inferior e gastrointestinal. As principais Gram-negativas presentes nessas infecções pertencem a família Enterobacteriaceae, mas também espécies de outras famílias são frequentemente encontradas (PATERSON, 2012). Essas infecções podem ser associadas ao ambiente hospitalar, quando o paciente já está internado e contrai uma infecção bacteriana. O tratamento empírico empregado é com antibacterianos de amplo espectro de ação, que são eficazes contra Gram-positivas e Gram-negativas, até que se conheça o agente bacteriano da infecção (DE BUS et al., 2016). Mas a resistência bacteriana a estes fármacos vem crescendo mundialmente e tornando-se uma ameaça à saúde pública.

A principal classe de antibacterianos de amplo espectro de ação são os β -lactâmicos, que inclui as penicilinas, cefalosporinas, monobactam e carbapenêmicos. Esses fármacos compartilham uma estrutura comum em sua composição química, o anel β -lactâmico, e possuem ação bactericida, através da interrupção da síntese de parede celular das bactérias, resultando em lise celular (ETEBU; ARIKEKPAR, 2016). Os fármacos desta classe de antibacterianos são a primeira escolha para o tratamento empírico de infecções (DE BUS et al., 2016).

Algumas bactérias produzem enzimas capazes de quebrar por hidrólise o anel β -lactâmico, fazendo com que o fármaco pela a conformação química e sua função. As β -lactamases de Espectro Estendido (ESBL) são capazes de hidrolisar todas as penicilinas, cefalosporinas até a quarta geração e monobactam (RAHMAN et al., 2018). Estas enzimas são codificadas por genes presentes principalmente em elementos genéticos móveis como os plasmídeos (BLAIR et al., 2015; LOPATKIN et al., 2016).

Com a emergente resistência bacteriana no meio hospitalar, as infecções nosocomiais trazem graves complicações para as pacientes internados (BUELOW et al., 2020). A resistência bacteriana aos fármacos implica em aumento do tempo e dos custos da internação, diminuição das opções de tratamento e aumento da morbimortalidade (PARAJULI et al., 2017). Geralmente o paciente com uma infecção por uma bactéria multirresistente fica em Unidade de

Terapia Intensiva (UTI), com necessidade de uso de sondas e em alguns casos ventilação mecânica, que deixa o paciente ainda mais vulnerável a infecções. O Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos estima que no país a cada ano 2,8 milhões de pessoas adquirem infecções por bactérias resistentes e mais de 35.000 morrem (CDC, 2020).

No ambiente hospitalar encontra-se uma frequência elevada de bactérias multirresistentes a antibacterianos, por isso esforços são necessários para controlar sua disseminação para a comunidade. Uma via de disseminação é através de efluentes hospitalares, que concentra diversos contaminantes, entre eles material biológico contaminado, excretas de pacientes e antibacterianos descartados via esgoto (ZAGUI et al. 2020). Então é comum encontrar uma carga de bactérias patogênicas em resíduos líquidos hospitalares, mas ultimamente muitos trabalhos relatam a presença de bactérias multirresistentes nesta água residual, tornando-a uma das principais vias de disseminação no ambiente (AL SALAH et al., 2020; BRANDÃO et al., 2017; BUELOW et al., 2020; LORENZO et al., 2018; ZAGUI et al. 2020). Quando o hospital não tem tratamento prévio específico para eliminação dessas bactérias, os efluentes são lançados diretamente na rede de esgoto da cidade e, mesmo que diluídos, chegam à estação de tratamento de esgoto e, posteriormente, ao corpo hídrico receptor (WALIA et al., 2016).

A disposição contínua de efluentes contaminados com bactérias multirresistentes via esgoto em ambientes naturais torna-se uma ameaça ao ambiente. As estações de tratamento de esgoto são consideradas locais ótimos para a transferência horizontal de genes entre as bactérias, onde elas trocam plasmídeos que podem ter genes de resistência a antibacterianos (LORENZO et al., 2018). Através da conjugação, as bactérias podem disseminar resistência entre si de forma epidêmica e transformar o ambiente aquático natural em reservatório de multirresistência, pois as bactérias patogênicas podem transferir genes de resistência às bactérias nativas daquele ambiente (WALIA et al., 2016). Os consumidores de água do rio que recebe esses efluentes são os mais vulneráveis em adquirir infecções por potenciais bactérias multirresistentes, seja a comunidade ribeirinha ou os que usam o rio com finalidades recreativas (VELASCO, 2020).

Brandão et al. (2017) em sua pesquisa em Boa Vista, Roraima, Brasil, encontraram bactérias produtoras de ESBL e portadoras de genes codificadores em efluentes hospitalares das caixas sépticas do principal hospital público da cidade. Como este hospital não realiza o tratamento prévio dos efluentes, lançando-os diretamente na rede urbana de esgoto, é importante continuar investigando a presença destas bactérias produtoras de ESBL nesta via, bem como incluir outros hospitais públicos. Por isso, o objetivo desta pesquisa foi caracterizar as bactérias Gram-negativas em efluentes dos principais hospitais públicos da cidade de Boa

Vista (RR), através do perfil de sensibilidade a antibacterianos para verificar a produção de enzimas ESBL e detecção molecular dos genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} e *bla*_{CTX-M}.

Material e Métodos

Para esta pesquisa foram coletados efluentes hospitalares de dois hospitais públicos de Boa Vista – RR, Brasil, que possuem Unidades de Terapia Intensiva (UTI). Primeiro, o Hospital Geral de Roraima (HGR), o principal hospital terciário da rede pública do estado de Roraima, com 240 leitos de internação distribuídos em cinco blocos e 20 leitos de UTI. Em sua estrutura sanitária, possui três caixas sépticas de passagem, uma que recebe efluentes gordurosos da cozinha e duas de efluentes dos leitos de internação e UTI. Todos os efluentes hospitalares convergem para uma caixa biológica, na qual são drenados para posterior lançamento na rede de esgoto do município (Figura 1).

Figura 1 – Visão aérea do Hospital Geral de Roraima com identificação da localização dos blocos de internação, UTIs, demais setores do hospital e os três pontos de coleta desta pesquisa.



O segundo hospital incluído nesta pesquisa foi o Hospital da Criança Santo Antônio (HCSA), o único hospital para atendimento infantil no estado, com 167 leitos de internação e 10 leitos de UTI. A estrutura sanitária conta com caixas sépticas de passagem cimentadas que convergem para uma caixa biológica, com drenagem isolada para lançamento na rede de esgoto (Figura 2). Apenas a caixa biológica não estava cimentada e havia possibilidade de abertura.

No HGR foram coletados efluentes de três caixas sépticas: uma desativada que recebia efluentes dos blocos de internação (HGR CS1); outra ativa que recebia efluentes dos blocos e UTIs (HGR CS2) e a caixa biológica (HGR CS3) que recebia a confluência dos efluentes hospitalares e interligava-se com a rede de esgoto do município. No HCSA foram coletados efluentes apenas da caixa biológica de confluência (HCSA CB), pois as caixas sépticas de passagem estavam cimentadas sem possibilidade de abertura pela equipe sanitária do hospital.

Figura 2 – Visão aérea do Hospital da Criança Santo Antônio com a delimitação de área e com ponto de coleta destacado.



Foram realizadas coletas de efluentes em caixas sépticas do Hospital Geral de Roraima (HGR) e do Hospital da Criança Santo Antônio (HCSA) em setembro de 2019 e dezembro de 2019, respectivamente. Para a coleta de efluentes hospitalares foi utilizado um modelo protótipo do coletor de efluentes em profundidade (depósito de patente BR nº 202018009448), e se deu de acordo com Brandão et al. (2017). O coletor foi submerso fechado para evitar o lodo superficial que se forma na caixa séptica, aberto numa profundidade de 30 cm e retirado da caixa séptica contendo 15 ml do resíduo líquido. Os efluentes coletados foram armazenados em caixa térmica para imediato transporte até o Laboratório de Bacteriologia do Laboratório Central de Roraima (LACEN-RR), no qual se deu procedimento ao isolamento em placa.

O material coletado foi diluído em solução salina na concentração de 1:10. Em seguida, o efluente foi semeado em ágar MacConkey a partir da diluição e diretamente do material coletado, e posteriormente inoculado em estufa a 37°C por 24h. Após o crescimento de colônias bacterianas, foi realizado a inoculação de colônias puras em ágar MacConkey.

A partir das colônias puras, foi realizada a identificação fenotípica de bactérias Gram-negativas através da série bioquímica, em que foram analisados seis parâmetros: citrato de Simmons, TSI (*Triple Sugar Iron*), SIM (*Sulphide Indole Motility*), Fenilalanina, Malonato e LIA (*Lysine Iron Agar*). Os tubos de ensaio foram inoculados em estufa a 35°C por 24h. Os resultados foram interpretados de acordo com as recomendações da ANVISA (2013).

Concomitante à identificação de espécies foi realizado o Teste de Sensibilidade a Antibacterianos (TSA) pela técnica de disco difusão em ágar Mueller Hinton de Kirby e Bauer (HUDZICKI, 2009). A colônia pura da bactéria foi diluída em solução salina na concentração de 0,5 na escala de McFerland. Em seguida, foram semeadas em ágar Mueller Hinton com *swab*. Foram testados os antibacterianos: ampicilina, amoxicilina/ácido clavulânico, aztreonam, cefepima, cefotaxima, cefuroxima, cefalotina, cefazolina, cefoxitina, ceftriaxona, imipenem, meropenem, tetraciclina, ácido nalidíxico, levofloxacina, piperacilina/tazobactam, sulfazotrim, cloranfenicol, amicacina e gentamicina, que foram depositados numa distância de 20 mm de centro a centro. Estes fármacos foram escolhidos conforme a aplicação clínica para o tratamento de infecções causadas por bacilos Gram-negativos.

Na mesma placa, foi realizado o teste específico para detecção da produção de enzimas β -lactamases de espectro estendido (*Extended-Spectrum β -lactamases* – ESBL), pela técnica de disco de aproximação, em que o antibacteriano amoxicilina/ácido clavulânico é depositado no centro e rodeado pelos antibacterianos: aztreonam, cefotaxima, ceftriaxona e cefepima. A presença de distorção do halo (zona fantasma) entre os discos indica a produção de enzimas ESBL. As placas foram incubadas em estufa a 35°C por 24h. A leitura de todos os resultados

se deu pelo diâmetro dos halos formados de acordo com os padrões estabelecidos pela *Clinical Standard Laboratory Institute* no documento M100-S22 (CSLI, 2012).

Em seguida, as bactérias foram inoculadas em Caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) em estufa a 35°C por 24h. Posteriormente transportadas para o Laboratório de Biologia Molecular (LaBMol), instalado no Centro de Estudos da Biodiversidade (CBio) na Universidade Federal de Roraima (UFRR), onde se deu prosseguimento às etapas. As amostras foram submetida à extração de DNA pelo método do choque térmico (CHAPMAN et al. 2001) com modificações segundo Brandão et al. (2017), que consiste em transferência do meio de caldo com crescimento para um microtubo de 1,5 ml, centrifugado a 6500 rpm por 10 minutos, sendo dispensado o sobrenadante e ressuspendido o precipitado em água ultrapura. Após, os microtubos foram submetidos à fervura a 100 °C por 10 minutos e rapidamente arrefecidos em freezer -80°C. Estas amostras ficaram armazenadas em freezer -20°C.

O DNA extraído de todas as amostras foi submetido à Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para a detecção dos genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} e *bla*_{CTX-M} que são codificadores de β-lactamases de espectro estendido. Foi preparada uma solução com MgCl²⁺ (1,5 μM), Tampão 1X, *Taq* DNA Polimerase (1U), dNTP (0,2 mM), iniciadores (25 pmol) e 5 μl de DNA molde diluídos em água ultrapura em quantidade suficiente para completar o volume final de 25 μl. Esta reação ocorreu em termociclador Applied Biosystems™ ProFlex 3x32 de acordo com as condições descritas na tabela 1.

Tabela 1 - Descrição dos iniciadores e condições da PCR para detecção dos genes.

Gene	Iniciadores (5'-3')	Condições para Amplificação	Tamanho (pb)
<i>bla</i> _{TEM}	F 5'-ATGAGTATTCAACATTTCCG R 5'-CTGACAGTTACCAATGCTTA	1 ciclo por 5' a 96°C 35 ciclos de 1' a 96°C; 1' a 60°C; 1' a 72°C; 1 ciclo de 10' a 72°C.	867
<i>bla</i> _{SHV}	F 5'-GGTTATGCGTTATATTCGCC R 5'-TTAGCGTTGCCAGTGCTC		867
<i>bla</i> _{CTX-M}	F 5'-ATGTGCAGYACCAGTAARGT R 5'-TGGGTRAARTARGTSACCAGA	1 Ciclo de 7' a 94°C 35 Ciclos de 50" a 94°C; 40" a 50°C; 1' a 72°C; 1 Ciclo de 5' a 72°C.	593

Fonte: Ferreira et al. (2011).

Para a identificação genotípica das espécies foi realizada PCR para o gene RNAr 16S com os iniciadores 27F (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG) e 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT), gerando um produto amplificado de ~1500pb. As condições para amplificação foram: desnaturação inicial de 5 min a 96° C, estágio com 35 ciclos, sendo um minuto a 96°C para desnaturação, um minuto a 60°C para anelamento e 2 min a 72°C para extensão, finalizando com um estágio de extensão final a 72°C por 10 min (FERREIRA et al., 2011).

Para verificar o produto amplificado, foi realizada eletroforese em gel, preparado com agarose a uma concentração de 1,8% e tampão TBE (Tris Borato de EDTA). Do amplificado de cada amostra, 5 µl foi corado com *Blue Green* (0,7 µl), adicionado azul de bromofenol e sacarose a 10% (2,0 µl) para dar peso à molécula de DNA. Foi utilizado um padrão de peso molecular (100 pb), aplicando-se 2,0 µl. Este gel foi submergido em TBE e submetido a uma corrente elétrica, e posteriormente analisado em Fotodocumentador UV MiniBis. A amplificação foi verificada pela presença de uma banda e confirmada pelo alinhamento com o marcador de peso molecular.

Foi realizada uma reação de sequenciamento de Sanger dos produtos amplificados do gene RNAr 16S para determinar genotipicamente as espécies bacterianas das cepas isoladas, de acordo com o fabricante. Para cada amostra foram realizadas duas reações a fim de gerar as sequências senso (27F) e anti-senso (1492R). Em cada reação de sequenciamento foi utilizado 1 µl de DNA amplificado, 0,3 µl de Tampão BigDye® Terminator versão 3.1 (Applied Biosystems™, USA), 1,85 µl de tampão de sequenciamento 5X (SaveMoney), 1 µl de iniciador e água ultrapura livre de nucleases suficiente para completar o volume final de 10 µl. A reação de amplificação foi realizada em termociclador, nas seguintes condições: desnaturação inicial a 96°C por um minuto; 25 ciclos com desnaturação a 96°C por 10 segundos, anelamento a 50°C por 10 minutos e extensão a 60°C por quatro minutos. O produto da reação foi submetido à purificação pela precipitação com etanol, EDTA e acetato de sódio. O produto sequenciado foi analisado em sequenciador automatizado Genetic Analyzer 3500 (Applied BioSystems™).

As sequências obtidas foram analisadas usando o *software* Geneious® versão 5.5.4 (DRUMMOND et al., 2020). Neste *software*, foi avaliada a qualidade das sequências obtidas, através da análise do eletroferograma, onde um valor de QV (do inglês *Quality Value*) indicou a qualidade. A identidade da bactéria foi determinada por meio de alinhamento das sequências consensos obtidas com sequências depositadas no Banco de Dados e Sequências Genéticas - *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) através da ferramenta *BLAST* (*Basic Local Alignment Search Tool*), que alinha as sequências através da similaridade entre elas. A similaridade considerada para esse estudo foi de > 98%.

Resultados e Discussão

Na triagem microbiológica dos efluentes coletados de três caixas sépticas do HGR e a caixa séptica biológica do HCSA, foi possível obter um total de 16 bacilos Gram-negativos, que estão descritos na tabela 2.

Tabela 2 – Espécies identificadas, perfil de sensibilidade a antibacterianos e genes codificadores de ESBL encontrados nas cepas isoladas a partir de efluentes hospitalares do Hospital Geral de Roraima e do Hospital da Criança Santo Antônio.

Ponto de amostragem	Gênero/Espécie identificadas fenotipicamente	Gênero/Espécie identificadas genotipicamente	Resistência aos antibacterianos	Genes codificadores de ESBL
HGR CS1	<i>BGN</i>	<i>Aeromonas enteropelogenes</i>	Não testado	<i>bla_{SHV}</i>
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Nenhum	<i>bla_{SHV}</i>
	<i>Enterobacter sakazaki</i>	<i>Leclercia adecarboxylata</i>	AMP, AMC, PPT, CFL, CFZ, CRX, CFO, CTX, ATM, CRO, CPM, GEN e TET.	Nenhum
	<i>Providencia retgeri</i> ¹	-	Não testado	Nenhum
HGR CS2	<i>Providencia stuarti</i>	<i>Aeromonas caviae</i>	Não testado	Nenhum
	<i>Salmonella</i> sp.	<i>Chromobacterium violaceum</i>	AMP, CFL, CRX, CFZ, CRX E CTX	<i>bla_{CTX-M}</i>
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AMP	<i>bla_{SHV}</i>
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Nenhum	<i>bla_{SHV}</i>
	<i>Citrobacter diversus</i>	<i>Phytobacter diazotrophicus</i>	NIT ²	Nenhum
HGR CS3	<i>Citrobacter</i> sp.	<i>Aeromonas caviae</i>	AMP, AMC, CFL, CRX, CFZ, CFO, CTX, CRO, CPM, ATM, PPT, SUT, TET e NAL	<i>bla_{TEM}</i>
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Escherichia coli</i>	AMP, AMC, CFL, CRX, CFZ, CFO, CTX, CRO, CPM, ATM, PPT, SUT e NAL	<i>bla_{TEM}</i> , <i>bla_{SHV}</i> e <i>bla_{CTX-M}</i>
	<i>Klebsiella</i> sp.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AMP, AMC, CFL, CRX, CFZ, CFO, CTX, CRO, CPM, ATM, PPT, SUT, LEVO, TET e NAL	<i>bla_{TEM}</i> , <i>bla_{SHV}</i> e <i>bla_{CTX-M}</i>
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Shigella sonnei</i>	CFL, CRX, CFZ, NAL e SUT	<i>bla_{CTX-M}</i>
	BGN ¹	-	Não testado	<i>bla_{TEM}</i>
HCSA CB	BGN	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	AMP, AMC, CFL, CRX, CFZ, AMI e NAL	Nenhum

BGN	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	AMP, AMC, CFL, CRX, CFZ, CFO, CRO, CTX, ATM, IMI, MER, NAL e CLO	<i>bla</i> _{CTX-M}
-----	-------------------------------	--	-----------------------------

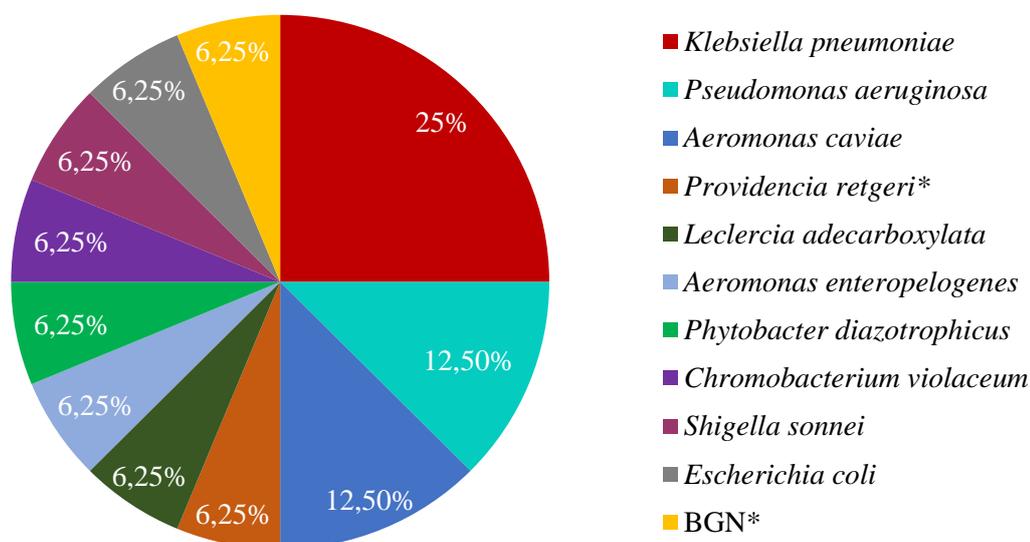
¹Espécies identificadas apenas com análise fenotípica. ²Antibiograma realizado em VITEK-2. BGN = Bacilo Gram-negativo Não Fermentador da Glicose. HGR CS1: Caixa Séptica 1 do HGR; HGR CS2: Caixa Séptica 2 do HGR; HGR CS3: Caixa Séptica 3 do HGR; HCSA CB: Caixa Biológica do HGR. AMP = ampicilina; AMC = amoxicilina/ácido clavulânico; PPT = piperacilina/tazobactam; CFL = cefalotina; CFZ = cefazolina; CRX = cefuroxima; CFO = ceftioxina; CTX = cefotaxima; CRO = ceftriaxona; CPM = cefepima; ATM = aztreonam; IMI = imipenem; MER = meropenem; AMI = amicacina; GEN = gentamicina; NAL = ácido nalidíxico; SUT = sulfatrimetopim; LEVO = levofloxacina; TET = tetraciclina; CLO = cloranfenicol; NIT = Nitrofurantoína.

Para a identificação de espécie, foi considerada aquelas identificadas genotipicamente, porém em duas cepas, a sequência obtida do gene RNAr 16S não obteve qualidade suficiente para determinar a espécie bacteriana, por isso assumiu-se o resultado obtido na análise fenotípica. Os testes para identificação fenotípica são geralmente voltados para membros da família Enterobacteriaceae, então alguns bacilos Gram-negativos não apresentam crescimento nesses meios, como os não fermentadores da glicose (ANVISA, 2013). Mas as duas técnicas de identificação foram utilizadas para complementar os resultados, de forma que a utilização da identificação fenotípica não prejudica a análise desses resultados. Como não foi possível a identificação genotípica, uma das cepas é um BGN (Bacilo Gram-negativo Não fermentador da glicose) e o outro é uma *Providencia retgeri*, uma enterobactéria.

As colônias encontradas nos efluentes hospitalares do HCSA foram pouco numerosas e morfologicamente semelhantes, das quais foram isoladas apenas duas cepas de *P. aeruginosa*, sendo uma proveniente da placa em que foi semeado o efluente bruto e outra da placa em que foi semeado o efluente diluído, porém provenientes da mesma amostra de efluente hospitalar. No total, entre cepas encontradas nos efluentes dos dois hospitais, houve prevalência da espécie *K. pneumoniae* (4) em 25% das amostras, seguida pelas espécies *P. aeruginosa* (2) e *Aeromonas caviae* (2), como pode ser visualizado no gráfico 1.

A espécie *K. pneumoniae* é um dos patógenos de maior importância clínica, muito prevalente em infecções. Sua prevalência nos efluentes hospitalares assemelha-se a prevalência clínica, e os resultados aqui observados corroboram com os achados de Zagui et al. (2020) que encontraram esta espécie principalmente em efluentes de hospitais. Este patógeno oportunista causa tanto infecções comunitárias quanto nosocomiais, devido a seus fatores de virulência e infectividade como presença de cápsula, lipopolissacarídeos (LPS), sideróforos, adesinas fimbriais e não fimbriais e a capacidade formar biofilmes em superfícies bióticas e abióticas, como em instrumentos médicos (AMMAR et al., 2019).

Gráfico 1 – Frequência relativa das espécies encontradas em efluentes hospitalares do Hospital Geral de Roraima e do Hospital da Criança Santo Antônio.



*Espécies identificadas apenas com análise fenotípica.

As infecções nosocomiais são geralmente causadas por *P. aeruginosa*, a segunda espécie em prevalência neste estudo isolada nos efluentes do HCSA. Além de fatores de virulência como formação de biofilme, essa espécie é muito conhecida pelos mecanismos de resistência intrínseca a antibacterianos, como baixa permeabilidade aos fármacos, bombas e efluxo e produção de enzimas capazes de inativar antibacterianos. E ainda conta com mecanismos de aquisição de resistência via transferência horizontal de genes e, quando submetida a pressão seletiva, indução de mutações (PANG et al., 2019). Estes resultados corroboram com os de Zagui et al. (2020) que encontraram *P. aeruginosa* como segundo patógeno mais prevalente em efluentes hospitalares. A prevalência de *K. pneumoniae* seguida de *P. aeruginosa* também foi encontrada no trabalho de Brandão et al. (2017), que encontraram 40% de prevalência de cada gênero em efluentes hospitalares de um dos hospitais públicos de Boa Vista, RR, aqui analisados.

Um importante achado foi a presença da espécie *A. caviae*, que só foi possível com a identificação genotípica, já que o gênero *Aeromonas* não é constituído por enterobactérias, e sim pertencente à família Aeromonadaceae (PESSOA et al., 2019), e a análise fenotípica de espécies através da série bioquímica é limitada a identificação de Enterobacteriaceae (ANVISA, 2013). Este gênero não foi observado nos achados de Brandão et al. (2017), sugerindo a emergência de *Aeromonas* spp. em efluentes hospitalares de Boa Vista. Este bacilo Gram-negativo é anaeróbico facultativo, oxidase-positivo capaz de fermentar a glicose, amplamente

distribuído na natureza, principalmente em ambientes aquáticos. Além disso, conta com alguns fatores de virulência como lipopolissacarídeos, cápsula e produção de toxinas, sendo considerado um patógeno emergente capaz de causar diversas infecções, como gastrointestinais e em vários outros órgãos e tecidos (PESSOA et al., 2019). Adler et al. (2014) relatam a emergência de cepas de *A. caviae* no ambiente hospitalar portando genes de resistência a β -lactâmicos. Os autores concluem que, embora a infecção por *A. caviae* seja incomum, esse patógeno pode se disseminar via efluentes e chegar até a comunidade, bem como compartilhar genes de resistência com patógenos mais prevalentes em infecções, como *K. pneumoniae*.

Foi identificada uma cepa das seguintes espécies: *Providencia retgeri* (6,25%), *Shigella sonnei* (6,25%), *Escherichia coli* (6,25%), *Aeromonas enteropelogenes* (6,25%), *Leclercia adecarboxylata* (6,25%), *Phytobacter diazotrophicus* (6,25%), *Chromobacterium violaceum* (6,25%) e um BGN (6,25%). O isolamento dessas espécies demonstrou a presença variada de Gram-negativas em efluentes hospitalares. Estes resultados corroboram em parte com Roderová et al. (2016) que encontraram apenas uma cepa de *E. coli* e uma de *P. retgeri*, no segundo ano de coleta, mas nenhuma cepa de *S. sonnei*. Já Adelowo et al. (2017) não só encontraram cepas de *P. retgeri* e *S. sonnei* como várias cepas de *E. coli* em efluentes hospitalares e corpos hídricos diretamente impactados por descarga desses efluentes. Esses achados sugerem que embora *E. coli* possa ser rotineiramente encontrada em efluentes hospitalares, *P. retgeri* e *S. sonnei* são incomuns.

Outras bactérias não muito comuns na rotina clínica foram identificadas genotipicamente, como as espécies *C. violaceum* (6,25%), *L. adecarboxylata* (6,5%) e *P. diazotrophicus* (6,5%), sendo estas duas últimas pertencentes à família Enterobacteriaceae. A espécie *L. adecarboxylata* é um bacilo Gram-negativo, lactose positivo que pode ser erroneamente identificado como *E. coli* em testes bioquímicos. Apesar de ser uma espécie amplamente distribuída no ambiente, inclusive aquático, vários estudos de caso reportam essa espécie como um patógeno oportunista emergente causando infecções como peritonite, bacteremia e endocardite (ADAPA et al., 2019; MATSUURA; SUGIYAMA, 2018). No entanto, neste estudo, a *L. adecarboxylata* foi identificada como *E. sakazaki* nos testes bioquímicos, sugerindo que esta espécie pode ser erroneamente identificada fenotipicamente como outras enterobactérias ou mais parâmetros devem ser incluídos na série bioquímica para melhorar a acurácia.

A espécie *P. diazotrophicus* foi caracterizada pela primeira vez como uma bactéria fixadora de nitrogênio associada ao arroz. Essa espécie pertencente à família Enterobacteriaceae é anaeróbica facultativa, fermentadora da glicose, oxidase negativa, com motilidade e redutora de nitratos (ZHANG et al., 2008). Nenhuma pesquisa foi encontrada

relatando essa espécie como causadora de infecções em humanos ou animais, mas foi encontrada em rio de água doce, inferindo que esta espécie pode fazer parte da microbiota aquática, embora não seja tão comum (LEE et al., 2020).

No crescimento em placa foi possível identificar apenas uma colônia de *C. violaceum*, com aspecto enegrecido. Esta bactéria pertence à família Neisseriaceae, é um cocobacilo Gram-negativo, anaeróbico facultativo, oxidase e catalase positivo e com motilidade, da qual são isolados antibióticos como o violacein e o precursor do monobactam, sendo o primeiro responsável pela pigmentação violeta das colônias. Esta bactéria é geralmente associada ao ambiente, mas tem sido considerada um patógeno oportunista emergente causando infecções com alta taxa de mortalidade (BATISTA; NETO, 2017; KOTHARI; SHARMA; PADIA, 2017). No presente estudo, uma cepa de *C. violaceum* demonstrou resistência a seis fármacos diferentes e portadora do gene *bla_{CTX-M}*. Esses resultados indicam que esta espécie pode estar associada a infecções como um patógeno emergente.

Das 16 cepas isoladas de efluentes hospitalares, 11 foram submetidas ao antibiograma pela técnica de Disco Difusão de Kirby e Bauer, enquanto o isolado de *P. diazotrophicus* foi submetido ao antibiograma automatizado em VITEK®2. Como os antibacterianos utilizados pelos dois testes eram diferentes em tipo e número, apenas o resultado das 11 cepas analisadas pelo disco difusão em placa estão plotados no gráfico 2.

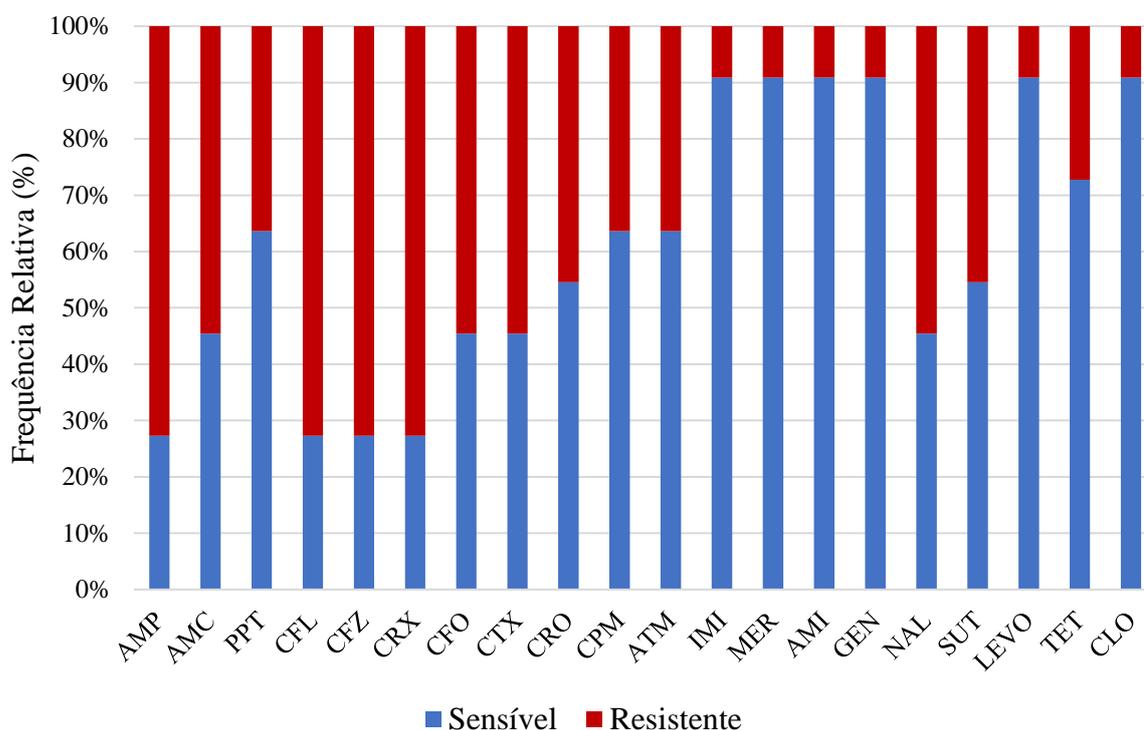
Dentre as 11 cepas testadas pelo disco difusão, 72,73% (8) foram resistentes a ampicilina, cefalotina, cefazolina e cefuroxima. Os resultados para resistência a cefalosporinas diminuem visualmente no gráfico 2 conforme o fármaco pertence a uma classe mais recente de cefalosporinas, ao ponto que a resistência a cefepima, de quarta geração, é de 36,36% (4).

Das 12 cepas com perfil de sensibilidade a antibacterianos caracterizado, 41,67% (5) foram positivas para a produção de enzimas ESBL. Estes achados divergem de Brandão et al. (2017) que encontraram de 90% a 100% de resistência às cefalosporinas até a quarta geração. Esta divergência pode ter ocorrido porque na triagem microbiológica os autores consideraram apenas as cepas fenotipicamente produtoras de ESBL para a caracterização genética, enquanto neste estudo foram analisadas geneticamente até aquelas que não apresentaram fenótipo para a produção de ESBL.

Uma cepa de *P. aeruginosa* encontrada nos efluentes hospitalares do HCSA foi resistente ao imipenem e meropenem, sugerindo a produção de carbapenemases. Além disso, essa cepa apresentou resistência ao ácido nalidíxico e cloranfenicol e foi caracterizada como positiva para a produção de ESBL. Estes resultados divergem dos de Zagui et al. (2020) em que as cepas de *P. aeruginosa* eram resistentes apenas a cefoxitina e aztreonam. Em contrapartida, a outra cepa de esta espécie foi a única a apresentar resistência ao aminoglicosídeo amicacina, mas esta

não foi caracterizada como produtora de ESBL, apresentando sensibilidade a cefalosporinas de terceira e quarta geração e aos carbapenêmicos. Prickett et al. (2016) relataram *P. aeruginosa* resistentes a amicacina em pacientes com infecção crônica, corroborando com o presente estudo. Este resultado sugere que nos efluentes pode ocorrer resistência a outras classes de antibacterianos, além de β -lactâmicos.

Gráfico 2 – Perfil de sensibilidade a antibacterianos determinado pela técnica disco difusão para onze cepas de bactérias Gram-negativas provenientes dos efluentes hospitalares do Hospital Geral de Roraima e Hospital da Criança Santo Antônio.



AMP = ampicilina; AMC = amoxicilina/ácido clavulânico; PPT = piperacilina/tazobactam; CFL = cefalotina; CFZ = cefazolina; CRX = cefuroxima; CFO = cefoxitina; CTX = cefotaxima; CRO = ceftriaxona; CPM = cefepima; ATM = aztreonam; IMI = imipenem; MER = meropenem; AMI = amicacina; GEN = gentamicina; NAL = ácido nalidíxico; SUT = sulfatrimetropim; LEVO = levofloxacina; TET = tetraciclina; CLO = cloranfenicol.

Outro dado importante é que 54,55% (6) das bactérias testadas possuíam resistência ao ácido nalidíxico, que é uma quinolona. A resistência a esse fármaco já foi relatada por Campioni et al. (2017) em cepas de *Salmonella* isoladas de humanos, comidas e fazendas no Brasil. Os autores alertam para o perigo da falha terapêutica na administração desse antibacteriano e atribuem a resistência a uma mutação de um gene cromossomal. Como as bactérias encontradas no presente estudo não são do mesmo gênero, este ou outros fatores podem estar influenciando nesta resistência. Além disso, algumas cepas resistentes ao ácido nalidíxico também foram positivas para a produção de ESBL. A resistência a quinolonas associada com a produção de

ESBL também foi observada por Farajzadehsheikh et al. (2019), corroborando com os resultados aqui observados.

Já a *P. diazotrophicus* analisada pelo VITEK®2 foi sensível a ampicilina, amoxicilina/ácido clavulânico, piperacilina/tazobactam, cefalotina, cefuroxima, cefuroxima/axetil, ceftriaxona, cefepima, imipenem, ertapenem, meropenem, ácido nalidíxico, ciprofloxacina, norfloxacina e sulfatrimetropim, sendo resistente apenas a nitrofurantoína. Esta não apresentou as características de produção de ESBL, indicada pela resistência principalmente às cefalosporinas e o resultado fornecido pela análise confirmou negatividade para ESBL.

Todas as cepas foram submetidas à PCR para identificação de três genes de resistência: *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}* e *bla_{CTX-M}*, dentre as quais 11 (68,75%) cepas foram portadoras de pelo menos um desses genes e em cinco nenhum gene foi detectado. Das 12 bactérias submetidas ao teste de sensibilidade a antibacterianos 75% (9) possuíam pelo menos um gene codificador de ESBL investigado. A tabela 3 mostra os pontos de amostragem dos efluentes hospitalares e qual gene foi encontrado em cada.

Tabela 3 – Frequência absoluta de bactérias portadoras de genes codificadores de ESBL em cada ponto de amostragem de efluentes hospitalares do Hospital Geral de Roraima e Hospital da Criança Santo Antônio.

Ponto de amostragem	Nº de cepas identificadas	Genes de Resistência encontrados			
		TEM	SHV	CTX-M	TEM + SHV + CTX-M
HGR CS1	2	0	2	0	0
HGR CS2	3	0	2	1	0
HGR CS3	5	2	0	1	2
HCSA CB	1	0	0	1	0
TOTAL	11	2	4	3	2

HGR CS1: Caixa Séptica 1 do HGR; HGR CS2: Caixa Séptica 2 do HGR; HGR CS3: Caixa Séptica 3 do HGR; HCSA CB: Caixa Biológica do HGR

Foi possível encontrar bactérias portadoras de genes de resistência em efluentes hospitalares de todas as caixas sépticas investigadas. Houve prevalência do gene *bla_{SHV}* (54,5%) entre as bactérias analisadas, seguido do gene *bla_{CTX-M}* em 45,4% das bactérias, além da ocorrência simultânea dos três genes em duas cepas. A prevalência do gene *bla_{SHV}* no presente estudo, diverge da encontrada por Brandão et al. (2017), cuja prevalência foi do gene *bla_{TEM}*. Mas os autores encontraram duas cepas portadoras dos três genes investigados simultaneamente, o que corrobora com o presente estudo em que foram encontradas também duas cepas portadoras dos três genes simultaneamente, discutido mais adiante.

Na caixa séptica 3 do HGR é onde ocorre a confluência dos efluentes de todo o hospital e é interligada direto a rede de esgoto da cidade, e foi o local que apresentou maior número de bactérias portadoras de gene de resistência. Além disso, neste sítio foram encontradas duas cepas (*K. pneumoniae* e *E. coli*) portadoras dos três genes investigados simultaneamente. Dentre as duas cepas de *P. aeruginosa* isoladas a partir dos efluentes de confluência do HCSA, em apenas uma, com o fenótipo positivo para ESBL, foi possível encontrar o gene *bla_{CTX-M}*.

Das cinco cepas com perfil fenotípico da produção de enzimas ESBL, foi possível confirmar a presença de pelo menos um dos genes investigados em quatro cepas. Estes resultados sugerem a presença de outros genes codificadores de ESBL ocorrendo na cepa de *L. adecarboxylata* (PIOTROWSKA; KOWALSKA; POPOWSKA, 2019). Outra possibilidade é que algum dos três genes estudados não tenha amplificado na PCR.

Em quatro bactérias com perfil de sensibilidade a antibacterianos caracterizado como não produtora de ESBL, foram encontrados os genes *bla_{SHV}* em três cepas (todas da espécie *K. pneumoniae*) e o gene *bla_{CTX-M}* em uma cepa (*S. sonnei*). Alguns trabalhos já relatam que o fenótipo e genótipo não convergem em 100%, ou seja, a bactéria pode possuir o gene de resistência e não expressar a enzima. Um dos motivos pode ser atribuído a mutações de base única que causam deformação no sítio ativo da enzima, levando a sua inativação (GORDON et al., 2014; MORADIGARAVAND et al., 2018). E os resultados aqui observados corroboram com a não convergência de 100% entre fenótipo e genótipo, sugerindo que essas cepas possam ser reservatórios dos genes de resistência detectados.

Das quatro bactérias que não tiveram perfil de sensibilidade a antibacterianos caracterizados, foi possível encontrar os genes *bla_{TEM}* e *bla_{SHV}* em duas cepas (*A. enteropelogenes* e BGN), separadamente.

No principal hospital de saúde pública de Boa Vista, todas as cepas isoladas a partir da caixa de confluência, que lança efluentes diretamente na rede de esgoto, foram portadoras de genes codificadores de ESBL. Este resultado corrobora para os efluentes hospitalares serem considerados como a principal fonte de disseminação de genes de resistência no ambiente (AL SALAH et al., 2020; LORENZO et al., 2018; WALIA et al., 2016; ZAGUI et al., 2020). Além disso, representa um risco direto aos funcionários do hospital que trabalham diretamente com o setor sanitário, que, às vezes, não possuem paramentação adequada. Vários trabalhos realizados no Brasil relatam a presença dessas bactérias portadoras de genes ESBLs em estações de tratamento de esgoto, que, apesar do fator de diluição com efluentes domésticos e outras fontes, são capazes de chegar até mesmo em rios e lagos próximos às cidades (BARTLEY et al., 2019; BOGER et al., 2020; SANCHEZ et al. 2018; ZAGUI et al., 2020). Este trabalho

corroborar com os achados de Brandão et al. (2017) que realizaram a detecção de cepas portadoras dos genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} e *bla*_{CTX-M} no Hospital Geral de Roraima.

Conclusão

Os resultados apontam para a maior taxa de cepas produtoras de ESBL em efluentes hospitalares na caixa de confluência ligada diretamente ao sistema de coleta sanitária da cidade de Boa Vista, Roraima, Brasil. Sendo assim, os efluentes hospitalares são uma potencial fonte de resistência bacteriana no esgoto, com grande potencial de disseminação no ambiente. Os resultados dessa pesquisa apontam para a necessidade de vigilância sanitária e controle da disseminação de resistência bacteriana a antibacterianos na saúde pública. Controlar a disseminação dessa multirresistência mostra-se urgente, uma vez que bactérias nativas do ambiente podem adquirir genes de resistência via transferência horizontal e tornarem-se reservatórios ambientais. A implantação de sistemas de tratamento de resíduos líquidos específicos no hospital, antes que os efluentes sejam emitidos na rede de esgoto pode ser uma forma de minimizar esses impactos.

Referências

- ADAPA, S. et al. Peritonitis from *Leclercia adecarboxylata*: An emerging pathogen. **Clinical case reports**, Hoboken, v. 7, n. 4, p. 829, 2019.
- ADELOWO, O. O. et al. Extended Spectrum Beta-Lactamase (ESBL)-producing bacteria isolated from hospital wastewaters, rivers and aquaculture sources in Nigeria. **Environmental Science and Pollution Research**, Switzerland, v. 25, n. 3, p. 2744-2755, 2018.
- ADLER, A. et al. Emergence of VIM-producing *Aeromonas caviae* in Israeli hospitals. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Oxford, v. 69, n. 5, p. 1211-1214, 2014.
- AL SALAH, D. M. M. et al. Hospital wastewaters: A reservoir and source of clinically relevant bacteria and antibiotic resistant genes dissemination in urban river under tropical conditions. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Amsterdam, v. 200, [s.n], p. 110767, 2020.
- AMMAR, A. M. et al. An overview of virulence, antimicrobial resistance, biofilm formation and antibiofilm strategies of *Klebsiella* species. **Advances in Animal and Veterinary Sciences**, Punjab, v. 7, n. 2, p. 107-116, 2019.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde: Módulo 6: Detecção e identificação de bactérias de importância médica**. Brasília: ANVISA, 2013. 150 p.

BARTLEY, P. S. et al. Antibiotic resistance in Enterobacteriaceae from surface waters in urban Brazil highlights the risks of poor sanitation. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, Arlington, v. 100, n. 6, p. 1369-1377, 2019.

BATISTA, J. H.; NETO, J. F. S. *Chromobacterium violaceum* pathogenicity: updates and insights from genome sequencing of novel Chromobacterium species. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 8, [s.n], p. 2213, 2017.

BLAIR, J. M. A. et al. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature reviews: Microbiology**, London, v. 13, n. 1, p. 42-51, jan. 2015.

BÖGER, B. et al. Occurrence of antibiotics and antibiotic resistant bacteria in subtropical urban rivers in Brazil. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 402, [s.n], p. 123448, 2020.

BRANDÃO, M. B. S. et al. Isolation of Extended-Spectrum Beta-Lactamases Producing Strains on Effluent of State Hospital from Boa Vista-RR. **Electronic Journal of Management, Education and Environmental Technology (REGET)**, Santa Maria, v. 21, n. 3, p. 248-258, 2017.

BUELOW, E. et al. Hospital discharges in urban sanitation systems: Long-term monitoring of wastewater resistome and microbiota in relationship to their eco-exposome. **Water research X**, Amsterdam, v. 7, [s.n], p. 100045, 2020.

CAMPIONI, F. et al. Prevalence of gyrA mutations in nalidixic acid-resistant strains of *Salmonella* Enteritidis isolated from humans, food, chickens, and the farm environment in Brazil. **Microbial Drug Resistance**, New York, v. 23, n. 4, p. 421-428, 2017.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. CDC. **Antibiotic/Antimicrobial Resistance (AR/AMR)**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/drugresistance/>> Acesso em: 13 out. 2020.

CHAPMAN, P. A. *et al.* Comparison of culture, PCR and immunoassays for detecting *Escherichia coli* O157 following enrichment culture and immunomagnetic separation performed on naturally contaminated raw meat products. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 68, n. 1, p. 11-20, 2001.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing - Twenty Second Information Supplement. M100-S22. **Clinical Laboratory and Standard Institute**, v.32, n.3, jan. 2012.

DE BUS, L. et al. Impact of de-escalation of beta-lactam antibiotics on the emergence of antibiotic resistance in ICU patients: a retrospective observational study. **Intensive care medicine**, Basel, v. 42, n. 6, p. 1029-1039, 2016.

DRUMMOND, A. J. et al. **Geneious versão 5.5.4**, 2011. Disponível em: <<http://www.geneious.com/>>. Acesso em: 5 out. 2020.

ETEUBU, E.; ARIKEKPAR, I. Antibiotics: Classification and mechanisms of action with emphasis on molecular perspectives. **International Journal of Applied Microbiology and Biotechnology Research**, London, v. 4, [s.n], p. 90-101, 2016.

FARAJZADEHSHEIKH, A. et al. Frequency of quinolone resistance genes among extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infections. **Tropical Medicine and Health**, London, v. 47, n. 1, p. 19, 2019.

FERREIRA, C. M. et al. Extended-Spectrum Beta-Lactamase-producing bacteria isolated from hematologic patients in Manaus, state of Amazonas, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 42, n. 3, p. 1076-1084, jul./set. 2011.

GORDON, N. C. et al. Prediction of *Staphylococcus aureus* antimicrobial resistance by whole-genome sequencing. **Journal of clinical microbiology**, Washington, v. 52, n. 4, p. 1182-1191, 2014.

HUDZICKI, J. Kirby-Bauer disk diffusion susceptibility test protocol. **American Society for Microbiology**, Washington, [s.v], [s.n], p. 1-23, dez. 2009.

KOTHARI, V.; SHARMA, S.; PADIA, D.. Recent research advances on *Chromobacterium violaceum*. **Asian Pacific journal of tropical medicine**, Haikou, v. 10, n. 8, p. 744-752, 2017.

LEE, C. et al. A report of 37 unrecorded anaerobic bacterial species isolated from the Geum River in South Korea. **Journal of Species Research**, South Korea, v. 9, n. 2, p. 105-116, 2020.

LOPATKIN, A. J. et al. Antibiotics as a selective driver for conjugation dynamics. **Nature microbiology**, London, v. 1, n. 6, p. 16044, 2016.

LORENZO, P. et al. Antibiotic resistance in urban and hospital wastewaters and their impact on a receiving freshwater ecosystem. **Chemosphere**, Amsterdam, v. 206, [s.n], p. 70-82, 2018.
MATSUURA, H.; SUGIYAMA, S. Sepsis and *Leclercia adecarboxylata*. **QJM: An International Journal of Medicine**, Oxford, v. 111, n. 10, p. 733-734, 2018.

MORADIGARAVAND, D. et al. Prediction of antibiotic resistance in *Escherichia coli* from large-scale pan-genome data. **PLoS computational biology**, San Francisco, v. 14, n. 12, p. 1-17, 2018.

PANG, Z. et al. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. **Biotechnology advances**, Amsterdam, v. 37, n. 1, p. 177-192, 2019.

PARAJULI, N. P. et al. High burden of antimicrobial resistance among gram negative bacteria causing healthcare associated infections in a critical care unit of Nepal. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, London, v. 6, n. 1, p. 1-9, 2017.

PATERSON, D. L. 313 – Infections due to other members of the Enterobacteriaceae, including management of multidrug-resistant strains. In: GOLDMAN, L.; SCHAFER, A. I. **Goldman Cecil Medicine**. Philadelphia: Elsevier, 2012. p. 1874-1877.

PESSOA, R. B. G. et al. The genus *Aeromonas*: a general approach. **Microbial pathogenesis**, Amsterdam, v. 130, [s.n], p. 81-94, 2019.

PIOTROWSKA, M.; KOWALSKA, S.; POPOWSKA, M. Diversity of β -lactam resistance genes in gram-negative rods isolated from a municipal wastewater treatment plant. **Annals of Microbiology**, London, v. 69, n. 6, p. 591-601, 2019.

RAFRAF, I. D. et al. Abundance of antibiotic resistance genes in five municipal wastewater treatment plants in the Monastir Governorate, Tunisia. **Environmental Pollution**, Amsterdam, v. 219, [s.n.], p. 353-358, 2016.

RAHMAN, S. U. et al. The growing genetic and functional diversity of extended spectrum beta-lactamases. **BioMed research international**, London, v. 2018, [s.n], p. 1-14, 2018.

ROEDEROVÁ, M. et al. Occurrence of bacteria producing broad-spectrum beta-lactamases and qnr genes in hospital and urban wastewater samples. **New Microbiologica**, Bologna, v. 39, n. 2, p. 124-33, 2016.

SANCHEZ, D. G. et al. Detection of different β -lactamases encoding genes, including *bla* NDM, and plasmid-mediated quinolone resistance genes in different water sources from Brazil. **Environmental monitoring and assessment**, London, v. 190, n. 7, p. 407, 2018.

Universidade Federal de Roraima, Instituto Federal de Roraima. Márcia Brazão e Silva Brandão; Derlano Bentes Capucho; Fabiana Granja. **Coletor de Efluentes em Profundidade**. BR n. 202018009448, 10 maio 2018, 10 maio 2028.

VELASCO, M. F. Surface water treatment for the attendance of Riverside Communities of the Brazilian Amazon. **International Journal of Advanced Engineering Research and Science**, Jaipur, v. 7, n. 3, p. 87-99, 2020.

WALIA, S. et al. Quantitation of antibiotic resistance genes pollution in hospital wastewater effluent and Urban Clinton River Water, Michigan, USA. **Current Medicine Research and Practice**, Amsterdam, v. 6, n. 4, p. 149-151, 2016.

ZAGUI, G. S. et al. Gram-negative bacteria carrying β -lactamase encoding genes in hospital and urban wastewater in Brazil. **Environmental monitoring and assessment**, Basel, v. 192, n. 6, p. 1-11, 2020.

ZHANG, G. X. et al. Diverse endophytic nitrogen-fixing bacteria isolated from wild rice *Oryza rufipogon* and description of *Phytobacter diazotrophicus* gen. nov. sp. nov. **Archives of microbiology**, London, v. 189, n. 5, p. 431-439, 2008.

3 CAPÍTULO II

Bactérias Gram-negativas portadoras de genes codificadores de β -lactamases de Espectro Estendido (ESBL) em efluentes urbanos da estação de tratamento de esgoto da cidade de Boa Vista, Roraima, Brasil.

Introdução

A água é um recurso natural amplamente utilizado pela humanidade, com aplicações industriais, domésticas, hospitalares e comerciais. Como um recurso essencial à vida, a água para consumo humano deve manter o mais alto padrão de qualidade. O ciclo urbano da água inicia-se na captação a partir de um corpo hídrico natural, tratamento da água, distribuição, utilização, geração de resíduos líquidos, coleta pela rede de esgoto, tratamento de efluentes urbanos e devolução para corpo hídrico receptor, em um ponto à jusante da captação, quando ambos processos são realizados no mesmo corpo hídrico (PEÑA-GUZMÁN et al., 2017). O tratamento de efluentes deve ser eficiente para minimizar impactos negativos para o ambiente, para a saúde humana e o ecossistema inteiro.

Os resíduos líquidos urbanos contêm uma alta concentração de contaminantes químicos e biológicos que podem causar danos ao ecossistema no qual são descarregados (CRINI; LICHTFOUSE, 2019). Com a finalidade de diminuir a concentração desses contaminantes, muitas cidades contam com Estações de Tratamento de Esgotos (ETE). O processo mais utilizado pelas ETES no Brasil é através de lagoas de estabilização, em que são utilizados de processos microbiológicos para degradação da matéria orgânica (LIU; HALL; CHAMPAGNE, 2018).

Efluentes hospitalares possuem uma alta carga de micro-organismos patogênicos e fármacos eliminados via resíduos líquidos. Entre eles, destacam-se as bactérias patogênicas principalmente Gram-negativas, que causam infecções no trato respiratório inferior, trato urinário e gastrointestinal, aumentando a morbimortalidade dos pacientes acometidos (KARLOWSKY et al., 2017; NEPAL et al., 2017). Os fármacos utilizados no combate a infecções bacterianas são os antibacterianos, amplamente administrados no ambiente hospitalar. Por volta de 30% da concentração dos antibacterianos são metabolizados pelo organismo humano, e 70% da concentração administrada é eliminada pelas excretas de pacientes (KÜMMERER, 2009). Os efluentes hospitalares podem contribuir com 13% no verão e 28% no inverno na descarga de antibacterianos em efluentes urbanos (AYDIN et al., 2018). Além dos fármacos, os micro-organismos também são eliminados. Tudo isso configura os

efluentes como um ambiente favorável à aquisição e disseminação de bactérias multirresistentes no ambiente (LORENZO et al., 2018).

Uma preocupação emergente é a resistência bacteriana a antibacterianos frequentemente aplicados no tratamento de infecções. A principal classe desses fármacos frequentemente indicada para terapia são os β -lactâmicos de amplo espectro de ação, que nos EUA é prescrito em 65% dos casos de infecções (BUSH; BRADFORD, 2016). Os β -lactâmicos possuem ação bactericida, interrompendo a síntese de parede celular e levando a morte celular da bactéria. Nesta classe, incluem-se as penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos (BUSH; BRADFORD, 2016). Algumas bactérias, no entanto, possuem genes codificadores de enzimas β -lactamases de espectro estendido (ESBL), que são capazes de hidrolisar o anel β -lactâmico levando a inativação do antibacteriano e a falha terapêutica (SULTAN et al., 2018).

Estes genes frequentemente estão em elementos genéticos móveis, como plasmídeos e *transposons*, que podem ser transferidos entre as bactérias através de conjugação (BUSH, 2018). Alguns dos genes mais frequentes incluem aqueles capazes de codificar enzimas que hidrolisam penicilinas, monobactâmico e cefalosporinas de terceira e quarta geração, como os genes *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}* e *bla_{CTX-M}* (SULTAN et al., 2018). Muitas infecções bacterianas podem prolongar a internação do paciente, e a multirresistência bacteriana cada vez mais frequente pode restringir as opções de tratamento, aumentando a mortalidade (IRIDELL; BROWN; TAGG, 2016).

As ETEs recebem descarga pesada de resíduos de fármacos e bactérias Gram-negativas, algumas multirresistentes, coletados pelo sistema municipal de esgoto. Logo as ETEs são locais ótimos para a aquisição e disseminação de resistência bacteriana no ambiente, considerando que é um ambiente favorável tanto para a seleção quanto para transferência horizontal de genes entre as bactérias durante o processo de tratamento de águas residuais (LORENZO et al., 2018). Muitos trabalhos recentes vêm relatando a disseminação de altos níveis de resistência a antibacterianos em efluentes tratados em ETEs (BUELOW et al., 2020; HONDA et al., 2020; WALIA et al. 2016).

A maior preocupação ambiental é que os corpos hídricos sejam transformados em reservatório para a resistência bacteriana. Quando um rio ou igarapé recebe descargas contínuas de efluentes contaminados com bactérias multirresistentes, estas podem transferir a cópia do plasmídeo portador dos genes para bactérias não patogênicas comuns do ambiente aquático (SELLERA et al., 2018). Os peixes e demais animais aquáticos podem adquirir bactérias multirresistentes que parasitam seus tecidos (BOLLACHE et al., 2019). Além dos usos frequentes de água tratada pela população de uma cidade, comunidades ribeirinhas e nativas da Amazônia brasileira utilizam água diretamente do rio com pouco ou nenhum tratamento

(VELASCO, 2020). Com um corpo d'água reservatório de multirresistência bacteriana a antibacterianos, a probabilidade de contato das pessoas com essas bactérias através do consumo de água e animais aquáticos aumenta consideravelmente.

Considerando a ameaça que a multirresistência bacteriana representa para a qualidade da água, um recurso natural de vital importância, é fundamental encontrar meios de minimizar ou evitar essa contaminação. Boa Vista, no estado de Roraima, Brasil, tem poucos estudos relacionados a detecção de bactérias portadoras de genes de multirresistência em efluentes urbanos. Portanto, essa pesquisa tem como objetivo caracterizar o perfil de resistência a antibacterianos das bactérias Gram-negativas de efluentes da estação de tratamento de esgotos da cidade de Boa Vista-RR, por meio do perfil fenotípico e detecção de genes codificadores de ESBL.

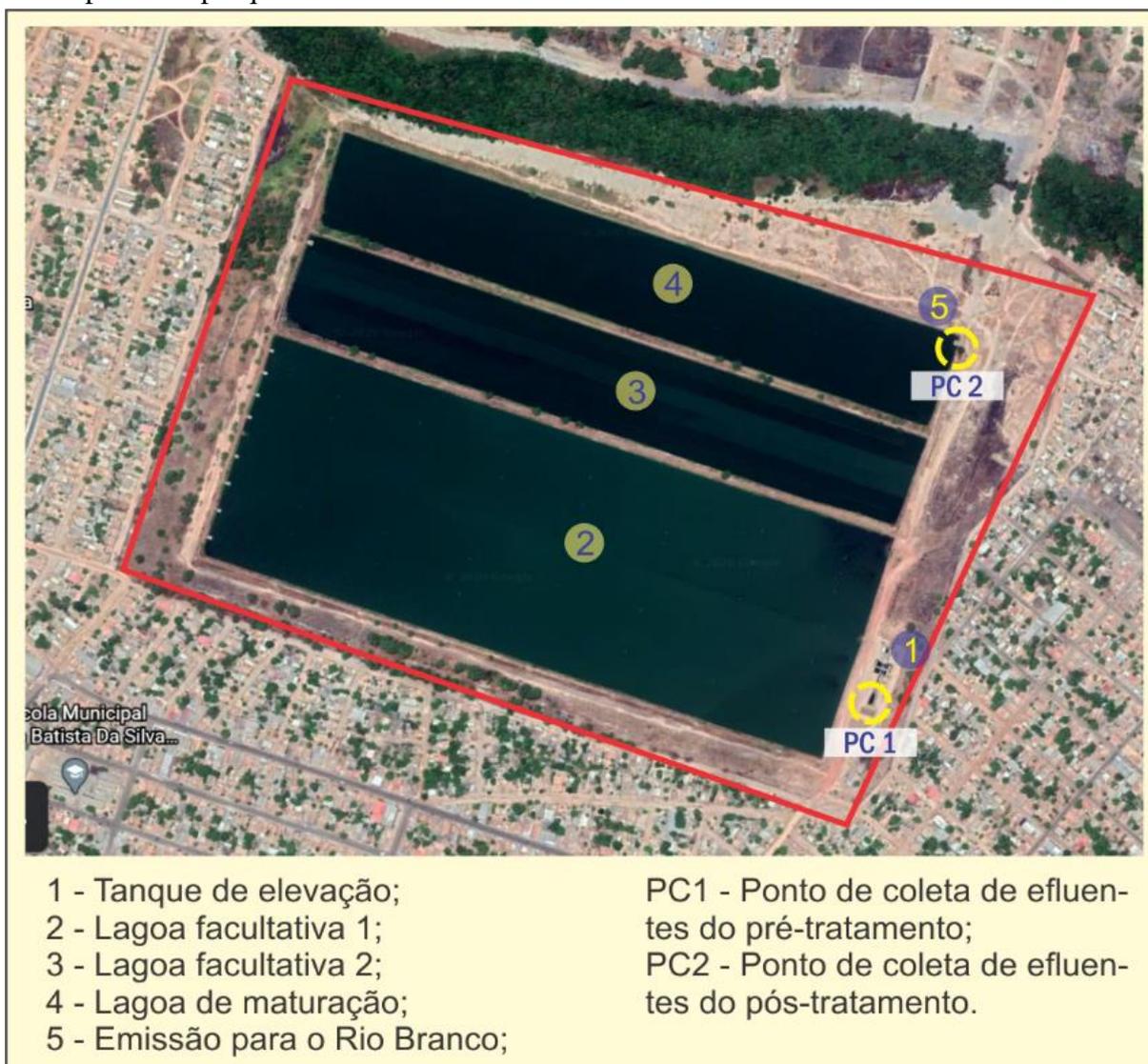
Material e Métodos

Para verificar a persistência de bactérias patogênicas em efluentes urbanos, foram coletados efluentes da Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) do município de Boa Vista-RR. A ETE conta com o sistema de tratamento por lagoas de estabilização, com as seguintes etapas: gradeamento das águas residuais em seu estado bruto, para separação de partículas sólidas; lagoa facultativa para degradação microbiológica de matéria orgânica; e lagoa de maturação para eliminação de micro-organismos patogênicos. A partir da lagoa de maturação, os efluentes tratados seguem por um emissário até deságue no Rio Branco, à jusante da captação. Na estação, foram coletadas amostras das águas residuais pré-tratamento, após o gradeamento, e amostras do pós-tratamento, no ponto em que a água escoava para o emissário (Figura 1).

Para a coleta de efluentes urbanos foi utilizado um modelo protótipo do coletor de efluentes em profundidade (depósito de patente BR nº 202018009448), e se deu de acordo com Brandão et al. (2017). Foram realizadas duas coletas, sendo a primeira em abril de 2019 e a segunda em março de 2020. Em ambas, o coletor foi submerso aberto, pois não havia lodo superficial, numa profundidade de 30 cm e retirado da lagoa contendo 15 ml do resíduo líquido. Na segunda coleta, os efluentes pós-tratamento foram coletados a 30 cm e 50 cm de profundidade, pois as enterobactérias possuem metabolismo facultativo e podem ter ampla distribuição na coluna d'água. Os efluentes coletados foram armazenados em caixa térmica para imediato transporte até o Laboratório de Bacteriologia do Laboratório Central de Roraima (LACEN-RR). Da coleta até o processamento microbiológico o tempo de transporte foi de 30 minutos.

O material coletado foi diluído em solução salina na concentração de 1:10. Em seguida, o efluente foi semeado em ágar MacConkey a partir da diluição e diretamente do material coletado sem repetições, e as placas foram inoculadas em estufa a 35°C por 24h. Após o crescimento de colônias bacterianas, foi realizada inoculação de colônias puras em ágar MacConkey, selecionadas de acordo com a morfologia da colônia em cada placa.

Figura 1 – Visão aérea da Estação de Tratamento de Esgoto da CAER em Boa Vista-RR, delimitando sua área e identificando o tanque de elevação, as lagoas do tratamento e pontos de coleta para esta pesquisa.



- 1 - Tanque de elevação;
- 2 - Lagoa facultativa 1;
- 3 - Lagoa facultativa 2;
- 4 - Lagoa de maturação;
- 5 - Emissão para o Rio Branco;

- PC1 - Ponto de coleta de efluentes do pré-tratamento;
- PC2 - Ponto de coleta de efluentes do pós-tratamento.

A partir das colônias puras, foi realizada a identificação fenotípica de bactérias Gram-negativas através da série bioquímica (ANVISA, 2013), em que foram analisados seis parâmetros: citrato de Simmons, TSI (*Triple Sugar Iron*), SIM (*Sulphide Indole Motility*), Fenilalanina, Malonato e LIA (*Lysine Iron Agar*). Os tubos de ensaio foram inoculados em

estufa a 35°C por 24h. Os resultados foram interpretados de acordo com as recomendações da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2013).

Concomitante à identificação de espécies foi realizado o Teste de Sensibilidade a Antibacterianos (TSA) pelo sistema automatizado VITEK®2. A colônia pura de bactéria foi diluída em solução salina na concentração de 0,5 na escala de McFerland. A partir deste preparo, foi diluído novamente numa proporção de 1:10 e inoculado na cartela do VITEK®2 para análise, com os seguintes antibacterianos: ampicilina, amoxicilina/ácido clavulânico, cefepima, cefuroxima, cefuroxima/axetil, cefalotina, ceftriaxona, ertapenem, meropenem, ácido nalidíxico, ciprofloxacina, norfloxacina, nitrofurantoína, piperacilina/tazobactam, sulfazotrim, amicacina e gentamicina. Esta cartela foi escolhida pois abrangia os principais fármacos empregados na rotina clínica para infecções causadas por bactérias Gram-negativas. O sistema automatizado fornece os resultados com a Concentração Mínima Inibitória (MIC) e a interpretação categórica de S (sensível), I (intermediário) e R (resistente) de acordo com os padrões estabelecidos pela *Clinical Standard Laboratory Institute* no documento M100 (CSLI, 2018).

Em seguida, as bactérias foram inoculadas em Caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) e incubadas em estufa a 35°C por 24h. Posteriormente foram transportadas para o Laboratório de Biologia Molecular (LaBMol), instalado no Centro de Estudos da Biodiversidade (CBio) na Universidade Federal de Roraima (UFRR), onde se deu prosseguimento às etapas. As amostras foram submetida à extração de DNA pelo método do choque térmico (CHAPMAN et al. 2001) com modificações segundo Brandão et al. (2017), que consiste em transferência do meio de cultura com crescimento para um microtubo de 1,5 ml, que é centrifugado a 6500 rpm por 10 minutos, em seguida, dispensa-se o sobrenadante e ressuspende-se o precipitado em água ultrapura. Depois os microtubos foram submetidos à fervura a 100 °C por 10 minutos e rapidamente arrefecidas em freezer -80°C. Estas amostras ficaram armazenadas em freezer -20°C.

O DNA extraído de todas as amostras foi submetido à Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para a detecção dos genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} e *bla*_{CTX-M} que são codificadores de β-lactamases de espectro estendido (ESBL). Foi preparada uma solução com MgCl²⁺ (1,5 μM), Tampão 1X, *Taq* DNA Polimerase (1U), dNTP (0,2 mM), iniciadores (25 pmol) e 5 μl de DNA molde diluídos em água ultrapura em quantidade suficiente para completar o volume final de 25 μl. Esta reação ocorreu em termociclador Applied Biosystems ProFlex 3x32, segundo as condições descritas na tabela 1.

Tabela 1 - Descrição dos iniciadores e condições da PCR para detecção dos genes.

Gene	Iniciadores (5'-3')	Condições para Amplificação	Tamanho (pb)
<i>bla_{TEM}</i>	F 5'-ATGAGTATTCAACATTTCGG R 5'-CTGACAGTTACCAATGCTTA	1 ciclo por 5' a 96°C 35 ciclos de 1' a 96°C; 1' a 60°C; 1' a 72°C; 1 ciclo de 10' a 72°C.	867
<i>bla_{SHV}</i>	F 5'-GGTTATGCGTTATATTCGCC R 5'-TTAGCGTTGCCAGTGCTC		867
<i>bla_{CTX-M}</i>	F 5'-ATGTGCAGYACCAGTAARGT R 5'-TGGGTRAARTARGTSACCAGA	1 Ciclo de 7' a 94°C 35 Ciclos de 50" a 94°C; 40" a 50°C; 1' a 72°C; 1 Ciclo de 5' a 72°C.	593

Fonte: Ferreira et al. (2011).

Para a identificação genotípica das espécies foi realizada PCR para o gene rRNA 16S, um gene código de barras para espécies de bactérias, com os iniciadores 27F (GAGTTTGATCCTGGCTCAG) e 1492R (GGTTACCTTGTTACGACTT), gerando um produto de ~1500pb. As condições para amplificação foram: desnaturação inicial de 5 min a 96° C, estágio com 35 ciclos, sendo um minuto a 96°C para desnaturação, um minuto a 60°C para anelamento e dois minutos a 72°C para extensão, finalizando com um estágio de extensão final a 72°C por 10 min (FERREIRA et al., 2011).

Para verificar o produto amplificado, foi realizada eletroforese em gel, preparado com agarose a uma concentração de 1,8% e tampão TBE (Tris Borato de EDTA). Do amplificado de cada amostra, 5 µl foi corado com *Blue Green* (0,7 µl), adicionado azul de bromofenol e sacarose a 10% (2,0 µl) para dar peso à molécula de DNA. Foi utilizado um padrão de peso molecular (100 pb), aplicando-se 2,0 µl. Este gel foi submergido em TBE e submetido a uma corrente elétrica, e posteriormente analisado em Fotodocumentador UV MiniBis. A amplificação foi verificada pela presença de uma banda e confirmada pelo alinhamento com o marcador de peso molecular.

Foi realizada reação de sequenciamento de Sanger do gene RNAr 16S, para determinar genotipicamente as espécies bacterianas das cepas isoladas, de acordo com o fabricante. Para cada amostra foram realizadas duas reações a fim de gerar as sequências senso (27F) e anti-senso (1492R). Em cada reação de sequenciamento foi utilizado 1 µl de DNA amplificado, 0,6 µl de Tampão BigDye® Terminator versão 3.1 (Applied Biosystems™, USA), 1,85 µl de tampão de sequenciamento 5X (SaveMoney), 1 µl de iniciador e água ultrapura livre de

nucleases suficiente para 10 µl. A reação de amplificação foi realizada em termociclador, nas seguintes condições: desnaturação inicial a 96°C por um minuto; 25 ciclos com desnaturação a 96°C por 10 segundos, anelamento a 50°C por 10 minutos e extensão a 60°C por quatro minutos. O produto da reação foi submetido à purificação pela precipitação com etanol, EDTA e acetato de sódio. O produto sequenciado foi analisado em sequenciador automatizado Genetic Analyzer 3500 (Applied BioSystems™).

As sequências obtidas foram analisadas usando o *software* Geneious® versão 5.5.4 (DRUMMOND et al., 2020). Neste *software*, foi avaliada a qualidade das sequências obtidas, através da análise do eletroferograma, onde um valor de QV (do inglês *Quality Value*) indicou a qualidade. A identidade da bactéria foi determinada por meio de alinhamento das sequências consensos obtidas com sequências depositadas no Banco de Dados e Sequências Genéticas - GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) através da ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), que alinha as sequências através da similaridade entre elas. A similaridade considerada para esse estudo foi de > 98%.

Resultados e Discussão

Na primeira coleta, foram isoladas sete colônias de bacilos Gram-negativos a partir da amostragem de efluentes urbanos pré-tratamento, aqueles que chegam à ETE e duas colônias a partir dos efluentes pós-tratamento, que são diretamente despejados no Rio Branco. Na segunda coleta, foram isoladas seis colônias de bacilos Gram-negativos a partir da amostragem de efluentes urbanos pré-tratamento e sete colônias a partir dos efluentes pós-tratamento. A distribuição das espécies por sítio de amostragem e coleta estão descritas na tabela 2 e 3.

Na primeira coleta, foram isoladas sete cepas a partir dos efluentes pré-tratamento, das espécies *Aeromonas caviae* (2), *Aeromonas enteropelogenes* (1), *Citrobacter freundii* (1), *Enterobacter cloacae* (1), *Escherichia coli* (1) e *Klebsiella pneumoniae* (1). O gênero *Aeromonas* foi prevalente com 33,3% das cepas isoladas, sendo que este gênero apresentou-se apenas no pré-tratamento. Em apenas uma cepa de *A. enteropelogenes* foi detectado o gene *bla_{CTX-M}*, que soma-se às cepas de *C. freundii* (*bla_{SHV}*) e *E. coli* (*bla_{TEM}*), totalizando 3 cepas portadoras de genes ESBL no pré-tratamento. Duas cepas foram isoladas a partir dos efluentes: *E. cloacae*, com resistência a pelo menos um fármaco de 3 classes diferentes de antibacterianos, e portadora do gene *bla_{TEM}*; e uma cepa de *K. oxytoca* que não amplificou para nenhum dos genes estudados, mas apresentou resistência a seis fármacos testados. Para esta pesquisa, foram consideradas as espécies identificadas pelo gene RNAr 16S, e aquelas que não amplificaram

para este gene ou não obtiveram qualidade na análise da sequência foi considerado o resultado da identificação fenotípica.

Tabela 2 –Espécies identificadas, perfil de sensibilidade a antibacterianos e genes codificadores de ESBL encontrados nas cepas da primeira coleta por ponto de amostragem na Estação de Tratamento de Esgoto de Boa Vista-RR.

Ponto de Amostragem	Gênero/Espécie identificadas fenotipicamente	Gênero/Espécie identificadas genotipicamente	Resistência aos antibacterianos	Genes codificadores de ESBL
Pré-tratamento	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Aeromonas caviae</i>	Não realizado	Nenhum
	<i>Citrobacter diversus</i>	<i>Aeromonas caviae</i>	Não realizado	Nenhum
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Aeromonas enteropelogenes</i>	Não realizado	<i>bla_{CTX-M}</i>
	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Citrobacter freundii</i>	CFL	<i>bla_{SHV}</i>
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	AMP, AMC e CFL	Nenhum
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	AMP, CLF e SUT	<i>bla_{TEM}</i>
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AMP	Nenhum
Pós- Tratamento	<i>Citrobacter diversus</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	AMP, AMC, CFL, e NAL	<i>bla_{TEM}</i>
	<i>Klebsiella oxytoca</i> *		AMP, AMC, CFL, CRX, CRXAC e PPT	Nenhum

*Espécies identificadas apenas com análise fenotípica. AMP = ampicilina; AMC = amoxicilina/ácido clavulânico; CFL = cefalotina; CRX = cefuroxima; CRXAC = cefuroxima/axetil SUT = sulfatrimetopim; NAL = ácido nalidíxico.

Tabela 3 – Espécies identificadas e genes codificadores de ESBL encontrados nas cepas da segunda coleta por ponto de amostragem na Estação de Tratamento de Esgoto de Boa Vista-RR.

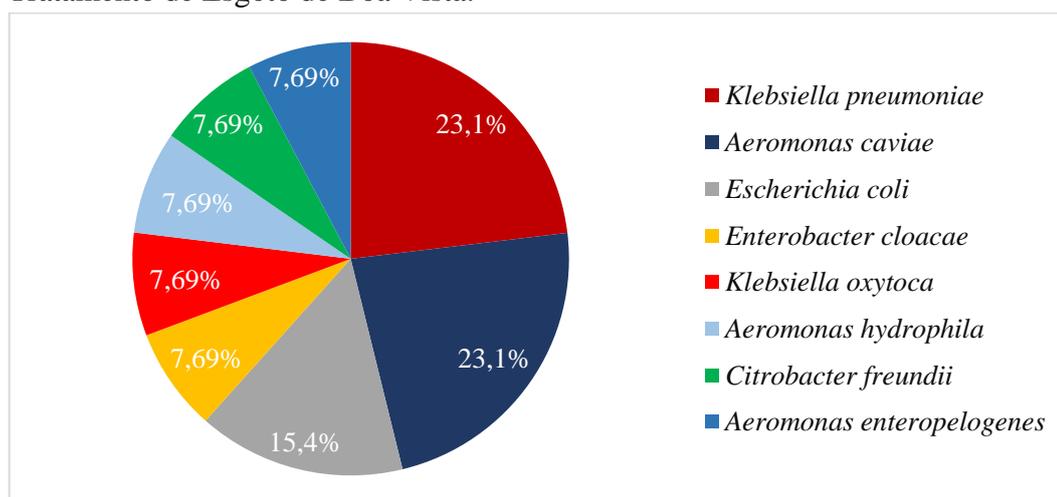
Ponto de Amostragem	Gênero/Espécie identificadas fenotipicamente	Gênero/Espécie identificadas genotipicamente	Genes codificadores de ESBL
Pré-Tratamento	<i>Providencia sp.</i>	<i>Aeromonas cavie</i>	Nenhum
	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Nenhum
	<i>Escherichia coli</i> *	-	Nenhum
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Nenhum
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>bla_{SHV}</i>
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>bla_{SHV}</i>
Pós-tratamento	<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	Nenhum
	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	Nenhum
	<i>Enterobacter sp.</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	Nenhum
	<i>Klebsiella ozaenae</i>	<i>Enterobacter asburiae</i>	Nenhum
	<i>Hafnia alvei</i>	<i>Enterobacter asburiae</i>	Nenhum
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Enterobacter ludwigii</i>	Nenhum
	<i>Hafnia alvei</i>	<i>Serratia marcescens</i>	Nenhum

*Bactérias identificadas fenotipicamente somente.

Na segunda coleta, foi realizada coleta em duplicata no ponto de efluentes do pré-tratamento e em triplicata dos efluentes pós-tratamento. Nos efluentes pré-tratamento, foram isoladas seis cepas das seguintes espécies: *K. pneumoniae* (2); *K. oxytoca* (1); *E. coli* (1); *A. hydrophila* (1); e *A. caviae* (1). Houve prevalência do gênero *Klebsiella* com 50% das cepas isoladas nesse ponto, diferenciando dos achados na primeira coleta. Mas o gênero *Aeromonas* foi o segundo mais prevalente com 33,3% das cepas, sugerindo que este gênero se mantém nos efluentes do pré-tratamento. As duas cepas de *K. pneumoniae* isoladas neste ponto foram detectadas como portadoras do gene *bla_{SHV}*. No pós-tratamento, foram isoladas sete cepas pertencentes às seguintes espécies *E. cloacae* (3), *E. asburiae* (2), *E. ludwigii* (1) e *S. marcescens* (1). O gênero *Enterobacter* foi prevalente com 85,7% das cepas coletadas nesse ponto. No entanto, nenhuma cepa portadora de genes codificadores de ESBL foi detectada neste ponto.

Somando as duas coletas, no pré-tratamento foram encontrados 13 bacilos Gram-negativos, com prevalência das espécies *K. pneumoniae* (3) e *A. caviae* (3); e no pós-tratamento foram encontrados nove bacilos Gram-negativos, com prevalência da espécie *E. cloacae* (4). As frequências das espécies de cada sítio de coleta podem ser visualizadas nos gráficos 1 e 2.

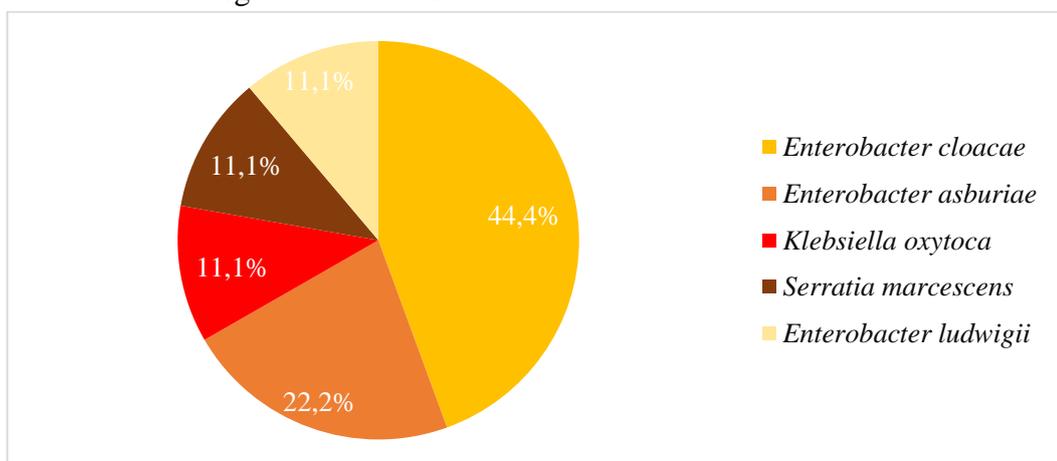
Gráfico 1 – Frequência das espécies encontradas no pré-tratamento da Estação de Tratamento de Esgoto de Boa Vista.



Das espécies encontradas no pré-tratamento, 23% pertencem a espécie *K. pneumoniae*, um importante patógeno prevalente tanto em infecções graves como portador de resistência. Estes resultados corroboram com os de Zagui et al. (2020) que encontraram prevalência da espécie *K. pneumoniae* em efluentes urbanos sem tratamento do município de Ribeirão Preto,

SP. Furlan, Savazzi e Stehling (2020) relataram a presença de *K. pneumoniae* multirresistente em um lago e igarapés do estado de São Paulo, Brasil. Os autores concluíram que o perfil de resistência a antibacterianos, a tolerância a metais e a virulência contribuem para a persistência desse patógeno tanto no paciente como no ambiente aquático. Essas pesquisas e o presente trabalho alertam para a presença e possível persistência da espécie *K. pneumoniae* no ambiente aquático natural.

Gráfico 2 - Frequência das espécies encontradas no pós-tratamento da Estação de Tratamento de Esgoto de Boa Vista.



A espécie *A. caviae* foi também prevalente com 23,1% (3) das cepas encontradas no pré-tratamento, um bacilo Gram-negativo comum de ambientes aquáticos, mas que pode causar infecções em humanos (FILGUEIRAS et al., 2017). Espécies de *Aeromonas* podem estar disseminadas em diferentes ambientes aquáticos, desde efluentes hospitalares, urbanos, tanques de aeração, estações de tratamento de esgotos e corpos hídricos naturais que recebem efluentes tratados (CONTE et al., 2020). A identificação de *A. caviae*, *A. hydrophila* e *A. enteropelogenes* só foi possível através da identificação genotípica, mas Conte et al. (2020) concluem que a taxonomia desse gênero é bastante complicada por causa da grande similaridade entre as sequências de nucleotídeos das diferentes espécies. Para o presente estudo, a espécie foi identificada com base no maior número de alinhamentos com a mesma espécie nas sequências do *GenBank* através da ferramenta *BLAST*.

Neste estudo, apenas 15,4% (2) de cepas de *E. coli* foi encontrada no pré-tratamento, neste estudo, e nenhuma no pós-tratamento. Apesar de ser um bacilo da flora intestinal e o mais importante patógeno causador de infecções urinárias, *E. coli* pode ser encontrada em lagos urbanos, efluentes sem tratamento e até mesmo em rio (BARTLEY et al., 2019). Como esta espécie é utilizada como indicador microbiológico de qualidade da água é frequentemente

detectada em águas que recebem impactos antropogênicos, mas outras espécies de interesse clínico podem ocorrer nos efluentes urbanos (BHATT et al., 2020).

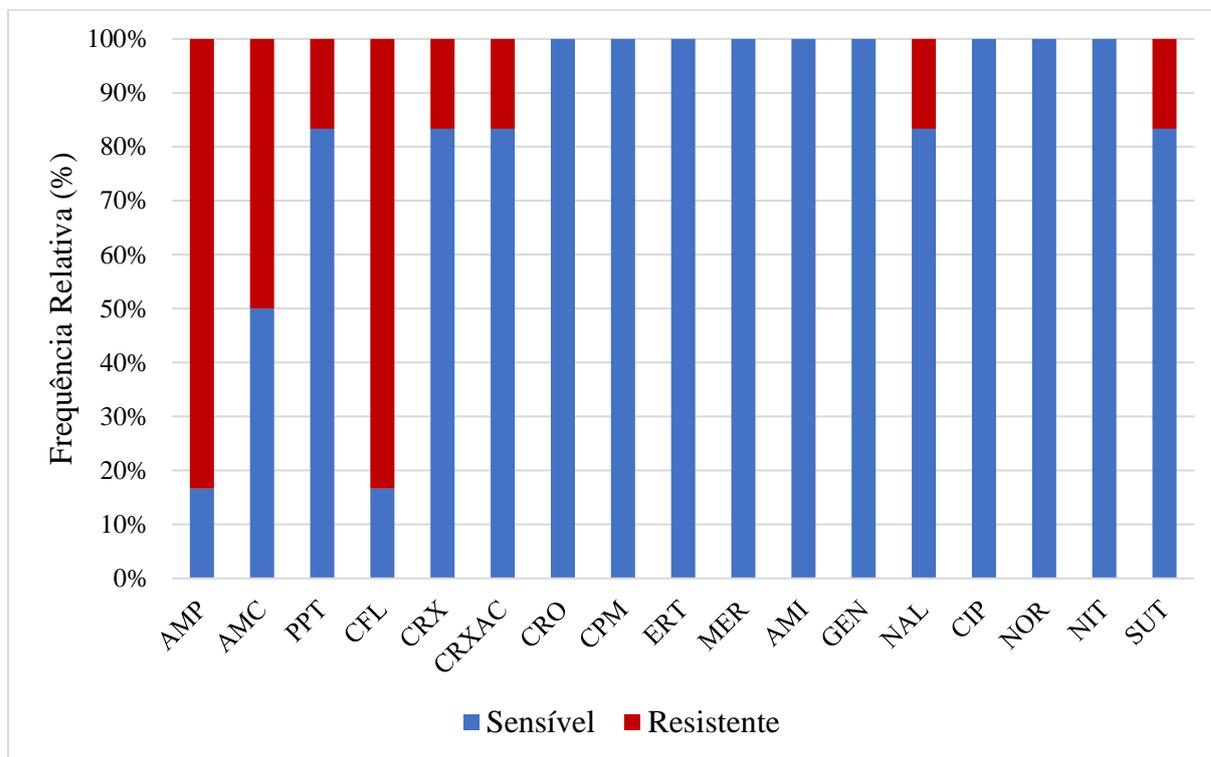
Algumas espécies de interesse clínico são observadas na lagoa pós-tratamento, como *K. oxytoca*, *E. cloacae* e *S. marcescens*. Resultados semelhantes foram encontrados por Zagui et al. (2020) que encontraram os patógenos *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* e *E. cloacae* em efluentes tratados. Para Rodriguez et al. (2020) o gênero *Enterobacter* foi o segundo prevalente em efluentes tratados, ficando atrás apenas do gênero *Aeromonas*. As espécies *E. cloacae* e *S. marcescens* desempenham um papel importante na biodegradação de surfactantes, podendo ter uma função importante na degradação de tais substâncias no tratamento de efluentes (FEDEILA et al., 2018). Mas ambas as espécies estão associadas a surtos de infecções nosocomiais, com prevalência de espécies do gênero *Enterobacter* (GAJDÁCS; URBÁN, 2019). Estas espécies por serem patógenos emergentes e estarem amplamente distribuídos na água e solo, podem atuar como reservatórios de multirresistência no ambiente natural.

É possível observar uma maior quantidade de espécies no pré-tratamento em comparação com a quantidade do pós-tratamento, sugerindo que o tratamento dos efluentes pode reduzir a diversidade de espécies que são emitidas no Rio Branco. Roderová et al. (2016) não encontraram grandes diferenças no número de espécies entre o pré-tratamento e o pós-tratamento. Já Zagui et al. (2020) encontrou três espécies no efluente tratado, sendo elas *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* e *E. cloacae*, sendo que esta última só foi encontrada no pós-tratamento.

O perfil de sensibilidade a antibacterianos foi feito apenas para seis cepas provenientes da primeira coleta, sendo quatro do pré-tratamento e as duas do pós-tratamento, pois foram gentilmente cedidas seis cartelas de antibiograma em VITEK para este estudo. Nenhuma produção de ESBL foi encontrada nas cepas analisadas, mas cinco apresentaram resistência a pelo menos dois fármacos testados. O resultado do perfil de sensibilidade a cada antibacteriano testado pode ser visto no gráfico 3.

Pelo perfil de sensibilidade (Gráfico 3), foi possível observar 83,3% de resistência aos antibacterianos ampicilina e cefalotina. Além disso, 50% das cepas testadas apresentaram resistência a amoxicilina associada ao ácido clavulânico, que é um inibidor de ESBL. Estes resultados divergem dos encontrados por Piotrowska, Kowalska e Popowska (2019), em que foi encontrado alta porcentagem de resistência a cefalosporinas de terceira geração, como ceftazidima e cefotaxima. Mas os autores encontraram baixa porcentagem de resistência ao aminoglicosídeo amicacina, corroborando com os achados desse trabalho, em que as cepas demonstraram 100% de sensibilidade a amicacina e gentamicina.

Gráfico 3 – Perfil de sensibilidade a antibacterianos dos bacilos encontrados em efluentes urbanos.



AMP = ampicilina; AMC = amoxicilina/ácido clavulânico; PPT = piperacilina/tazobactam; CFL = cefalotina; CRX = cefuroxima; CRXAC = cefuroxima/axetil; CRO = ceftriaxona; CPM = cefepima; ERT = ertapenem; MER = meropenem; AMI = amicacina; GEN = Gentamicina; CIP = ciprofloxacina; NOR = Norfloxacina; NIT = nitrofurantoína; SUT = sulfatrimetropim.

A sensibilidade às cefalosporinas de terceira geração corrobora com o fenótipo negativo para ESBL, pois a resistência a esses fármacos é uma assinatura da produção de ESBL (YELLE; MASCARENHAS; ARUNA, 2020). Resultados semelhantes foram observados por Roderová et al. (2016), em que as cepas isoladas de efluentes urbanos possuíam um perfil de resistência a ampicilina, cefazolina e ampicilina associada ao inibidor de Beta-lactamase sulbactam, mas eram sensíveis a cefalosporinas de terceira geração e carbapenêmicos, além de serem 100% sensíveis a amicacina. Os resultados observados no perfil de sensibilidade no presente estudo sugerem que as cepas analisadas não produzem enzimas ESBL, pois estas hidrolisam principalmente cefalosporinas de terceira e quarta geração, o que não foi observado no perfil fenotípico.

Uma *E. coli*, encontrada no pré-tratamento, que apresentou resistência a ampicilina e cefalexina, foi a única resistente a sulfatrimetropim. Quanto as cepas encontradas no pós-tratamento, uma *E. cloacae* apresentou resistência a ampicilina, amoxicilina/ácido clavulânico, cefalexina e a única a ser resistente ao ácido nalidíxico. A espécie *K. oxytoca*, apresentou resistência aos fármacos: ampicilina, amoxicilina/ácido clavulânico, piperacilina/tazobactam,

cefalotina, cefuroxima e cefuroxima/axetil, sendo a única cepa a apresentar resistência a cinco fármacos. Esta *K. oxytoca* no pós-tratamento sugere a presença de relevante resistência a antibacterianos sendo emitida no Rio Branco.

A sensibilidade foi de 100% para os antibacterianos ceftriaxona, cefepima, ertapenem, meropenem, ampicacina, gentamicina, ciprofloxacina, norfloxacina e nitrofurantoína. Estes fármacos são restritos ao uso hospitalar, e a resistência parece seguir essa tendência. Os efluentes hospitalares misturam-se aos efluentes domésticos e de outras fontes urbanas, podendo ter uma contribuição muito baixa na confluência de todo o efluente urbano (AYDIN et al., 2018). O recomendado seria que os efluentes hospitalares tivessem um tratamento específico para eliminação de patógenos antes de serem emitidos na rede de esgoto da cidade. Além disso, fármacos como amoxicilina associada ao ácido clavulânico são receitados para tratamento em casa, em que as pessoas podem administrar de forma indevida e não fazer o descarte correto do medicamento (CONSTANTINO et al., 2020).

Apesar da produção de ESBL não ter sido observada nas seis cepas analisadas, todas as 22 bactérias encontradas em ambos sítios e momentos de coleta foram submetidas a detecção de genes codificadores de enzimas ESBL, sendo eles *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} e *bla*_{CTX-M} (tabela 3).

Tabela 3 – Frequência de genes codificadores de ESBL encontrados nas cepas presentes nos efluentes urbanos da Estação de Tratamento de Esgoto.

Ponto de amostragem	Nº de cepas identificadas	Genes de Resistência encontrados		
		<i>bla</i> _{TEM}	<i>bla</i> _{SHV}	<i>bla</i> _{CTX-M}
Pré-tratamento	5	1	3	1
Pós-tratamento	1	1	0	0
TOTAL	6	2	3	1

Três cepas da primeira coleta com perfil de sensibilidade a antibacterianos caracterizado foram portadoras de genes codificadores de ESBL, dentre as quais, duas cepas apresentaram o gene *bla*_{TEM}, e uma cepa com o gene *bla*_{SHV}, que é uma *C. freundii* com resistência apenas a cefalexina. A cepa de *E. coli* (pré-tratamento), uma das portadoras do gene *bla*_{TEM}, é a mesma com o perfil de resistência a ampicilina, cefalexina e sulfatrimetropim. A cepa portadora do gene *bla*_{TEM} é uma *E. cloacae*, encontrada no pós-tratamento, com perfil de resistência a ampicilina, amoxicilina/ácido clavulânico, cefalexina e ácido nalidíxico. Esta cepa foi a única portadora de um gene codificador de ESBL no sítio de pós-tratamento, encontrada na primeira coleta. Ainda na primeira coleta, uma cepa de *A. enteropelogenes*, encontrada no pré-tratamento, era portadora do gene *bla*_{CTX-M}, sendo a única ocorrência desse gene entre as 22

amostras de bactérias dos efluentes urbanos. Não foram detectadas associações entre os genes testados em uma mesma cepa.

Das cepas resistentes a amoxicilina/ácido clavulânico, apenas a *E. cloacae* encontrada no pós-tratamento era portadora de um gene codificador de ESBL, *bla*_{TEM}. Nas outras duas resistentes (*E. cloacae* – pré-tratamento e *K. oxytoca* – pós-tratamento) a este fármaco nenhum dos genes de interesse dessa pesquisa foram encontrados. Apesar dos três genes aqui investigados serem os codificadores de ESBL mais comuns, muitos outros genes podem ser codificadores de enzimas ESBL e carbapenemases, fazendo parte da família de genes *bla* (PIOTROWSKA; KOWALSKA; POPOWSKA, 2019). Outro fator que pode ter influenciado nesses resultados é que alguns dos genes pesquisados poderia estar presente, mas não foi amplificado durante a PCR.

Dentre as seis bactérias com perfil de sensibilidade a antibacterianos fenotipicamente caracterizado, 50% possuíam um gene codificador de ESBL. Dentre as bactérias que não tiveram o perfil de sensibilidade caracterizado, três eram portadoras de genes de resistência, todas encontradas nos efluentes do pré-tratamento. Roderová et al. (2016) também encontraram algumas discrepâncias entre o fenótipo sensível e a presença do gene mediado por plasmídeos AmpC em algumas cepas. Sugere-se que algo semelhante pode estar acontecendo entre as bactérias com genes codificadores de ESBL encontradas nesse estudo. Há indícios de que a correlação entre o fenótipo e genótipo não é sempre 100%. Algumas mutações de base única no gene podem levar a alterações no sítio ativo da enzima e esta não ser expressa, mas o gene pode sofrer novas mutações e tornar a expressar a enzima (GORDON et al., 2014; MORADIGARAVAND et al., 2018). As cepas portadoras desses genes nesse estudo podem estar atuando como reservatórios na ETE de Boa Vista, pois este resultado sugere que as bactérias podem não ser virulentas, mas portadoras de genes codificadores de ESBL.

Ao total, foram encontradas seis cepas portadoras de um gene codificador de ESBL, sendo três no pré-tratamento na primeira coleta, duas no mesmo sítio na segunda coleta e uma no pós-tratamento na primeira coleta. Das 22 cepas coletadas, 27,27% (6) possuíam um gene codificador de ESBL.

Na segunda coleta apenas duas cepas de *K. pneumoniae* coletadas no sítio de pré-tratamento eram portadoras do gene *bla*_{SHV}, sendo o único gene que ocorreu na segunda coleta. Não houve ocorrência simultânea de dois ou mais genes codificadores de ESBL na mesma cepa. Outro destaque nos resultados observados é que 83,33% das cepas portadoras de genes ESBL foram encontradas no sítio de pré-tratamento, ou seja, os efluentes urbanos brutos. Além disso, na primeira coleta foram analisadas nove cepas, em que quatro portavam genes ESBL, enquanto

na segunda 13 cepas foram analisadas, e apenas duas portavam genes ESBL, sem nenhuma ocorrência nas cepas observadas no sítio de pós-tratamento.

As espécies dos gêneros *Aeromonas*, *Enterobacter* e a espécie *E. coli* são capazes de portar genes de resistência, como apresentado neste estudo. A preocupação ambiental é que esses bacilos são muito bem adaptados ao ambiente aquático natural, logo considerados possíveis reservatórios ambientais da resistência a antibacterianos (CONTE et al., 2020). Além disso, a transferência horizontal de genes é interespecífica e ocorre numa taxa maior em climas tropicais (DEVARAJAN et al., 2017). A contribuição dos efluentes hospitalares nos efluentes urbanos pode variar de acordo com a estação de clima tropical, mas a contribuição em ambas as estações é significativa (AL SALAH et al., 2020).

A maioria das cepas portadoras de genes de resistência foram encontradas nos influentes da estação de tratamento de esgoto neste estudo. O tratamento de efluentes adotado influencia fortemente na qualidade microbiológica do efluente ao final do tratamento (BHATT et al., 2020). Entretanto, esses processos podem ser eficazes até certo ponto na remoção de genes de resistência, não tendo sucesso num controle confiável e sustentável desses genes no ambiente natural (ASADI-GHALHARI et al., 2020). Desta forma, devem ser preconizados tratamentos prévios nas principais fontes de disseminação de genes de resistência, como nos efluentes hospitalares, e tratamentos mais efetivos no tratamento de efluentes urbanos.

Conclusão

Este estudo foi capaz de detectar traços de disseminação de genes de resistência entre as cepas bacterianas que chegam ao tratamento de esgoto da cidade de Boa Vista, Roraima, Brasil. Apesar do perfil fenotípico das cepas demonstrar-se não produtor de ESBL, em algumas destas testadas foi encontrado genes codificadores de ESBL. Demonstrando, assim, a possibilidade de disseminação de bactérias de interesse clínico portando genes de resistência a antibacterianos no ambiente natural, mesmo que discreta. Nos influentes do pré-tratamento foram encontradas as principais espécies de patógenos oportunistas como *K. pneumoniae* e *Aeromonas* e uma frequência maior de cepas portadoras de genes de resistência, apontando para o risco que os trabalhadores do setor e moradores do entorno se expõem. Os efluentes hospitalares podem estar contribuindo para a presença dessa multirresistência, mas não se pode afirmar que seja a única contribuição. Tratamentos prévios dos efluentes hospitalares antes que cheguem às estações de tratamento de esgotos pode contribuir para minimizar traços genéticos da resistência encontrada nesses lugares, para prevenir o ambiente natural de se tornar reservatório. Os achados desta pesquisa apontam para a necessidade de vigilância com relação a disseminação

de bactérias portadoras de genes de resistência no ambiente natural, o que representa uma ameaça potencial à saúde de seus consumidores.

Referências

AL SALAH, D. M. M. et al. Hospital wastewaters: A reservoir and source of clinically relevant bacteria and antibiotic resistant genes dissemination in urban river under tropical conditions. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Amsterdam, v. 200, n. 1, p. 1-9, 2020.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência a Saúde: Módulo 6: Detecção e identificação de bactérias de importância médica**. Brasília: ANVISA, 2013. 150 p.

ASADI-GHALHARI, M. et al. Effects of Different Wastewater Treatment Processes on Occurrence and Prevalence of Antibiotic Resistant Bacteria and Their Resistance Genes. **Journal of Environmental Treatment Techniques**, Dubai, v. 8, n. 2, p. 744-749, 2020.

AYDIN, S. et al. Antibiotics in hospital effluents: occurrence, contribution to urban wastewater, removal in a wastewater treatment plant, and environmental risk assessment. **Environmental Science and Pollution Research**, Basel, v. 26, n. 1, p. 544-558, out. 2019.

BARTLEY, P. S. et al. Antibiotic resistance in Enterobacteriaceae from surface waters in urban Brazil highlights the risks of poor sanitation. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, Arlington, v. 100, n. 6, p. 1369-1377, 2019.

BHATT, P. et al. Evaluation of Factors Influencing the Environmental Spread of Pathogens by Wastewater Treatment Plants. **Water, Air, & Soil Pollution**, Switzerland, v. 231, n. 8, p. 1-14, 2020.

BOLLACHE, L. et al. Dissemination of CTX-M-producing *Escherichia coli* in freshwater fishes from a French watershed (Burgundy). **Frontiers in microbiology**, Lausanne, v. 9, n. 1, p. 3239, 2019.

BRANDÃO, M. B. S. et al. Isolation of Extended-Spectrum Beta-Lactamases Producing Strains on Effluent of State Hospital from Boa Vista-RR. **Electronic Journal of Management, Education and Environmental Technology (REGET)**, Santa Maria, v. 21, n. 3, p. 248-258, 2017.

BUELOW, E. et al. Hospital discharges in urban sanitation systems: Long-term monitoring of wastewater resistome and microbiota in relationship to their eco-exposome. **Water research X**, Amsterdam, v. 7, n. 1, p. 100045, 2020.

BUSH, K. Past and present perspectives on β -lactamases. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Washington, v. 62, n. 10, p. 1-20, 2018.

BUSH, K.; BRADFORD, P. A. β -Lactams and β -lactamase inhibitors: an overview. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, New York, v. 6, n. 8, p. 1-22, 2016.

CHAPMAN, P. A. *et al.* Comparison of culture, PCR and immunoassays for detecting *Escherichia coli* O157 following enrichment culture and immunomagnetic separation performed on naturally contaminated raw meat products. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 68, n. 1, p. 11-20, 2001.

CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. 28 ed. Twenty Second Information Supplement M100. Wayne, PA: **Clinical Laboratory and Standard Institute**. 2018.

CONSTANTINO, V. M. *et al.* Estoque e descarte de medicamentos no domicílio: uma revisão sistemática. **Ciência & Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 25, n. 2, p. 585-594, 2020.

CONTE, D. *et al.* Diversity of Antimicrobial-Resistant *Aeromonas* Species Isolated from Aquatic Environments in Brazil. **bioRxiv**, New York, [s.v], [s.n], jun. 2020.

CRINI, G.; LICHTFOUSE, E. Advantages and disadvantages of techniques used for wastewater treatment. **Environmental Chemistry Letters**, Basel, v. 17, n. 1, p. 145-155, 2019.

DEVARAJAN, N. *et al.* Antibiotic resistant *Pseudomonas* spp. in the aquatic environment: A prevalence study under tropical and temperate climate conditions. **Water research**, Amsterdam, v. 115, n. 1, p. 256-265, 2017.

DRUMMOND, A. J. *et al.* **Geneious versão 5.5.4**, 2011. Disponível em: <<http://www.geneious.com/>>. Acesso em: 5 out. 2020.

FEDEILA, M. *et al.* Biodegradation of anionic surfactants by *Alcaligenes faecalis*, *Enterobacter cloacae* and *Serratia marcescens* strains isolated from industrial wastewater. **Ecotoxicology and environmental safety**, Amsterdam, v. 163, p. 629-635, 2018.

FERREIRA, C. M. *et al.* Extended-Spectrum Beta-Lactamase-producing bacteria isolated from hematologic patients in Manaus, state of Amazonas, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 42, n. 3, p. 1076-1084, jul./set. 2011.

FIGUERAS, M. J. *et al.* ‘*Aeromonas intestinalis*’ and ‘*Aeromonas enterica*’ isolated from human faeces, ‘*Aeromonas crassostreae*’ from oyster and ‘*Aeromonas aquatilis*’ isolated from lake water represent novel species. **New microbes and new infections**, Amsterdam, v. 15, n. 1, p. 74-76, 2017.

FURLAN, J. P. R.; SAVAZZI, E. A.; STEHLING, E. G. Genomic insights into multidrug-resistant and hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* co-harboring metal resistance genes in aquatic environments. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Amsterdam, v. 201, p. 110782, 2020.

GAJDÁCS, M.; URBÁN, E. Resistance trends and epidemiology of citrobacter-enterobacter-serratia in urinary tract infections of inpatients and outpatients (RECESUTI): a 10-year survey. **Medicina**, Basel, v. 55, n. 6, p. 285, 2019.

GORDON, N. C. et al. Prediction of Staphylococcus aureus antimicrobial resistance by whole-genome sequencing. **Journal of clinical microbiology**, Washington, v. 52, n. 4, p. 1182-1191, 2014.

HONDA, R. et al. Estimated discharge of antibiotic-resistant bacteria from combined sewer overflows of urban sewage system. **NJP Clean Water**, London, v. 3, n. 1, p. 1-7, 2020.

HUDZICKI, J. Kirby-Bauer disk diffusion susceptibility test protocol. **American Society for Microbiology**, 2009. Disponível em: <www.asmscience.org/content/education/protocol.3189> Acesso em: 02 nov. 2020.

IREDELL, J.; BROWN, J.; TAGG, K. Antibiotic resistance in Enterobacteriaceae: mechanisms and clinical implications. **BMJ**, London, v. 352, n. 1, p. 1-9, 2016.

KARLOWSKY, J. A. et al. Antimicrobial susceptibility of Gram-negative ESKAPE pathogens isolated from hospitalized patients with intra-abdominal and urinary tract infections in Asia-Pacific countries: SMART 2013–2015. **Journal of Medical Microbiology**, Reading, v. 66, n. 1, p. 61-69, jan. 2017.

KÜMMERER, K. Antibiotics in the aquatic environment: a review, part I. **Chemosphere**, Amsterdam, v. 75, n. 4, p. 417-434, 2009.

LIU, L.; HALL, G.; CHAMPAGNE, P. Disinfection processes and mechanisms in wastewater stabilization ponds: a review. **Environmental Reviews**, Canada, v. 26, n. 4, p. 417-429, 2018.

LORENZO, P. et al. Antibiotic resistance in urban and hospital wastewaters and their impact on a receiving freshwater ecosystem. **Chemosphere**, Amsterdam, v. 206, n. 1, p. 70-82, 2018.

MORADIGARAVAND, D. et al. Prediction of antibiotic resistance in *Escherichia coli* from large-scale pan-genome data. **PLoS computational biology**, San Francisco, v. 14, n. 12, p. 1-17, 2018.

NEPAL, R. et al. Antibiotic Susceptibility Pattern of Gram-negative Isolates of Lower Respiratory Tract Infection. **Journal of Nepal Health Research Council**, Kathmandu, v. 16, n. 1, p. 22-26, jan. 2018.

PEÑA-GUZMÁN, C. A. et al. Urban Cycle Water Simulation/Management Models: A Review. **Water MDPI**, Basel, v. 9, n. 4, p. 285, abr. 2017.

PIOTROWSKA, M.; KOWALSKA, S.; POPOWSKA, M. Diversity of β -lactam resistance genes in gram-negative rods isolated from a municipal wastewater treatment plant. **Annals of Microbiology**, London, v. 69, n. 6, p. 591-601, 2019.

RODRÍGUEZ, E. A. et al. High frequency of gram-negative bacilli harboring *bla*_{KPC-2} in the different stages of wastewater treatment plant: A successful mechanism of resistance to carbapenems outside the hospital settings. **Journal of Environmental Management**, Amsterdam, v. 271, n. 1, p. 1-10, 2020.

ROEDEROVA, M. et al. Occurrence of bacteria producing broad-spectrum beta-lactamases and qnr genes in hospital and urban wastewater samples. **New Microbiologica**, Bologna, v. 39, n. 2, p. 124-33, 2016.

SELLERA, F. P. et al. Extended-spectrum- β -lactamase (CTX-M)-producing *Escherichia coli* in wild fishes from a polluted area in the Atlantic Coast of South America. **Marine pollution bulletin**, Amsterdam, v. 135, n. 1, p. 183-186, 2018.

SULTAN, I. et al. Antibiotics, resistome and resistance mechanisms: A bacterial perspective. **Frontiers in microbiology**, Lausanne, v. 9, n. 1, p. 2066, set. 2018.

Universidade Federal de Roraima, Instituto Federal de Roraima. Márcia Brazão e Silva Brandão; Derlano Bentes Capucho; Fabiana Granja. **Coletor de Efluentes em Profundidade**. BR n. 202018009448, 10 maio 2018, 10 maio 2028.

VELASCO, M. F. Surface water Treatment for the attendance of Riverside Communities of the Brazilian Amazon. **International Journal of Advanced Engineering Research and Science**, Jaipur, v. 7, n. 3, p. 87-99, 2020.

WALIA, S. et al. Quantitation of antibiotic resistance genes pollution in hospital waste water effluent and Urban Clinton River Water, Michigan, USA. India, **Current Medicine Research and Practice**, Amsterdam, v. 6, n. 4, p. 149-151, 2016.

YELLE, S.; MASCARENHAS, J.; ARUNA, K. Detection of ESBL Producing Gram-Negative Bacteria in Public Drinking Water Sources from South Mumbai. **Journal of Environmental Science, Computer Science and Engineering & Technology**, New Delhi, v. 9, n. 2, p. 288-300, maio 2020.

ZAGUI, G. S. et al. Gram-negative bacteria carrying β -lactamase encoding genes in hospital and urban wastewater in Brazil. **Environmental monitoring and assessment**, Switzerland, v. 192, n. 6, p. 1-11, 2020.

4 CAPÍTULO III

Comparação entre as bactérias Gram-negativas portadoras de genes codificadores de ESBL encontradas em efluentes hospitalares e na estação de tratamento de esgoto da cidade de Boa Vista, estado de Roraima, Brasil.

Introdução

Bactérias Gram-negativas são predominantes em infecções hospitalares e adquiridas da comunidade. Um dos fatores de virulência são os lipopolissacarídeos (LPS), uma estrutura exclusiva da membrana externa dessas bactérias (MALDONADO; SÁ-CORREIA; VALVANO, 2016). As infecções são predominantemente causadas por bacilos da família Enterobacteriaceae, como *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, entre outras (MCLELLAN; HUNSTAD, 2016). Mas espécies de outras famílias também são encontradas, sendo as mais comuns as *Pseudomonas aeruginosa* (Pseudomonadaceae) e *Acinetobacter* (Moraxellaceae) frequentemente associadas ao ambiente hospitalar, mas pertencentes a gêneros comuns do ambiente natural também (FISHMAN et al., 2018; NEPAL et al. 2018; MOUBARECK; HALAT, 2020).

As bactérias Gram-negativas patogênicas são muito frequentes no ambiente hospitalar, podendo causar infecções nosocomiais em pacientes internados. Causam infecções urinárias associadas ao uso de cateter uretral, infecções de feridas, infecções do trato respiratório inferior associadas ao uso de ventilação mecânica e bacteremia (ASSUNÇÃO et al., 2019). Os fármacos empregados no tratamento empírico dessas infecções são os antibacterianos de amplo espectro de ação principalmente da classe dos β -lactâmicos, que inclui penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos (ETEBU; ARIKEKPAR, 2016). Contudo, as bactérias do ambiente hospitalar estão cada vez mais resistentes aos fármacos, prolongando a internação dos pacientes, restringindo as opções de tratamento e aumentando a morbimortalidade (THEURETZBACHER, 2017).

Nos últimos anos, vem sendo cada vez mais relatada mundialmente a emergência de bactérias Gram-negativas com resistência a antibacterianos de amplo espectro de ação (RAHMAN et al., 2018). Estas bactérias podem contar com mecanismos variados de resistência, como as enzimas β -lactamases de Espectro Estendido (ESBL) que promovem a hidrólise dos antibacterianos β -lactâmicos de espectro estendido, atingindo penicilinas, cefalosporinas e monobactam (BUSH; JACOBY, 2010; RAHMAN et al., 2018). Estas enzimas

são codificadas por genes como o *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} e *bla*_{CTX-M}, que estão localizados em elementos genéticos móveis como os plasmídeos (SHAIKH et al., 2015). As bactérias são capazes de duplicar o plasmídeo, de forma independente do DNA cromossomal, e transferi-lo de forma interespecífica através da conjugação, resultando numa disseminação epidêmica de genes codificadores de ESBL na comunidade bacteriana (SHAIKH et al., 2015; LOPATKIN et al., 2016).

Durante a rotina no ambiente hospitalar são feitos descartes via resíduos líquidos, que podem ser uma via de disseminação de bactérias resistentes a fármacos (BUELOW et al., 2018). São descartados fármacos, materiais contaminados, materiais biológicos e excretas de pacientes (RAFRAF et al., 2016). Então os efluentes hospitalares não só modificam o ambiente, através do descarte de fármacos, como fornece bactérias capazes de resistir a essa modificação. Quando o hospital não realiza um tratamento prévio específico para diminuir tais contaminantes nos seus efluentes, estes são lançados na rede de esgoto da cidade carregando moderadas concentrações de fármacos e bactérias multirresistentes (WALIA et al., 2016; LORENZO et al., 2018; ZAGUI et al. 2020).

A água doce é um recurso natural proveniente de vários reservatórios naturais, como nas geleiras nos polos, no ar na forma de vapor e em corpos hídricos como rios, lagos e igarapés (SHIKLOMANOV, 1998; UNESCO, 2003). As grandes cidades geralmente localizam-se próximo a um corpo hídrico para que deste seja retirada a água para abastecer a cidade (PAL et al., 2014). Como os grandes centros urbanos utilizam a água para diversos fins, como para a agricultura, para usos domésticos, industriais, entre outros, estes setores também geram resíduos líquidos (ANA, 2019). Para minimizar os impactos da descarga de efluentes contaminados nos corpos hídricos receptores, estes resíduos líquidos geralmente são tratados em estações de tratamento de esgoto (ETE).

No Brasil, 42,6% dos esgotos gerados são coletados pela rede sanitária e são tratados, e o tratamento predominante é por lagoas de estabilização, que realiza tratamentos microbiológicos que reduzem a matéria orgânica dos efluentes para então serem lançados no corpo hídrico receptor (ANA, 2017). Este é o ciclo urbano da água, em que um rio pode ser tanto a fonte de abastecimento como o corpo hídrico receptor, como acontece em Boa Vista, em que a captação é realizada a montante do despejo, após tratamento na ETE (CAER, 2020).

Os efluentes hospitalares são considerados em vários estudos como a principal fonte de disseminação de bactérias multirresistentes no ambiente (LORENZO et al., 2018; WALIA et al., 2016; ZAGUI et al. 2020). Quando os efluentes hospitalares são emitidos sem tratamento prévio específico na rede de esgoto, acabam chegando a ETE e as bactérias patogênicas portadoras de genes de resistência que persistirem a esse trajeto encontram bactérias nativas

daquele ambiente. As ETEs estão entre os mais importantes condutores da propagação de resistência a antibacterianos nos ambientes aquáticos, pois oferece um ambiente ótimo para a transferência horizontal de genes entre as bactérias durante o processo de tratamento (LORENZO et al., 2018). Uma grande ameaça é a possibilidade da descarga contínua dessas bactérias no corpo hídrico receptor, transformando esse ambiente em reservatório da multirresistência e ameaçando a saúde dos seus consumidores (WALIA et al., 2016).

Portanto, os resíduos líquidos urbanos são uma potencial via de disseminação de bactérias multirresistentes no ambiente natural e medidas de controle devem ser adotadas. Alguns hospitais públicos de Boa Vista (RR) não realizam tratamento prévio dos efluentes hospitalares, que são lançados diretamente na rede de esgoto da cidade e chegam até a estação de tratamento. Brandão et al. (2017) já relataram a presença de bactérias produtoras de ESBL em efluentes hospitalares de um hospital público da cidade de Boa Vista, mas os autores não investigaram se este achado se mantém até a ETE da cidade. Com isso, o objetivo dessa pesquisa foi comparar as bactérias Gram-negativas portadoras de genes codificadores de ESBL encontradas nos efluentes hospitalares com as encontradas nos efluentes urbanos da estação de tratamento de esgoto da cidade de Boa Vista, a fim de compreender como a resistência a antibacterianos se mantém por esta via.

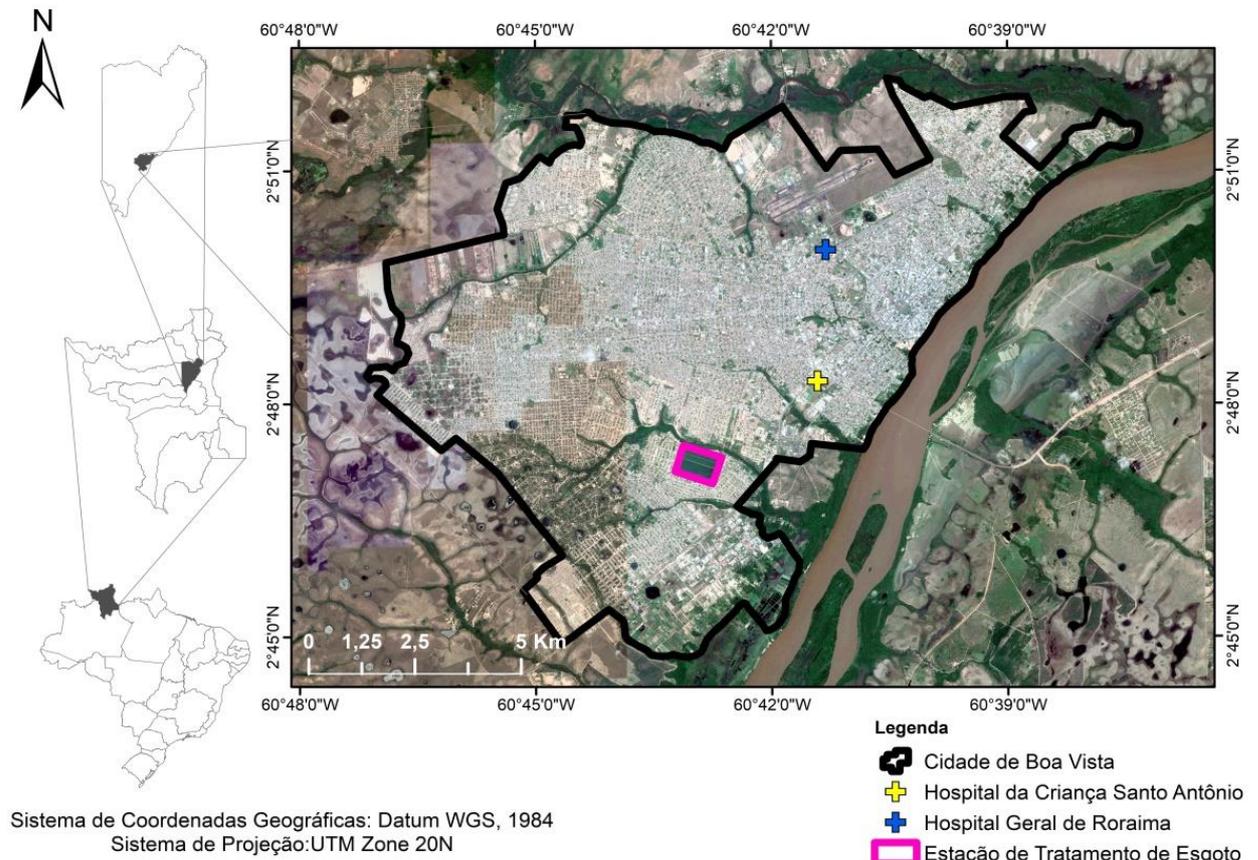
Materiais e métodos

Para a realização desta pesquisa foram escolhidos dois hospitais públicos e a estação de tratamento de esgoto da cidade de Boa Vista, estado de Roraima, Brasil, nos quais foram realizadas coletas de efluentes (Figura 1).

Foram coletados efluentes hospitalares de dois hospitais públicos de Boa Vista – RR, Brasil, que possuem Unidades de Terapia Intensiva (UTI). Primeiro, o Hospital Geral de Roraima (HGR), o principal hospital terciário da rede pública do estado de Roraima, com 240 leitos de internação distribuídos em quatro blocos e 20 leitos de UTI. Em sua estrutura sanitária, possui 3 caixas sépticas de passagem, uma que recebe efluentes gordurosos da cozinha e duas de efluentes dos leitos de internação e UTI. Todos os efluentes hospitalares convergem para uma caixa biológica, na qual são drenados para posterior lançamento na rede de esgoto do município.

O segundo hospital incluído nesta pesquisa foi o Hospital da Criança Santo Antônio (HCSA), o único hospital para atendimento infantil no estado, com 167 leitos de internação e 10 leitos de UTI. A estrutura sanitária conta com caixas sépticas seladas que convergem para uma caixa biológica, com drenagem isolada para lançamento na rede de esgoto.

Figura 1 - Mapa da cidade de Boa Vista-RR e pontos de coleta de efluentes.



Para verificar a persistência de bactérias patogênicas em efluentes urbanos, foram coletados efluentes da Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) do município de Boa Vista-RR. A ETE conta com o sistema de tratamento por lagoas de estabilização, com as seguintes etapas: gradeamento das águas residuais em seu estado bruto, para separação de partículas sólidas; lagoa facultativa para degradação microbológica de matéria orgânica; e lagoa de maturação para eliminação de micro-organismos patogênicos. A partir da lagoa de maturação, os efluentes tratados seguem por um emissário até deságue no Rio Branco, à jusante da captação. Na estação, foram coletadas amostras das águas residuais pré-tratamento, após o gradeamento, e amostras do pós-tratamento, no ponto em que a água escoava para o emissário.

No HGR foram coletados efluentes de três caixas sépticas: uma desativada que recebia efluentes dos blocos de internação (HGR CS1); outra ativa que recebia efluentes dos blocos e UTIs (HGR CS2) e a caixa biológica (HGR CS3) que recebia todos os efluentes hospitalares e interligava-se com a rede de esgoto do município. No HCSA foram coletados efluentes apenas da caixa biológica (HCSA CB) que recebia todos os efluentes gerados, pois as caixas sépticas de passagem eram seladas, sem possibilidade de abertura para esta pesquisa.

Foram realizadas coletas de efluentes em caixas sépticas do Hospital Geral de Roraima (HGR) e do Hospital da Criança Santo Antônio (HCSA) em setembro de 2019 e dezembro de

2019, respectivamente. Para a coleta de efluentes hospitalares foi utilizado um modelo protótipo do coletor de efluentes em profundidade (depósito de patente BR nº 202018009448), e se deu de acordo com Brandão et al. (2017). O coletor foi submerso fechado para evitar o lodo superficial que se forma na caixa séptica, aberto numa profundidade de 30 cm e retirado da caixa séptica contendo 15 ml do resíduo líquido.

Para a coleta de efluentes urbanos na ETE foi utilizado um modelo protótipo do coletor de efluentes em profundidade (depósito de patente BR nº 202018009448), e se deu de acordo com Brandão et al. (2017). Foram realizadas duas coletas, sendo a primeira em abril de 2019 e a segunda em março de 2020. Em ambas, coletor foi submerso aberto, pois não havia lodo superficial, numa profundidade de 30 cm e retirado da lagoa contendo 15 ml do resíduo líquido. Na segunda coleta, os efluentes pós-tratamento foram coletados a 30 cm e 50 cm de profundidade. Os efluentes hospitalares e urbanos coletados foram armazenados em caixa térmica para transporte até o Laboratório de Bacteriologia do Laboratório Central de Roraima (LACEN-RR), onde se procedeu a análise microbiológica.

O material coletado foi diluído em solução salina na concentração de 1:10. Em seguida, o efluente foi semeado em ágar MacConkey a partir da diluição e diretamente do material coletado, e as placas foram inoculadas em estufa a 37°C por 24h. Após o crescimento de colônias bacterianas, foi realizada inoculação de colônias puras em ágar MacConkey, selecionadas de acordo com a morfologia da colônia.

A partir das colônias puras, foi realizada a identificação fenotípica de bactérias Gram-negativas através da série bioquímica (ANVISA, 2013), em que foram analisados seis parâmetros: citrato de Simmons, TSI (*Triple Sugar Iron*), SIM (*Sulphide Indole Motility*), Fenilalanina, Malonato e LIA (*Lysine Iron Agar*). Os tubos de ensaio foram inoculados em estufa a 35°C por 24h. Os resultados foram interpretados de acordo com as recomendações da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

Concomitante à identificação de espécies foi realizado o Teste de Sensibilidade a Antibacterianos (TSA) pelo sistema automatizado VITEK®2 somente para as amostras da primeira coleta na ETE. A colônia pura de bactéria foi diluída em solução salina na concentração de 0,5 na escala de McFerland. A partir deste preparo, foi diluído novamente numa proporção de 1:10 e inoculado na cartela do VITEK®2 para análise, com os seguintes antibacterianos: ampicilina, amoxicilina/ácido clavulânico, cefepima, cefuroxima, cefuroxima/axetil, cefalotina, ceftriaxona, ertapenem, meropenem, ácido nalidíxico, ciprofloxacina, norfloxacina, nitrofurantoína, piperacilina/tazobactam, sulfazotrim, amicacina e gentamicina. O sistema automatizado fornece os resultados com a Concentração Mínima Inibitória (MIC) e a interpretação categórica de S (sensível), I (intermediário) e R (resistente)

de acordo com os padrões estabelecidos pela *Clinical Standard Laboratory Institute* no documento M100 (CSLI, 2018).

As bactérias isoladas a partir dos efluentes hospitalares foram submetidas ao Teste de Sensibilidade a Antibacterianos (TSA) pela técnica de disco difusão em ágar Mueller Hinton de Kirby e Bauer (HUDZICKI, 2009). A colônia pura de bactéria foi diluída em solução salina na concentração de 0,5 na escala de McFarland. Em seguida, foram semeadas em ágar Mueller Hinton com swab. Foram testados os antibacterianos: ampicilina, amoxicilina/ácido clavulânico, aztreonam, cefepima, cefotaxima, cefuroxima, cefalotina, cefazolina, cefoxitina, ceftriaxona, imipenem, meropenem, tetraciclina, ácido nalidíxico, levofloxacina, piperacilina/tazobactam, sulfazotrim, cloranfenicol, amicacina e gentamicina, que foram depositados numa distância de 20 mm de centro a centro.

Na mesma placa, foi realizado o teste específico para detecção da produção de enzimas β -lactamases de espectro estendido (*Extended-Spectrum β -lactamases* – ESBL), pela técnica de disco de aproximação, em que o antibacteriano amoxicilina/ácido clavulânico é depositado no centro e rodeado pelos antibacterianos: aztreonam, cefotaxima, ceftriaxona e cefepima. A presença de distorção do halo (zona fantasma) entre os discos indica a produção de enzimas ESBL. As placas foram incubadas em estufa a 35°C por 24h. A leitura de todos os resultados se deu pelo diâmetro dos halos formados de acordo com os padrões estabelecidos pela *Clinical Standard Laboratory Institute* no documento M100-S22 (CSLI, 2012).

Em seguida, as bactérias foram inoculadas em Caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) em estufa a 35°C por 24h. Posteriormente transportadas para o Laboratório de Biologia Molecular (LaBMol), instalado no Centro de Estudos da Biodiversidade (CBio) na Universidade Federal de Roraima (UFRR), onde se deu prosseguimento às próximas etapas. As amostras foram submetidas à extração de DNA pelo método do choque térmico (CHAPMAN et al. 2001) com modificações segundo Brandão et al. (2017), que consiste em transferência do meio de cultura com crescimento para um microtubo de 1,5 ml, centrifugado a 6500 rpm por 10 minutos, dispensa-se o sobrenadante e ressuspende-se o precipitado em água ultrapura. Depois os microtubos são submetidos à fervura a 100 °C por 10 minutos e rapidamente arrefecidas em freezer -80°C. Estas amostras ficaram armazenadas em freezer -20°C.

O DNA extraído de todas as amostras foi submetido à Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para a detecção dos genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} e *bla*_{CTX-M} que são codificadores de β -lactamases de espectro estendido. Foi preparada uma solução com MgCl₂²⁺ (1,5 μ M), Tampão 1X, *Taq* DNA Polimerase (1U), dNTP (0,2 mM), iniciadores (25 pmol) e 5 μ l de DNA molde diluídos em água ultrapura em quantidade suficiente para o volume final de 25 μ l. Esta reação

ocorreu em termociclador Applied Biosystems ProFlex 3x32, segundo as condições descritas na tabela 1.

Tabela 1 - Descrição dos iniciadores e condições da PCR para detecção dos genes.

Gene	Iniciadores (5'-3')	Condições para Amplificação	Tamanho (pb)
<i>bla_{TEM}</i>	F-ATGAGTATTCAACATTTCCG R-CTGACAGTTACCAATGCTTA	1 ciclo por 5' a 96°C 35 ciclos de 1' a 96°C; 1' a 60°C; 1' a 72°C; 1 ciclo de 10' a 72°C.	867
<i>bla_{SHV}</i>	F-GGTTATGCGTTATATTCGCC R-TTAGCGTTGCCAGTGCTC		867
<i>bla_{CTX-M}</i>	F-ATGTGCAGYACCAGTAARGT R-CTGACAGTTACCAATGCTTA	1 Ciclo de 7' a 94°C 35 Ciclos de 50" a 94°C; 40" a 50°C; 1' a 72°C; 1 Ciclo de 5' a 72°C.	593

Fonte: Ferreira et al. (2011).

Para a identificação genotípica das espécies foi realizada PCR para o gene rRNA 16S, com os iniciadores 27F (3'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-5') e 1492R (3'-GGTTACCTTGTTACGACTT-5'), gerando um produto de ~1500pb. As condições para amplificação foram: desnaturação inicial de 5 min a 96° C, estágio com 35 ciclos, sendo um minuto a 96°C para desnaturação, um minuto a 60°C para anelamento e dois minutos a 72°C para extensão, finalizando com um estágio de extensão final a 72°C por 10 min (FERREIRA et al., 2011).

Para verificar o produto amplificado, foi realizada eletroforese em gel de agarose, preparado a uma concentração de 1,8% e tampão TBE. Do amplificado de cada amostra, 5 µl foi corado com *Blue Green* (0,7 µl), adicionado azul de bromofenol e sacarose a 10% (2,0 µl) para dar peso à molécula de DNA. Foi aplicando 2,0 µl um padrão de peso molecular (100 pb). Este gel foi submerso em TBE e submetido a uma corrente elétrica, e posteriormente analisado em Fotodocumentador UV MiniBis. A amplificação foi verificada pela presença de uma linha e confirmada pelo alinhamento, de acordo com o tamanho do gene amplificado, com o marcador de peso molecular.

Foi realizada reação de sequenciamento de Sanger do gene RNAr 16S para determinar genotipicamente as espécies bacterianas das cepas isoladas, de acordo com o fabricante. Para cada amostra foram realizadas duas reações a fim de gerar as sequências senso (27F) e anti-

senso (1492R). Em cada reação de sequenciamento foi utilizado 1 µl de DNA amplificado, 0,3 µl de Tampão BigDye® Terminator versão 3.1 (Applied Biosystems™, USA), 1,85 µl de tampão de sequenciamento 5X (SaveMoney), 1 µl de iniciador e água ultrapura livre de nucleases suficiente para 10 µl. A reação de amplificação foi realizada em termociclador, nas seguintes condições: desnaturação inicial a 96°C por um minuto; 25 ciclos com desnaturação a 96°C por 10 segundos, anelamento a 50°C por 10 minutos e extensão a 60°C por quatro minutos. O produto da reação foi submetido à purificação pela precipitação com etanol, EDTA e acetato de sódio. O produto sequenciado foi analisado em sequenciador automatizado Genetic Analyzer 3500 (Applied BioSystems™).

As sequências obtidas foram analisadas usando o *software* Geneious® versão 5.5.4 (DRUMMOND et al., 2020). Neste *software*, foi avaliada a qualidade das sequências obtidas, através da análise do eletroferograma, onde um valor de QV (do inglês *Quality Value*) indicou a qualidade. A identidade da bactéria foi determinada por meio de alinhamento das sequências consensos obtidas com sequências depositadas no Banco de Dados e Sequências Genéticas - GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) através da ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), que alinha as sequências através da similaridade entre elas. A similaridade considerada para esse estudo foi de > 98%.

Foi realizado teste do quiquadrado de aderência no *software* Bioestat v. 5.0 (AYRES, M. et al., 2007) para comparar a frequência de bactérias portadoras de genes codificadores de ESBL encontradas nos efluentes hospitalares e aquelas encontradas nos efluentes urbanos, a fim de esclarecer a diferença significativa entre os dois tipos de efluentes

Resultados e Discussão

Foram isoladas 16 cepas de bacilos Gram-negativos a partir dos efluentes hospitalares, distribuídos nos três pontos de coleta no HGR e no único ponto de coleta do HCSA. Os resultados para as espécies identificadas fenotípica e genotipicamente, perfil de resistência obtido pelo teste de sensibilidade a antibacterianos e genes codificadores de ESBL encontrados nas cepas estão dispostos na tabela 2.

A espécie *K. pneumoniae* se mostrou prevalente em 25% das cepas isoladas a partir de efluentes hospitalares e todas eram portadoras de pelo menos um gene ESBL, com destaque para uma cepas desta espécie portando simultaneamente os três genes pesquisados na caixa biológica de confluência do HGR, da qual são lançados para a rede de esgoto da cidade. Inclusive, neste ponto, todas as cepas isoladas possuíam genes codificadores de ESBL. As espécies *P. aeruginosa* e *A. caviae* se mostraram frequentes em 12,5% cada entre as cepas

isoladas, com apenas uma cepa de cada espécie portando os genes *bla*_{CTX-M} e *bla*_{TEM}, respectivamente.

Tabela 2 – Espécies identificadas, perfil de sensibilidade a antibacterianos e genes codificadores de ESBL encontrados nas cepas isoladas de efluentes hospitalares por ponto de amostragem.

Ponto de amostragem	Gênero/Espécie identificadas fenotipicamente	Gênero/Espécie identificadas genotipicamente	Resistência aos antibacterianos	Genes codificadores de ESBL
HGR CS1	BGN	<i>Aeromonas enteropelogenes</i>	Não testado	<i>bla</i> _{SHV}
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Nenhum	<i>bla</i> _{SHV}
	<i>Enterobacter sakazaki</i>	<i>Leclercia adecarboxylata</i>	AMP, AMC, PPT, CFL, CFZ, CRX, CFO, CTX, ATM, CRO, CPM, GEN e TET.	Nenhum
	<i>Providencia retgeri</i> ¹	-	Não testado	Nenhum
HGR CS2	<i>Providencia stuarti</i>	<i>Aeromonas caviae</i>	Não testado	Nenhum
	<i>Salmonella</i> sp.	<i>Chromobacterium violaceum</i>	AMP, CFL, CRX, CFZ, CRX E CTX	<i>bla</i> _{CTX-M}
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AMP	<i>bla</i> _{SHV}
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Nenhum	<i>bla</i> _{SHV}
	<i>Citrobacter diversus</i>	<i>Phytobacter diazotrophicus</i>	NIT ²	Nenhum
HGR CS3	<i>Citrobacter</i> sp.	<i>Aeromonas caviae</i>	AMP, AMC, CFL, CRX, CFZ, CFO, CTX, CRO, CPM, ATM, PPT, SUT, TET e NAL	<i>bla</i> _{TEM}
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Escherichia coli</i>	AMP, AMC, CFL, CRX, CFZ, CFO, CTX, CRO, CPM, ATM, PPT, SUT e NAL	<i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{SHV} e <i>bla</i> _{CTX-M}
	<i>Klebsiella</i> sp.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AMP, AMC, CFL, CRX, CFZ, CFO, CTX, CRO, CPM, ATM, PPT, SUT, LEVO, TET e NAL	<i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{SHV} e <i>bla</i> _{CTX-M}
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Shigella sonnei</i>	CFL, CRX, CFZ, NAL e SUT	<i>bla</i> _{CTX-M}
	BGN ¹	-	Não testado	<i>bla</i> _{TEM}
	HCSA CB	BGN	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	AMP, AMC, CFL, CRX, CFZ, AMI e NAL
BGN		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	AMP, AMC, CFL, CRX, CFZ, CFO, CRO, CTX, ATM, IMI, MER, NAL e CLO	<i>bla</i> _{CTX-M}

¹Espécies identificadas apenas com análise fenotípica. ²Antibiograma realizado em VITEK-2. BGN = Bacilo Gram-negativo Não Fermentador da Glicose. HGR CS1: Caixa Séptica 1 do HGR; HGR CS2: Caixa Séptica 2 do HGR; HGR CS3: Caixa Séptica 3 do HGR; HCSA CB: Caixa Biológica do HGR. AMP = ampicilina; AMC = amoxicilina/ácido clavulânico; PPT = piperacilina/tazobactam; CFL = cefalotina; CFZ = cefazolina; CRX =

cefuroxima; CFO = cefoxitina; CTX = cefotaxima; CRO = ceftriaxona; CPM = cefepima; ATM = aztreonam; IMI = imipenem; MER = meropenem; AMI = ampicilina; GEN = gentamicina; NAL = ácido nalidíxico; SUT = sulfatrimetropim; LEVO = levofloxacina; TET = tetraciclina; CLO = cloranfenicol; NIT = Nitrofurantoína.

Ocorreram apenas uma cepa de cada espécie a seguir: *Providencia retgeri* (6,25%), *Aeromonas enteropelogenes* (6,25%), *Leclercia adecarboxylata* (6,25%), *Phytobacter diazotrophicus* (6,25%), *Chromobacterium violaceum* (6,25%), *Shigella sonnei* (6,25%), um BGN (6,25%) e uma *Escherichia coli* (6,25%), esta última na caixa de confluência portando os três genes simultaneamente.

Estes resultados corroboram com os achados por Brandão et al. (2017), em que houve prevalência do gênero *Klebsiella* entre as cepas isoladas a partir de efluentes do mesmo hospital público aqui analisado, além disso, também portadoras dos genes codificadores de ESBL. A espécie *K. pneumoniae* é bastante associada ao ambiente clínico, frequentemente prevalente em infecções graves e com perfil multirresistente, portando um ou mais genes codificadores de ESBL (FERREIRA et al., 2019). A presença de patógenos desse gênero portando genes *bla* em efluentes hospitalares representa uma ameaça à saúde de funcionários do setor sanitário do hospital.

Nesta pesquisa foi possível identificar cepas do gênero *Aeromonas*, como *A. enteropelogenes* portando o gene *bla_{SHV}* e *A. caviae* portando *bla_{TEM}*. Os bacilos deste gênero são comuns do ambiente aquático, mas também são considerados patógenos emergentes (PESSOA et al., 2019). Espécies de *Aeromonas* também podem ser encontradas em efluentes e corpos d'água naturais impactados diretamente por resíduos líquidos portando genes codificadores de ESBL (HARNISZ; KORZENIEWSKA, 2018). Como este gênero é bem adaptado ao ambiente aquático, mas também é um patógeno emergente portador de genes ESBL, tem grande potencial de cumprir a função de reservatório desses genes no ambiente natural.

Duas coletas de efluentes urbanos foram realizadas na ETE, na primeira, nove cepas foram isoladas, e na segunda, treze cepas foram isoladas e não foi possível realizar o antibiograma para traçar o perfil de sensibilidade a antibacterianos. Estes resultados podem ser visualizados nas tabelas 3 e 4.

O gênero *Aeromonas* se mostrou prevalente entre as amostras do pré-tratamento na primeira coleta, porém na segunda coleta, houve prevalência do gênero *Klebsiella* no mesmo ponto de coleta. Já no ponto de amostragem do pós-tratamento, houve diferença no número de cepas isoladas, com prevalência do gênero *Enterobacter* na segunda coleta, em que houve coleta em triplicata dos efluentes, o que pode explicar o número maior de cepas detectadas em relação a primeira coleta.

Tabela 3 – Espécies identificadas, perfil de sensibilidade a antibacterianos e genes codificadores de ESBL encontrados nas cepas da primeira coleta por ponto de amostragem na ETE.

Ponto de Amostragem	Gênero/Espécie identificadas fenotipicamente	Gênero/Espécie identificadas genotipicamente	Resistência aos antibacterianos	Genes codificadores de ESBL
Pré-tratamento	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Aeromonas caviae</i>	Não realizado	Nenhum
	<i>Citrobacter diversus</i>	<i>Aeromonas caviae</i>	Não realizado	Nenhum
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Aeromonas enteropelogenes</i>	Não realizado	<i>bla</i> _{CTX-M}
	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Citrobacter freundii</i>	CFL	<i>bla</i> _{SHV}
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	AMP, AMC e CFL	Nenhum
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	AMP, CLF e SUT	<i>bla</i> _{TEM}
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AMP	Nenhum
Pós- Tratamento	<i>Citrobacter diversus</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	AMP, AMC, CFL, e NAL	<i>bla</i> _{TEM}
	<i>Klebsiella oxytoca</i> *	-	AMP, AMC, CFL, CRX, CRXAC e PPT	Nenhum

*Bactérias identificadas fenotipicamente somente. AMP = ampicilina; AMC = amoxicilina/ácido clavulânico; CFL = cefalotina; CRX = cefuroxima; SUT = sulfatrimetropim; NAL = ácido nalidíxico.

Tabela 4 – Espécies identificadas e genes codificadores de ESBL encontrados nas cepas da segunda coleta por ponto de amostragem na ETE.

Ponto de Amostragem	Gênero/Espécie identificadas fenotipicamente	Gênero/Espécie identificadas genotipicamente	Genes codificadores de ESBL
Pré-Tratamento	<i>Providencia sp.</i>	<i>Aeromonas cavie</i>	Nenhum
	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Nenhum
	<i>Escherichia coli</i> *	-	Nenhum
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Nenhum
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>bla</i> _{SHV}
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>bla</i> _{SHV}
Pós-tratamento	<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	Nenhum
	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	Nenhum
	<i>Enterobacter sp.</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	Nenhum
	<i>Klebsiella ozaenae</i>	<i>Enterobacter asburiae</i>	Nenhum
	<i>Hafnia alvei</i>	<i>Enterobacter asburiae</i>	Nenhum
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Enterobacter ludwigii</i>	Nenhum
	<i>Hafnia alvei</i>	<i>Serratia marcescens</i>	Nenhum

*Bactérias identificadas fenotipicamente somente.

Os genes codificadores de ESBL foram encontrados numa frequência maior nos efluentes do tanque de elevação, no ponto de amostragem do pré-tratamento, sendo três cepas na primeira coleta, cada uma pertencente às espécies *K. oxytoca*, *E. cloacae* e *E. coli* portando um gene

ESBL, sendo eles *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV} e *bla*_{TEM}, respectivamente. Na segunda coleta apenas duas cepas pertencentes à espécie *K. pneumoniae* no mesmo ponto foram isoladas portando o gene *bla*_{SHV}. Apesar do número de cepas coletadas no pós-tratamento ter sido maior na segunda coleta, foi na primeira coleta que o gene *bla*_{TEM} foi detectado em uma cepa de *E. cloacae*.

Estes resultados demonstram a persistência dos gêneros *Klebsiella* e *Aeromonas* nos efluentes urbanos, principalmente nos efluentes pré-tratamento da ETE. Resultados semelhantes para a *K. pneumoniae* foram observados por Zagui et al. (2020), em que a espécie foi encontrada com maior prevalência em efluentes hospitalares, mas quatro cepas foram encontradas em efluentes da estação de tratamento. Os autores também encontraram nove cepas de *P. aeruginosa* em efluentes hospitalares, mas eles encontraram apenas uma cepa da mesma espécie em efluentes urbanos. A diminuição da frequência dessa espécie entre os dois tipos de efluentes também é observada nos resultados aqui obtidos: nos efluentes hospitalares duas cepas de *P. aeruginosa* foram identificadas, mas nenhuma em efluentes urbanos.

Apesar do gênero *Aeromonas* se manter nos efluentes urbanos, apenas um isolado de *A. enteropelogenes* foi portador do gene *bla*_{CTX-M}, enquanto nos efluentes hospitalares uma cepa da mesma espécie portava o gene *bla*_{SHV} e uma cepa de *A. caviae* portava o gene *bla*_{TEM}. Estes achados parecem sugerir a possibilidade desse gênero manter genes de resistência no ambiente. Mas Piotrowska, Kowalska e Popowska (2019) concluem que os bacilos Gram-negativos da família Enterobacteriaceae tem uma probabilidade maior de manter a resistência a β -lactâmicos na estação de tratamento que o gênero *Aeromonas*.

Nos efluentes do pós-tratamento da estação de tratamento foi prevalente o gênero *Enterobacter*, embora em nenhum tenha sido detectado genes codificadores de ESBL. Mas Rodríguez et al. (2020) que também encontraram prevalência desse gênero em diferentes estágios do tratamento de esgoto, alertam que *Enterobacter* e *Klebsiella* estão entre os gêneros mais importantes entre os mais prevalentes na resistência a carbapenêmicos em ambientes aquáticos.

Para a análise das cepas isoladas dos efluentes hospitalares e urbanos foram utilizadas as técnicas da série bioquímica, para identificação fenotípica, e sequenciamento do gene RNAr 16S, para identificação genotípica. Ao comparar esses resultados, através do sequenciamento foi possível identificar 87,5% (14) das cepas isoladas a partir de efluentes hospitalares, dentre as quais 28,8% (4) foram convergentes com os resultados observados na identificação fenotípica. Já nas cepas isoladas a partir de efluentes urbanos 90,9% (20) das cepas foram identificadas genotipicamente, dentre as quais 30% (6) convergiram para os resultados da identificação fenotípica.

A técnica de identificação fenotípica pela série bioquímica é limitada pela quantidade de parâmetros analisados, como no caso do presente estudo, em que os testes são voltados para espécies de enterobactérias (ANVISA, 2013). Nem toda espécie bacteriana pode ser isolada em meio de cultura, algumas tem crescimento lento e outras podem sofrer stress capaz de alterar o padrão bioquímico durante o isolamento, levando a identificação errônea (RIZAL et al., 2020). O sequenciamento do gene RNAr 16S desempenha um papel importante na identificação de isolados desconhecidos ou com perfis bioquímicos ambíguos, além de melhorar a capacidade de reconhecer patógenos emergentes pouco descritos (BAJPAI et al., 2017). Desta forma, a identificação genotípica neste trabalho não tem o objetivo de confrontar resultados, mas sim de auxiliar na identificação de bactérias, superando as limitações da identificação fenotípica.

Como a busca pelos genes codificadores de ESBL foi realizada para todas as cepas isoladas, tanto de efluentes hospitalares como de efluentes urbanos, a caracterização genotípica da resistência a antibacterianos foi assumida como parâmetro de comparação entre os dois tipos de efluentes. A tabela 5 mostra o resultado dessa comparação entre os efluentes para bactérias portadoras de genes *bla*.

A maior frequência de bactérias portadoras de genes *bla* foi encontrada em efluentes hospitalares e uma frequência significativamente menor foi encontrada em efluentes urbanos. Estes resultados corroboram com os achados de Al Salah et al. (2020) que apontam os efluentes hospitalares como principais reservatórios de resistência bacteriana a antibacterianos e um dos principais contribuintes da disseminação de genes de resistência no ambiente aquático.

Tabela 5 – Comparação entre as cepas portadoras de genes codificadores de ESBL em efluentes hospitalares e efluentes urbanos.

Genes <i>bla</i>	Hospitais Públicos		ETE			
	N	%	N	%		
Presente	11	68,75	6	27,27	<i>p</i> *	
Ausente	5	31,25	16	72,73		0,0001
TOTAL	16	100	22	100		

*teste X² de aderência

Estes resultados corroboram com as pesquisas mais recentes relatando os efluentes hospitalares como importante fonte de disseminação de genes de resistência no ambiente aquático (AL SALAH et al., 2020; LORENZO et al., 2018; WALIA et al., 2016; ZAGUI et al., 2020). A baixa frequência de bactérias portadoras de genes ESBL na estação de tratamento de esgoto pode ser causada pelo fator de diluição, uma vez que os efluentes hospitalares contribuem em 3% a 11% nos influentes da ETE (AYDIN et al., 2018). A capacidade de

sobrevivência em ambientes aquáticos dos gêneros encontrados aqui nessa pesquisa aponta para a ameaça ambiental de disseminação de genes de resistência em corpos d'água naturais (CONTE et al., 2020).

A descarga de efluentes tratados em um rio aumenta a possibilidade de prevalência dessas bactérias multirresistentes neste corpo d'água em relação a um rio que não recebe tal descarga (HARNISZ; KORZENIEWSKA, 2018). Além disso, apenas 15% do esgoto gerado em Roraima é tratado, e o município de Boa Vista é o único que conta com tratamento de esgoto (ANA, 2017). No ponto de descarga de efluentes no Rio Branco a água é classificada com uma capacidade ruim de diluição, atendendo a classe 2 com 90% a 97% de remoção da carga orgânica (ANA, 2017). Sendo assim, a descarga cepas portadoras de resistência bacteriana comprometeriam ainda mais a qualidade da água do Rio Branco, podendo atingir as comunidades ribeirinhas que utilizam desta para seu consumo (VELASCO et al., 2020). Esforços são necessários para minimizar esses impactos, seja na implantação de tratamentos prévios específicos dos efluentes hospitalares, seja na vigilância dessa multirresistência bacteriana na ETE de Boa Vista.

Conclusão

Os efluentes hospitalares possuem uma frequência significativamente maior de cepas portadoras de genes codificadores de ESBL em comparação com os efluentes da ETE, representando uma ameaça à saúde dos funcionários do setor sanitário dos hospitais e da comunidade no entorno. Além disso, os achados apontam os efluentes hospitalares como principais contribuidores da multirresistência bacteriana no ambiente. Apesar da baixa frequência encontrada na ETE em relação aos efluentes hospitalares, a presença de bactérias portadoras de genes codificadores de ESBL nos efluentes urbanos representa uma ameaça à comunidade no entorno e sugere a possibilidade dessa via como disseminadora no ambiente natural. Medidas de controle e vigilância devem ser adotadas tanto no ambiente hospitalar como na ETE, para minimizar a possibilidade de disseminação dessa multirresistência no ambiente natural.

Referências

AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS (BRASIL). **Atlas esgotos: despolição de bacias hidrográficas**. Brasília, DF: ANA, 2017.

AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS (BRASIL). **Conjuntura dos recursos hídricos no Brasil 2019: informe anual**. Brasília, DF: ANA, 2019.

AL SALAH, D. M. M. et al. Hospital wastewaters: A reservoir and source of clinically relevant bacteria and antibiotic resistant genes dissemination in urban river under tropical conditions. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 200, [s.n], p. 1-9, 2020.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde: Módulo 6: Detecção e identificação de bactérias de importância médica**. Brasília: ANVISA, 2013. 150 p.

ASSUNÇÃO, R. G. et al. Antimicrobial resistance of microorganisms causing pneumonia in patients of a public hospital in Brazilian pre-amazon region. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, Hoboken, v. 7, [s.n], p. 15-21, 2019.

AYDIN, S. et al. Antibiotics in hospital effluents: occurrence, contribution to urban wastewater, removal in a wastewater treatment plant, and environmental risk assessment. **Environmental Science and Pollution Research**, Switzerland, v. 26, n. 1, p. 544-558, out. 2019.

AYRES, M. et al. Bioestat 5.0 aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Belém: IDSM, 2007. 364p.

BAJPAI, T. et al. Accurate identification of urinary isolates: Integration of conventional, automated, and molecular methods. **International Journal of Health & Allied Sciences**, Mysore, v. 6, n. 2, p. 82-87, 2017.

BRANDÃO, M. B. S. et al. Isolation of Extended-Spectrum Beta-Lactamases Producing Strains on Effluent of State Hospital from Boa Vista-RR. **Electronic Journal of Management, Education and Environmental Technology (REGET)**, Santa Maria, v. 21, n. 3, p. 248-258, 2017.

BUELOW, E. et al. Limited influence of hospital wastewater on the microbiome and resistome of wastewater in a community sewerage system. **FEMS microbiology ecology**, Delft, v. 94, n. 7, p. 1-9, maio 2018.

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

CHAPMAN, P. A. *et al.* Comparison of culture, PCR and immunoassays for detecting *Escherichia coli* O157 following enrichment culture and immunomagnetic separation performed on naturally contaminated raw meat products. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 68, n. 1, p. 11-20, 2001.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 28 ed. Twenty Second Information Supplement M100. Wayne, PA: **Clinical Laboratory and Standard Institute**. 2018.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing - Twenty Second Information Supplement. M100-S22. **Clinical Laboratory and Standard Institute**, v.32, n.3, jan. 2012.

COMPANHIA DE ÁGUAS DE ESGOTOS DE RORAIMA. CAER. **Saneamento**. Disponível em:< <http://www.caer.com.br/saneamento/>>. Acesso em: 16 set. 2020.

CONTE, D. et al. Diversity of Antimicrobial-Resistant *Aeromonas* Species Isolated from Aquatic Environments in Brazil. **bioRxiv**, New York, [s.v], [s.n], jun. 2020.

ETEBU, E.; ARIKEKPAR, I. Antibiotics: Classification and mechanisms of action with emphasis on molecular perspectives. **International Journal of Applied Microbiology and Biotechnology Research**, London, v. 4, [s.n], p. 90-101, 2016.

FERREIRA, C. M. et al. Extended-Spectrum Beta-Lactamase-producing bacteria isolated from hematologic patients in Manaus, state of Amazonas, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 42, n. 3, p. 1076-1084, jul./set. 2011.

FERREIRA, R. L. et al. High prevalence of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* harboring several virulence and β -lactamase encoding genes in a Brazilian intensive care unit. **Frontiers in microbiology**, v. 9, n.1, p. 1-15, 2019.

FISHMAN, M. R. et al. Physiological and genetic characterization of calcium phosphate precipitation by *Pseudomonas* species. **Scientific Reports**, Switzerland, v. 8, n. 1, p. 10156, 2018.

HARNISZ, M.; KORZENIEWSKA, E. The prevalence of multidrug-resistant *Aeromonas* spp. in the municipal wastewater system and their dissemination in the environment. **Science of the Total Environment**, v. 626, p. 377-383, 2018.

HUDZICKI, J. Kirby-Bauer disk diffusion susceptibility test protocol. **American Society for Microbiology**, Washington, [s.v], [s.n], p. 1-23, dez. 2009.

LOPATKIN, A. J. et al. Antibiotics as a selective driver for conjugation dynamics. **Nature microbiology**, London, v. 1, n. 6, p. 16044, 2016.

LORENZO, P. et al. Antibiotic resistance in urban and hospital wastewaters and their impact on a receiving freshwater ecosystem. **Chemosphere**, Amsterdam, v. 206, [s.n], p. 70-82, set. 2018.

MALDONADO, R. F.; SÁ-CORREIA, I.; VALVANO, M. A. Lipopolysaccharide modification in Gram-negative bacteria during chronic infection. **FEMS microbiology reviews**, Oxford, v. 40, n. 4, p. 480-493, 2016.

MCLELLAN, L. K.; HUNSTAD, D. A. Urinary tract infection: pathogenesis and outlook. **Trends in molecular medicine**, Cambridge, v. 22, n. 11, p. 946-957, 2016.

MOUBARECK, C. A.; HALAT, D. H. Insights into *Acinetobacter baumannii*: A Review of Microbiological, Virulence, and Resistance Traits in a Threatening Nosocomial Pathogen. **Antibiotics**, Basel, v. 9, n. 3, p. 119, 2020.

NEPAL, R. et al. Antibiotic Susceptibility Pattern of Gram-negative Isolates of Lower Respiratory Tract Infection. **Journal of Nepal Health Research Council**, Kathmandu, v. 16, n. 1, p. 22-26, 2018.

PAL, A. et al. Emerging contaminants of public health significance as water quality indicator compounds in the urban water cycle. **Environment International**, Amsterdam, v. 71, n. 1, p. 46-62, 2014.

PESSOA, R. B. G. et al. The genus *Aeromonas*: a general approach. **Microbial pathogenesis**, Amsterdam, v. 130, [s.n], p. 81-94, 2019.

PIOTROWSKA, M.; KOWALSKA, S.; POPOWSKA, M. Diversity of β -lactam resistance genes in gram-negative rods isolated from a municipal wastewater treatment plant. **Annals of Microbiology**, London, v. 69, n. 6, p. 591-601, 2019.

RAFRAF, I. D. et al. Abundance of antibiotic resistance genes in five municipal wastewater treatment plants in the Monastir Governorate, Tunisia. **Environmental Pollution**, Amsterdam, v. 219, [s.n.], p. 353-358, 2016.

RAHMAN, S. U. et al. The growing genetic and functional diversity of extended spectrum beta-lactamases. **BioMed research international**, v. 2018, [s.n], p. 1-14, 2018.

RODRÍGUEZ, E. A. et al. High frequency of gram-negative bacilli harboring *bla*_{KPC-2} in the different stages of wastewater treatment plant: A successful mechanism of resistance to carbapenems outside the hospital settings. **Journal of Environmental Management**, Amsterdam, v. 271, n. 1, p. 1-10, 2020.

RIZAL, N. S. M. et al. Advantages and Limitations of 16S rRNA Next-Generation Sequencing for Pathogen Identification in the Diagnostic Microbiology Laboratory: Perspectives from a Middle-Income Country. **Diagnostics**, Basel, v. 10, n. 10, p. 1-19, 2020.

SHAIKH, S. et al. Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment. **Saudi journal of biological sciences**, Amsterdam, v. 22, n. 1, p. 90-101, 2015.

SHIKLOMANOV, I. A. **World water resources: a new appraisal and assessment for the 21st century**. 1.ed. Paris: UNESCO, 1998, 40 p.

THEURETZBACHER, U. Global antimicrobial resistance in Gram-negative pathogens and clinical need. **Current Opinion in Microbiology**, Amsterdam, v. 39, [s.n], p. 106-112, 2017.

Universidade Federal de Roraima, Instituto Federal de Roraima. Márcia Brazão e Silva Brandão; Derlano Bentes Capucho; Fabiana Granja. **Coletor de Efluentes em Profundidade**. BR n. 202018009448, 10 maio 2018, 10 maio 2028.

VELASCO, M. F. Surface water Treatment for the attendance of Riverside Communities of the Brazilian Amazon. **International Journal of Advanced Engineering Research and Science**, Jaipur, v. 7, n. 3, p. 87-99, 2020.

WALIA, S. et al. Quantitation of antibiotic resistance genes pollution in hospital wastewater effluent and Urban Clinton River Water, Michigan, USA. **Current Medicine Research and Practice**, Amsterdam, v. 6, n. 4, p. 149-151, 2016.

WORLD WATER ASSESSMENT PROGRAMME (UNITED NATIONS). **Water for People, Water for Life: The United Nations World Water Development Report: Executive Summary**. Genebra: Unesco, 2003.

ZAGUI, G. S. et al. Gram-negative bacteria carrying β -lactamase encoding genes in hospital and urban wastewater in Brazil. **Environmental monitoring and assessment**, Switzerland, v. 192, n. 6, p. 1-11, 2020.

5 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos nessa pesquisa, os efluentes hospitalares representam uma importante fonte de disseminação de bactérias Gram-negativas portadoras de genes codificadores de ESBL que causam resistência aos principais fármacos empregados na rotina clínica. Apesar de os efluentes urbanos apresentarem uma baixa frequência de bactérias com genes ESBL, traços de resistência a fármacos β -lactâmicos e fármacos de outras classes puderam ser observados.

Provavelmente a mistura dos efluentes hospitalares emitidos na rede de esgoto da cidade de Boa Vista-RR tenha influenciado na detecção de poucas cepas portadoras de genes de resistência na estação de tratamento em relação aos resíduos líquidos dos hospitais públicos. Mas ainda assim, algumas cepas de interesse clínico conseguem manter a resistência aos antibacterianos e portar genes codificadores de ESBL nos efluentes urbanos da cidade de Boa Vista-RR.

Estes resultados contribuem para caracterização genética da resistência a β -lactâmicos em efluentes hospitalares e urbanos da cidade de Boa Vista, Roraima, Brasil. Além de alertarem para o risco de disseminação dessas bactérias no ambiente natural através dos efluentes que chegam ao Rio Branco; necessidade de controle e vigilância da multirresistência no setor sanitário de hospitais e na estação de tratamento de esgoto; e de tratamentos prévios dos efluentes hospitalares antes que sejam lançados na rede de esgoto da cidade.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-RAOUF, N.; AL-HOMAIDAN, A. A.; IBRAHEEM, I. B. M. Microalgae and wastewater treatment. **Saudi journal of biological sciences**, Amsterdam, v. 19, n. 3, p. 257-275, 2012.
- AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS (BRASIL). **Atlas esgotos: despoluição de bacias hidrográficas**. Brasília, DF: ANA, 2017.
- AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS (BRASIL). **Conjuntura dos recursos hídricos no Brasil 2019: informe anual**. Brasília, DF: ANA, 2019.
- AMBLER, R. P. The Structure of β -Lactamases. **Philosophical Transactions of The Royal Society London B**, London, v. 289, n. 1036, p. 321-331, 1980.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência a Saúde: Módulo 6: Detecção e identificação de bactérias de importância médica**. Brasília: ANVISA, 2013. 150 p.
- ARAI, H. Regulation and function of versatile aerobic and anaerobic respiratory metabolism in *Pseudomonas aeruginosa*. **Frontiers in microbiology**, Lausanne, v. 2, [s.n], p. 103, 2011.
- ASSUNÇÃO, R. G. et al. Antimicrobial resistance of microorganisms causing pneumonia in patients of a public hospital in Brazilian pre-amazon region. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, Hoboken, v. 7, [s.n], p. 15-21, 2019.
- BAJPAI, T. et al. Accurate identification of urinary isolates: Integration of conventional, automated, and molecular methods. **International Journal of Health & Allied Sciences**, Mysore, v. 6, n. 2, p. 82-87, 2017.
- BALOUIRI, M.; SADIKI, M.; IBNSOUDA, S. K. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. **Journal of pharmaceutical analysis**, Amsterdam, v. 6, n. 2, p. 71-79, 2016.
- BECKER, B.; COOPER, M. A. Aminoglycoside antibiotics in the 21st century. **ACS chemical biology**, Washington, v. 8, n. 1, p. 105-115, 2012.
- BETTIOL, E. O.; HARBARTH, S. J. Development of new antibiotics: taking off finally. **Swiss medical weekly**, Muttentz, v. 145, [s.n], p. w14167, 2015.
- BHATT, P. et al. Evaluation of Factors Influencing the Environmental Spread of Pathogens by Wastewater Treatment Plants. **Water, Air, & Soil Pollution**, Switzerland, v. 231, n. 8, p. 1-14, 2020.
- BISOGNIN, R. P. et al. Analysis of microbial potential of a biopile in soil bioremediation contaminated by petroleum hydrocarbons. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, Rio de Janeiro, v. 23, n. 3, p. 517-526, 2018.

BLAIR, J. M. A. et al. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature reviews: Microbiology**, London, v. 13, n. 1, p. 42-51, jan. 2015.

BONNET, R. Growing group of extended-spectrum β -lactamases: the CTX-M enzymes. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Washington, v. 48, n. 1, p. 1-14, 2004.

BRANDÃO, M. B. S. et al. Isolation of Extended-Spectrum Beta-Lactamases Producing Strains on Effluent of State Hospital from Boa Vista-RR. **Electronic Journal of Management, Education and Environmental Technology (REGET)**, Santa Maria, v. 21, n. 3, p. 248-258, 2017.

BRASIL. Resolução CONAMA nº 430, de 13 de maio de 2011. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução nº 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 13 maio 2011.

BRASIL. Resolução CONAMA nº 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 18 mar. 2005.

BRASIL. Lei nº 9.433, de 8 de janeiro de 1997. Institui a Política Nacional de Recursos Hídricos, cria o Sistema Nacional de Gerenciamento de Recursos Hídricos Hídricos, regulamenta o inciso XIX do art. 21 da Constituição Federal, e altera o art. 1º da Lei nº 8.001, de 13 de março de 1990, que modificou a Lei nº 7.990, de 28 de dezembro de 1989. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 9 jan. 1997.

BUELOW, E. et al. Limited influence of hospital wastewater on the microbiome and resistome of wastewater in a community sewerage system. **FEMS microbiology ecology**, Delft, v. 94, n. 7, p. 1-9, 2018.

BUSH, K.; BRADFORD, P. A. β -Lactams and β -lactamase inhibitors: an overview. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, New York, v. 6, n. 8, p. a025247, 2016.

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

BUSH, K.; JACOBY, G. A.; MEDEIROS, A. A. A Functional Classification Scheme for β -Lactamases and Its Correlation with Molecular Structure. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 39, n. 6, p. 1211-1233, jun. 1995.

CABRAL, J. P. S. Water microbiology: Bacterial pathogens and water. **International journal of environmental research and public health**, Basel, v. 7, n. 10, p. 3657-3703, 2010.

CAMP, C.; TATUM, O. L. A review of *Acinetobacter baumannii* as a highly successful pathogen in times of war. **Laboratory Medicine**, Oxford, v. 41, n. 11, p. 649-657, 2010.

CARVALHO, M. S. et al. Concentração de metais no rio Doce em Mariana, Minas Gerais, Brasil. **Acta Brasiliensis**, Patos, v. 1, n. 3, p. 37-41, 2017.

CERCEO, E. et al. Multidrug-Resistant Gram-negative Bacterial Infections in the Hospital Setting: Overview, implications for Clinical Practice and Emerging Treatment Options. **Microbial Drug Resistance**, New York, v. 22, n. 5, p. 412-431, 2016.

CHOPRA, I.; ROBERTS, M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 65, n. 2, p. 232-260, 2001.

COLODNER, R. et al. Risk factors for the development of extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria in nonhospitalized patients. **European journal of clinical microbiology and infectious diseases**, Berlin, v. 23, n. 3, p. 163-167, 2004.

COMPANHIA DE ÁGUAS DE ESGOTOS DE RORAIMA. CAER. **Saneamento**. Disponível em: < <http://www.caer.com.br/saneamento/>>. Acesso em: 16 set. 2020.

DONG, H. et al. Structural basis for outer membrane lipopolysaccharide insertion. **Nature**, Switzerland, v. 511, n. 7507, p. 52-56, jul. 2014.

DOOSTI, A. et al. TEM and SHV genes in *Klebsiella pneumoniae* isolated from cockroaches and their antimicrobial resistance pattern. **Osong public health and research perspectives**, Cheongju, v. 6, n. 1, p. 3-8, 2015.

DRAWZ, S. M.; BONOMO, R. A. Three decades of β -lactamase inhibitors. **Clinical microbiology reviews**, Washington, v. 23, n. 1, p. 160-201, 2010.

EDOKPAYI, J. N. et al. Removal efficiency of faecal indicator organisms, nutrients and heavy metals from a peri-urban wastewater treatment plant in Thohoyandou, Limpopo Province, South Africa. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, Basel, v. 12, n. 7, p. 7300-7320, 2015.

ETEBU, E.; ARIKEKPAR, I. Antibiotics: Classification and mechanisms of action with emphasis on molecular perspectives. **International Journal of Applied Microbiology and Biotechnology Research**, London, v. 4, [s.n], p. 90-101, 2016.

FERNANDES, P.; MARTENS, E. Antibiotics in late clinical development. **Biochemical pharmacology**, Amsterdam, v. 133, [s.n], p. 152-163, 2017.

FIGUEIRA, V. et al. Comparison of ubiquitous antibiotic-resistant Enterobacteriaceae populations isolated from wastewaters, surface waters and drinking waters. **Journal of water and health**, London, v. 10, n. 1, p. 1-10, 2012.

FISHMAN, M. R. et al. Physiological and genetic characterization of calcium phosphate precipitation by *Pseudomonas* species. **Scientific Reports**, Switzerland, v. 8, n. 1, p. 10156, 2018.

GALICZEWSKI, J. M.; SHURPIN, K. M. An intervention to improve the catheter associated urinary tract infection rate in a medical intensive care unit: direct observation of catheter insertion procedure. **Intensive and Critical Care Nursing**, Amsterdam, v. 40, p. 26-34, 2017.

GAYNOR, M.; MANKIN, A. S. Macrolide antibiotics: binding site, mechanism of action, resistance. **Current topics in medicinal chemistry**, Potomac, v. 3, n. 9, p. 949-960, 2003.

GLÖCKNER, F. O. et al. 25 years of serving the community with ribosomal RNA gene reference databases and tools. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 261, [s.n.], p. 169-176, 2017.

GÓMEZ-CHAPARRO, M.; SANZ-CALCEDO, J. G.; ARMENTA-MÁRQUEZ, L. Study on the use and consumption of water in Spanish private hospitals as related to healthcare activity. **Urban Water Journal**, London, v. 15, n. 6, p. 601-608, 2018.

GUILBART, M. et al. Compliance with an empirical antimicrobial protocol improves the outcome of complicated intra-abdominal infections: a prospective observational study. **BJA: British Journal of Anaesthesia**, Oxford, v. 117, n. 1, p. 66-72, 2016.

HASSEN, B. et al. Genetic characterization of ESBL-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from wastewater and river water in Tunisia: predominance of CTX-M-15 and high genetic diversity. **Environmental Science and Pollution Research**, Switzerland, v. 27, n. 24, p. 1-10, ago. 2020.

HASSINGER, T. E. et al. Longer-duration antimicrobial therapy does not prevent treatment failure in high-risk patients with complicated intra-abdominal infections. **Surgical infections**, New York, v. 18, n. 6, p. 659-663, 2017.

JANG, J. et al. Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications—a review. **Journal of applied microbiology**, Hoboken, v. 123, n. 3, p. 570-581, 2017.

JIN, D. et al. Bacterial communities and potential waterborne pathogens within the typical urban surface waters. **Scientific reports**, London, v. 8, n. 1, p. 1-9, 2018.

JO, J.; KENNEDY, E. A.; KONG, H. H. Research techniques made simple: bacterial 16S ribosomal RNA gene sequencing in cutaneous research. **Journal of Investigative Dermatology**, Amsterdam, v. 136, n. 3, p. e23-e27, 2016.

JORGENSEN, J. H.; FERRARO, M. J. et al. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. **Clinical infectious diseases**, Oxford, v. 49, n. 11, p. 1749-1755, dez. 2009.

KADYKALO, S. et al. Antimicrobial resistance of *Salmonella* and generic *Escherichia coli* isolated from surface water samples used for recreation and a source of drinking water in southwestern Ontario, Canada. **Zoonoses and Public Health**, Hoboken, v. 67, n. 5, p. 566-575, ago. 2020.

KOUDOKPON, H. et al. First Sequence Analysis of Genes Mediating Extended-Spectrum Beta-Lactamase (ESBL) *bla*-TEM, -SHV and -CTX-M Production in Isolates of Enterobacteriaceae in Southern Benin. **International Journal of Infection**, Zahedan, v. 5, n. 4, p. 1-6, 2018.

LEITE, C. A. K. et al. β -lactamase-producing Gram-negative bacteria in an intensive care unit in southern Brazil. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, São Paulo, v. 53, n. 2, p. 1-7, 2017.

LEKUNBERRI, I.; BALCÁZAR, J. L.; BORREGO, C. M. Metagenomic exploration reveals a marked change in the river resistome and mobilome after treated wastewater discharges. **Environmental pollution**, Amsterdam, v. 234, [s.n], p. 538-542, 2018.

LOPATKIN, A. J. et al. Antibiotics as a selective driver for conjugation dynamics. **Nature microbiology**, London, v. 1, n. 6, p. 16044, 2016.

LORENZO, P. et al. Antibiotic resistance in urban and hospital wastewaters and their impact on a receiving freshwater ecosystem. **Chemosphere**, Amsterdam, v. 206, [s.n], p. 70-82, set. 2018.

MALDONADO, R. F.; SÁ-CORREIA, I.; VALVANO, M. A. Lipopolysaccharide modification in Gram-negative bacteria during chronic infection. **FEMS microbiology reviews**, Oxford, v. 40, n. 4, p. 480-493, 2016.

MAN, W. H. et al. Bacterial and viral respiratory tract microbiota and host characteristics in children with lower respiratory tract infections: a matched case-control study. **The Lancet Respiratory Medicine**, London, v. 7, n. 5, p. 417-426, 2019.

MANYI-LOH, C. et al. Antibiotic use in agriculture and its consequential resistance in environmental sources: potential public health implications. **Molecules**, Basel, v. 23, n. 4, p. 795, 2018.

MARSHALL, W. F.; BLAIR, J. E. The cephalosporins. **Mayo Clinic Proceedings**, Amsterdam, v. 74, n. 2, p. 187-195, fev. 1999.

MCLELLAN, L. K.; HUNSTAD, D. A. Urinary tract infection: pathogenesis and outlook. **Trends in molecular medicine**, Cambridge, v. 22, n. 11, p. 946-957, 2016.

MENESES, M. E. N. S.; DA COSTA, M. L.; COSTA, J. A. V. Os lagos do lavrado de Boa Vista-Roraima: fisiografia, físico-química das águas, mineralogia e química dos sedimentos. **Revista Brasileira de Geociências**, São Paulo, v. 37, n. 3, p. 478-489, 2007.

MILLER, E. L. The penicillins: a review and update. **Journal of midwifery & women's health**, New Jersey, v. 47, n. 6, p. 426-434, 2002.

MOTA, E. C. et al. Incidência da pneumonia associada à ventilação mecânica em unidade de terapia intensiva. **Medicina (Ribeirão Preto, Online)**, São Paulo, v. 50, n. 1, p. 39-46, 2017.

MOUBARECK, C. A.; HALAT, D. H. Insights into *Acinetobacter baumannii*: A Review of Microbiological, Virulence, and Resistance Traits in a Threatening Nosocomial Pathogen. **Antibiotics**, Basel, v. 9, n. 3, p. 119, 2020.

NEPAL, R. et al. Antibiotic Susceptibility Pattern of Gram-negative Isolates of Lower Respiratory Tract Infection. **Journal of Nepal Health Research Council**, Kathmandu, v. 16, n. 1, p. 22-26, 2018.

OLAITAN, A. O.; MORAND, S.; ROLAIN, J. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. **Frontiers in microbiology**, Lausanne, v. 5, [s.n.], p. 643, 2014.

OSMAN, A. E. M. A. E. et al. Detection of CTX-M, TEM and SHV Genes in Gram Negative Bacteria Isolated from Nosocomial Patients at Port Sudan Teaching Hospital. **European Journal of Clinical and Biomedical Sciences**, New York, v. 3, n. 6, p. 101-108, 2017.

OSTROUMOV, S. A. Water quality and conditioning in natural ecosystems: biomachinery theory of self-purification of water. **Russian Journal of general chemistry**, Switzerland, v. 87, n. 13, p. 3199-3204, 2017.

PAL, A. et al. Emerging contaminants of public health significance as water quality indicator compounds in the urban water cycle. **Environment International**, Amsterdam, v. 71, n. 1, p. 46-62, 2014.

PAPP-WALLACE, K. M. et al. Carbapenems: past, present, and future. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Washington, v. 55, n. 11, p. 4943-4960, 2011.

PATERSON, D. L. 313 – Infections due to other members of the Enterobacteriaceae, including management of multidrug-resistant strains. In: GOLDMAN, L.; SCHAFER, A. I. Ed. 24. **Goldman Cecil Medicine**. Amsterdam: Elsevier, 2012. Vol. 2, p. 1874-1877.

PEÑA-GUZMÁN C. A. et al. Emerging pollutants in the urban water cycle in Latin America: A review of the current literature. **Journal of environmental management**, Amsterdam, v. 237, n.1, p. 408-423, 2019.

PEÑA-GUZMÁN, C. A. et al. Urban water cycle simulation/management models: A review. **Water**, Amsterdam, v. 9, n. 4, p. 285, 2017.

PESCOD, M. B.; MARA, D. D. Design, operation and maintenance of wastewater stabilization ponds. In: PESCOD, M. B.; ARAR, A. **Treatment and use of sewage effluent for irrigation**. 1.ed. Elsevier: Amsterdam, 1985. p. 93-115.

PIER, G. B. 314 - *Pseudomonas* and Related Gram-negative bacillary infections. In: GOLDMAN, L.; SCHAFER, A. I. Ed. 24. **Goldman Cecil Medicine**. Amsterdam: Elsevier, 2012. Vol. 2, p. 1877-1881.

PRADINAUD, C. et al. Defining freshwater as a natural resource: a framework linking water use to the area of protection natural resources. **The International Journal of Life Cycle Assessment**, Switzerland, v. 24, n. 5, p. 960-974, 2019.

PRESCOTT, J. F. Sulfonamides, diaminopyrimidines, and their combinations. In: GIGUÈRE, S.; PRESCOTT, J. F.; DOWLING, P. M. 5 ed. **Antimicrobial therapy in veterinary medicine**. Hoboken: Wiley Blackwell, 2013. p. 279-294.

QI, M. et al. Pollution reduction and operating cost analysis of municipal wastewater treatment in China and implication for future wastewater management. **Journal of Cleaner Production**, Amsterdam, v. 253, n. 1, p. 120003, 2020.

RAFRAF, I. D. et al. Abundance of antibiotic resistance genes in five municipal wastewater treatment plants in the Monastir Governorate, Tunisia. **Environmental Pollution**, Amsterdam, v. 219, [s.n.], p. 353-358, 2016.

RAHMAN, S. U. et al. The growing genetic and functional diversity of extended spectrum beta-lactamases. **BioMed research international**, v. 2018, [s.n], p. 1-14, 2018.

RODRÍGUEZ, E. A. et al. Multidrug resistance and diversity of resistance profiles in carbapenem-resistant Gram-negative bacilli throughout a wastewater treatment plant in Colombia. **Journal of global antimicrobial resistance**, Amsterdam, v. 22, n. 1, p. 358-366, set. 2020.

SANCHEZ, D. G. et al. Detection of different β -lactamases encoding genes, including bla NDM, and plasmid-mediated quinolone resistance genes in different water sources from Brazil. **Environmental monitoring and assessment**, Switzerland, v. 190, n. 7, p. 407, 2018.

SHAIKH, S. et al. Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment. **Saudi journal of biological sciences**, Amsterdam, v. 22, n. 1, p. 90-101, 2015.

SHIKLOMANOV, I. A. **World water resources: a new appraisal and assessment for the 21st century**. 1.ed. Paris: UNESCO, 1998, 40 p.

SILHAVY, T. J. et al. The bacterial cell envelope. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, Huntington, v. 2, n. 5, p. a000414, 2010.

SILVA, A. C. M. M. et al. Caracterização de *Aeromonas* spp. isoladas de amostras de ostras e água por método microbiológico e molecular. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 15, n. 3, p. 362-368, jul./set. 2014.

SILVA, R. C. G.; SILVA, A. C. O.; OLVEIRA, S. R. Microbial resistance and frequency of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) in isolated from blood cultures. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 50, n. 6, p. 421-427, dez. 2014.

SYKES, R. B. et al. Monocyclic β -lactam antibiotics produced by bacteria. **Nature**, London, v. 291, n. 5815, p. 489, 1981.

TAVARES, W. **Antibióticos e Quimioterápicos para o Clínico**. 2.ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2009, 620 p.

TEKLEHAIMANOT, G. Z. et al. Prevalence of enteropathogenic bacteria in treated effluents and receiving water bodies and their potential health risks. **Science of The Total Environment**, Amsterdam, v. 518, [s.n], p. 441-449, 2015.

THEURETZBACHER, U. Global antimicrobial resistance in Gram-negative pathogens and clinical need. **Current Opinion in Microbiology**, Amsterdam, v. 39, [s.n], p. 106-112, 2017.

THOMAS, M. C. et al. SPYDER, a new method for *in silico* design and assessment of 16S rRNA gene primers for molecular microbial ecology. **FEMS Microbiology Letters**, Oxford, v. 320, n. 2, p. 152-159, abr. 2011.

TUCCI, C. E. M.; HESPANHOL, I.; NETTO, O. M. C. **Gestão da água no Brasil**. 1.ed. Brasília: UNESCO, 2001, 156 p.

VAN BELKUM, A. et al. Developmental roadmap for antimicrobial susceptibility testing systems. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 17, [s.n], p. 51-62, jan. 2019.

VAN DOORSLAER, X. et al. Fluoroquinolone antibiotics: an emerging class of environmental micropollutants. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 500, [s.n], p. 250-269, 2014.

VELASCO, M. F. Surface water Treatment for the attendance of Riverside Communities of the Brazilian Amazon. **International Journal of Advanced Engineering Research and Science**, Jaipur, v. 7, n. 3, p. 87-99, 2020.

WALIA, S. et al. Quantitation of antibiotic resistance genes pollution in hospital wastewater effluent and Urban Clinton River Water, Michigan, USA. **Current Medicine Research and Practice**, Amsterdam, v. 6, n. 4, p. 149-151, 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Water, sanitation, hygiene and health: a primer for health professionals**. Geneva: World Health Organization, 2019.

WORLD WATER ASSESSMENT PROGRAMME (UNITED NATIONS). **Water for People, Water for Life: The United Nations World Water Development Report: Executive Summary**. Geneva: Unesco, 2003.

WORLD WATER ASSESSMENT PROGRAMME (UNITED NATIONS). **Water in a changing world: The United Nations World Water Development Report 3: Facts and figures**. Geneva: Unesco, 2009.

YANG, B.; WANG, Y.; QIAN, P. Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis. **BMC Bioinformatics**, London, v. 17, n. 1, p. 135, 2016.

YELLE, S.; MASCARENHAS, J.; ARUNA, K. Detection of ESBL Producing Gram-Negative Bacteria in Public Drinking Water Sources from South Mumbai. **Journal of Environmental Science, Computer Science and Engineering & Technology**, New Delhi, v. 9, n. 2, p. 288-300, Maio 2020.

YIM, G. et al. Glycopeptide antibiotic biosynthesis. **The Journal of antibiotics**, London, v. 67, n. 1, p. 31-41, 2014.

YUAN, T. et al. Urbanization Impacts the Physicochemical Characteristics and Abundance of Fecal Markers and Bacterial Pathogens in Surface Water. **International journal of environmental research and public health**, Basel, v. 16, n. 10, p. 1739, 2019.

YUSTIANI, Y. M. et al. Influencing Parameter of Self Purification Process in the Urban Area of Cikapundung River, Indonesia. **International Journal of Geomate**, Mie, v. 14, n. 43, p. 50-54, 2018.

ZAGUI, G. S. et al. Gram-negative bacteria carrying β -lactamase encoding genes in hospital and urban wastewater in Brazil. **Environmental monitoring and assessment**, Switzerland, v. 192, n. 6, p. 1-11, 2020.

ZHANG, H.; ZHANG, J.; QIAO, L. The *Acinetobacter baumannii* group: a systemic review. **World journal of emergency medicine**, Hangzhou, v. 4, n. 3, p. 169, 2013.

ZHANG, Q. H. et al. Current status of urban wastewater treatment plants in China. **Environment international**, Amsterdam, v. 92, n. 1, p. 11-22, 2016.

ZHOU, T. et al. The Contribution of reservoirs to global land surface water storage variations. **American Meteorological Society**, Massachusetts, v. 17, n. 1, p. 309-325, 2016.

APÊNDICES

Figura 6 – Fluxograma da metodologia aplicada.

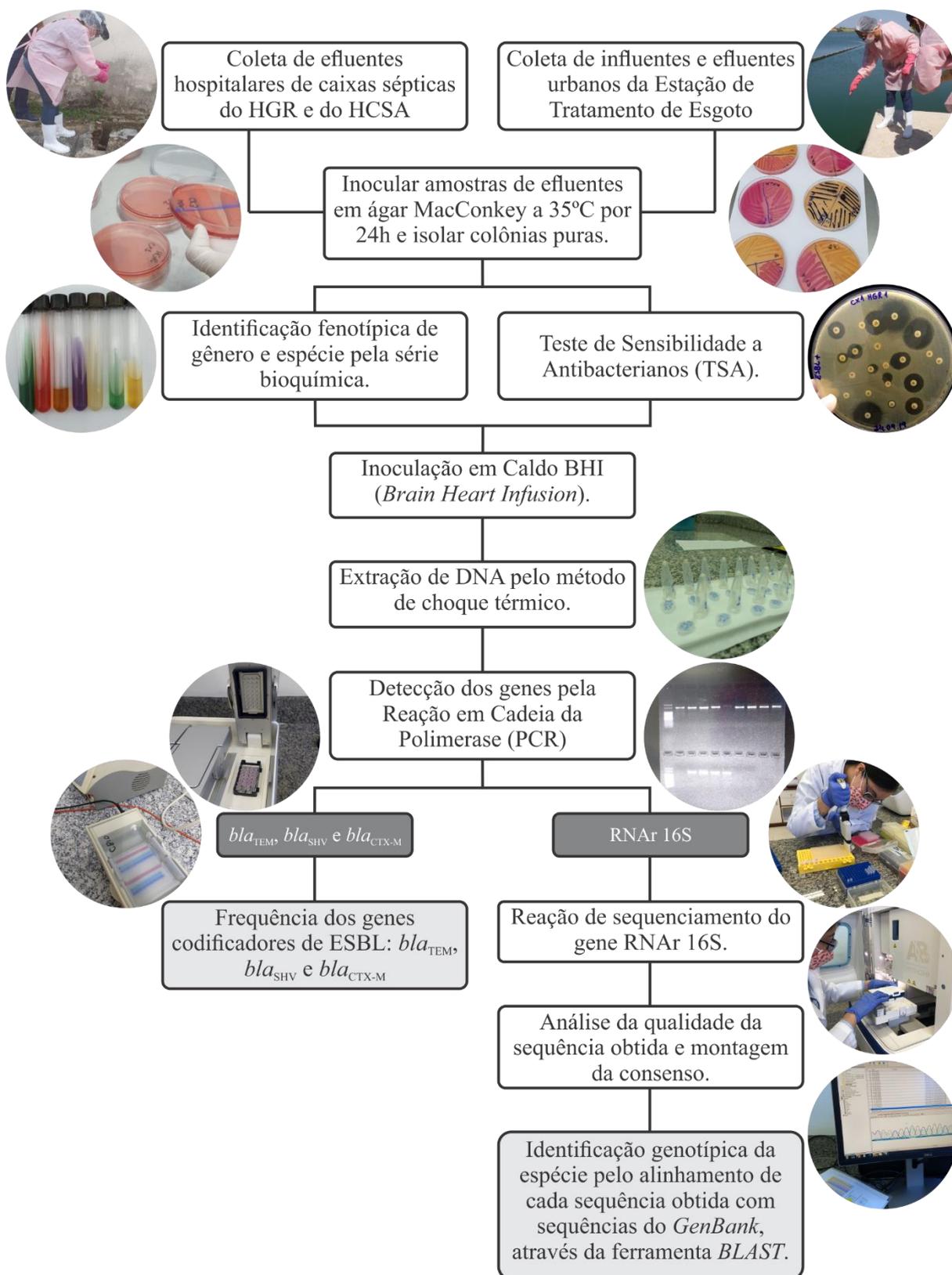


Figura 7 – Imagens dos processos da Estação de Tratamento de Esgoto de Boa Vista RR.

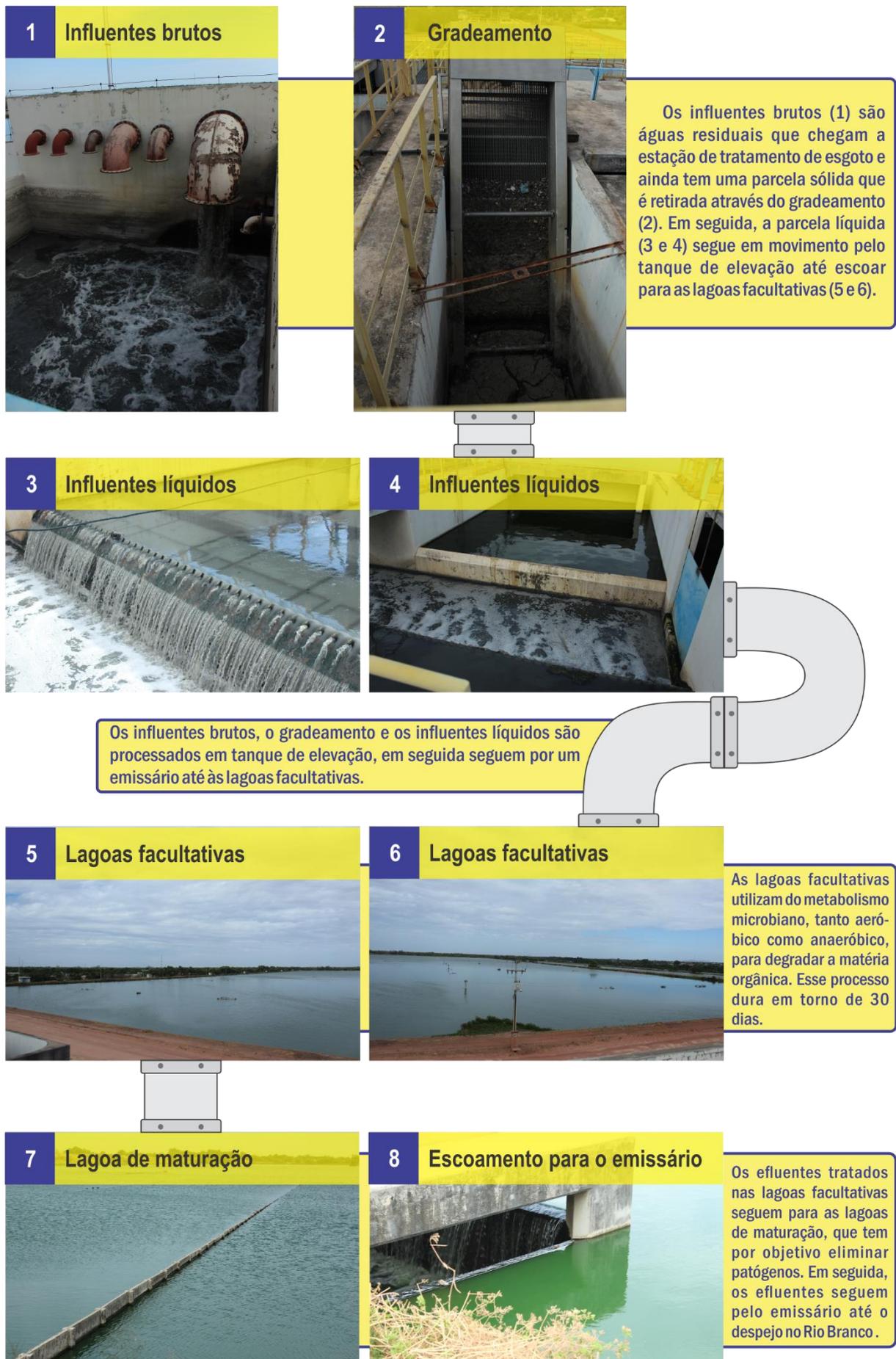


Figura 8 – Imagens das coletas de efluentes hospitalares e efluentes urbanos na ETE.

Coleta de efluentes hospitalares em dois hospitais públicos de Boa Vista RR



(1) Caixa séptica 1 do Hospital Geral de Roraima (HGR); (2) Caixa séptica 2 do HGR; (3) Caixa séptica 3, caixa de confluência do HGR; (4) Caixa biológica, caixa de confluência do Hospital da Criança Santo Antônio (HCSA).

Coleta de efluentes urbanos na estação de tratamento de esgoto de Boa Vista RR



Figura 9 – Processo de isolamento das cepas obtidas a partir dos efluentes coletados.

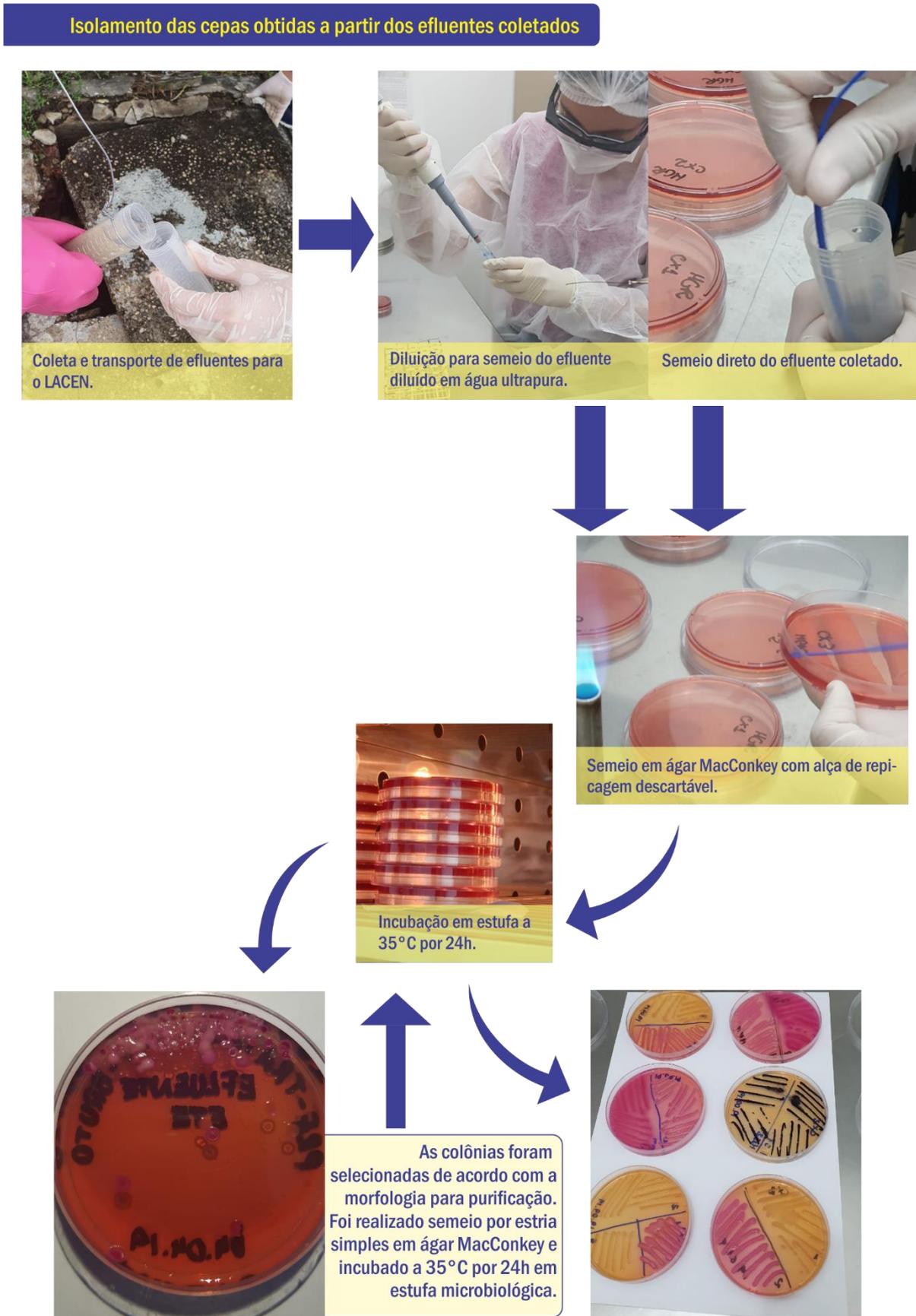


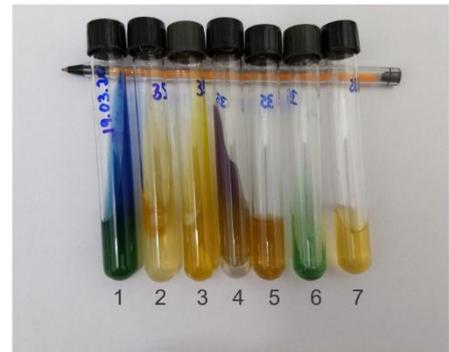
Figura 10 – Processo de análise fenotípica da identificação das espécies e teste de sensibilidade a antibacterianos.

Identificação fenotípica pela série bioquímica



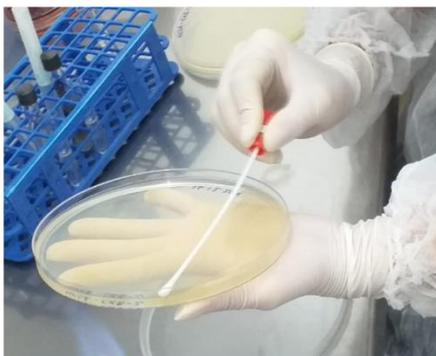
1 = Citrato de Simmons; 2 = Fenilalanina; 3 = LIA (Lisyne Iron Agar); 4 = TSI (Triple Sugar Agar); 5 = SIM (Sulfate Indole Motility); 6 = Caldo Malonato; 7 = Caldo Ureia.

Inoculação em cada meio a 35°C em estufa microbiológica por 24h.



1 = Citrato de Simmons; 2 = Fenilalanina; 3 = TSI (Triple Sugar Agar); 4 = LIA (Lisyne Iron Agar); 5 = SIM (Sulfate Indole Motility); 6 = Caldo Malonato; 7 = Caldo Ureia.

Teste de Sensibilidade a Antibacterianos pela técnica de Disco Difusão



Após diluição da colônia em solução salina a 0,5 na escala MacFarland, semeio feito com swab.



Em seguida, são distribuídos os discos de papel impregnados com o antibacteriano. No centro, a cruz de identificação de produção de ESBL.

Em seguida, as placas são incubadas em estufa a 35°C por 24h. Por fim, os resultados abaixo são observados e interpretados segundo as recomendações do CLSI.



Tabela 1 – Resultados do alinhamento das sequências do gene RNAr 16S na ferramenta *BLAST* para identificação genotípica das cepas.

Identificação da amostra	Tamanho da sequência consenso	Espécie identificada	ID %	Número de acesso - GenBank
CX1 HGR 1	597 pb	<i>Leclercia adecarboxylata</i>	100%	CP040889.1
CX1 HGR 2	417 pb	<i>Aeromonas enteropelogenes</i>	99%	MT361609.1
CX1 HGR 4	549 pb	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	98%	CP054303.1
CX2 HGR 1	536 pb	<i>Aeromonas caviae</i>	99%	MT435028.1
CX2 HGR 2	550 pb	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	99%	CP054063.1
CX2 HGR 3	550 pb	<i>Phytobacter diazotrophicus</i>	100%	CP051548.1
CX2 HGR 4	553 pb	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	98%	CP024570.1
CX2 HGR H2S1	620 pb	<i>Chromobacterium violaceum</i>	100%	CP050992.1
CX3 HGR 1	567 pb	<i>Escherichia coli</i>	98%	AP022482.1
CX3 HGR 2	620 pb	<i>Aeromonas caviae</i>	99%	CP039832.1
CX3 HGR 3	687 pb	<i>Shigella sonnei</i>	99%	CP061367.1
CX3 HGR 4	207 pb	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	98%	CP039974.1
HCSA CB-1	388 pb	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	98%	MT633047.1
HCSA CB-2	252 pb	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	98%	AB922602.1
ETE Pré-B1	466 pb	<i>Citrobacter freundii</i>	99%	CP055247.1
ETE Pré-B2	423 pb	<i>Aeromonas enteropelogenes</i>	98%	MT422217.1
ETE Pré-B3	479 pb	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	98%	MT604895.1
ETE Pré-D1	606 pb	<i>Escherichia coli</i>	100%	LR739002.1
ETE Pré-D2	553 pb	<i>Aeromonas caviae</i>	99%	MT435028.1
ETE Pré-D3	565 pb	<i>Enterobacter cloacae</i>	99%	MT613361.1
ETE Pré-D4	487 pb	<i>Aeromonas caviae</i>	98%	MT384382.1
ETE Pós-D	567 pb	<i>Enterobacter cloacae</i>	99%	MT557018.1
ETE PRÉ 1C1	327 pb	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	99%	MT604895.1
ETE PRÉ 1C2	346 pb	<i>Aeromonas hydrophila</i>	99%	MT605959.1
ETE PRÉ 1C3	350 pb	<i>Klebsiella oxytoca</i>	98%	MT568561.1
ETE PRÉ 1CD	252 pb	<i>Aeromonas caviae</i>	100%	MN733089.1
ETE PRÉ 2C2	321 pb	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	99%	MT604895.1
ETE PÓS 1C	258 pb	<i>Enterobacter cloacae</i>	99%	MT557018.1
ETE PÓS 1CD1	519 pb	<i>Enterobacter asburiae</i>	98%	MT613364.1
ETE PÓS 1CD2	534 pb	<i>Enterobacter ludwigii</i>	98%	MT613360.1
ETE PÓS 30CD	216 pb	<i>Serratia marcescens</i>	99%	CP055161.1
ETE PÓS 30C1	262 pb	<i>Enterobacter cloacae</i>	99%	MT613380.1
ETE PÓS 30C2	276 pb	<i>Enterobacter cloacae</i>	99%	MT613381.1
ETE PÓS 50C1	237 pb	<i>Enterobacter asburiae</i>	99%	MT613375.1

ANEXOS

Anexo 1 – Primeiro quadro da ANVISA (2013) de determinação do Padrão Bioquímico para identificação das principais Enterobacteriaceae de importância clínica.

Bactéria/Provas	Indol	Citrato	H ₂ S	Ureia	Fenilala	Lisina	Arginina	Ornitina	Motil.
<i>Citrobacter freundii</i>	33	78	78	44	0	0	67	0	89
<i>Citrobacter diversus (koseri)</i>	99	99	0	75	0	0	80	99	95
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	100	95	5	85	0	0	85	95	95
<i>Edwardsiella tarda</i>	99	1	100	0	0	100	0	100	98
<i>Enterobacter aerogenes</i>	0	95	0	2	0	98	0	98	97
<i>Enterobacter cloacae</i>	0	100	0	65	0	0	97	96	95
<i>Enterobacter gergoviae</i>	0	99	0	93	0	90	0	100	90
<i>Enterobacter sakazakii</i>	11	99	0	1	50	0	99	91	96
<i>Escherichia coli</i>	98	1	1	1	0	90	17	65	95
<i>Escherichia coli inativa</i>	80	1	1	1	0	40	3	20	5
<i>Shigella dysenteriae</i>	45	0	0	0	0	0	2	0	0
<i>Shigella flexneri</i>	50	0	0	0	0	0	5	0	0
<i>Shigella boydii</i>	25	0	0	0	0	0	10	2	0
<i>Shigella sonnei</i>	0	0	0	0	0	0	2	98	0
<i>Hafnia alvei</i>	0	10	0	4	0	100	6	98	85
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0	98	0	95	0	98	0	0	0
<i>Klebsiella oxytoca</i>	99	95	0	90	1	99	0	0	0
<i>Klebsiella ozaenae</i>	0	30	0	10	0	40	6	0	0
<i>Klebsiella rhinoscleromatis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Morganella morganii grupo</i>	95	0	20	95	95	V	0	95	V
<i>Pantoea agglomerans</i>	20	50	0	20	20	0	0	0	85
<i>Proteus mirabilis</i>	2	65	98	98	98	0	0	99	95
<i>Proteus vulgaris</i>	98	15	95	95	99	0	0	0	95
<i>Proteus penneri</i>	0	0	30	100	99	0	0	0	85
<i>Providencia rettgeri</i>	99	95	0	90	98	0	0	0	94
<i>Providencia stuartii</i>	98	93	0	30	95	0	0	0	85
<i>Providencia alcalifaciens</i>	99	90	0	0	90	0	0	0	96
<i>Salmonella spp.</i>	1	95	95	1	0	98	70	97	95
<i>Salmonell typhi</i>	0	0	97	0	0	98	3	0	97
<i>Salmonella cholerasuis</i>	0	25	50	0	0	95	55	100	95
<i>Salmonella paratyphi A</i>	0	0	10	0	0	0	15	95	95
<i>Salmonella gallinarum</i>	0	0	100	0	0	90	10	95	0
<i>Salmonella pullorum</i>	0	0	90	0	0	100	10	95	0
<i>Salmonella outas</i>	1	90	100	0	0	99	70	99	99
<i>Serratia marcescens</i>	1	98	0	15	0	99	0	99	97
<i>Serratia marcescens bio 1</i>	0	30	0	0	0	55	4	65	14
<i>Serratia liquefaciens</i>	1	90	0	3	0	95	0	95	95
<i>Serratia rubidae</i>	0	95	0	2	0	55	0	0	85
<i>Yersinia enterocolitica</i>	50	0	0	75	0	0	0	95	2

Anexo 2 – Segundo quadro da ANVISA (2013) de determinação do Padrão Bioquímico para identificação das principais Enterobacteriaceae de importância clínica.

Bactéria/Provas	gelatina	Malonato	Gás glicose	lactose	sacarose	esculina	DNase
<i>Citrobacter freundii</i>	0	11	89	78	89	0	0
<i>Citrobacter diversus (koseri)</i>	0	95	98	50	40	1	0
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	0	1	97	35	9	5	0
<i>Edwardsiella tarda</i>	0	0	100	0	0	0	0
<i>Enterobacter aerogenes</i>	0	95	100	95	100	98	0
<i>Enterobacter cloacae</i>	0	75	100	93	97	30	0
<i>Enterobacter gergoviae</i>	0	96	98	55	98	97	0
<i>Enterobacter sakazakii</i>	0	18	98	99	100	100	0
<i>Escherichia coli</i>	0	0	95	95	50	35	0
<i>Escherichia coli inativa</i>	0	0	5	25	15	5	0
<i>Shigella dysenteriae</i>	0	0	0	0	0	0	0
<i>Shigella flexneri</i>	0	0	3	1	1	0	0
<i>Shigella boydii</i>	0	0	0	1	0	0	0
<i>Shigella sonnei</i>	0	0	0	2	1	0	0
<i>Hafnia alvei</i>	0	50	98	5	10	7	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0	93	97	98	99	99	0
<i>Klebsiella oxytoca</i>	0	95	97	100	100	100	0
<i>Klebsiella ozaenae</i>	0	3	50	30	20	80	0
<i>Klebsiella rhinoscleromatis</i>	0	95	0	0	75	60	0
<i>Morganella morganii grupo</i>	0	1	99	1	0	0	0
<i>Pantoea agglomerans</i>	2	65	20	40	75	60	0
<i>Proteus mirabilis</i>	90	2	90	2	15	0	50
<i>Proteus vulgaris</i>	91	0	85	2	97	50	80
<i>Proteus penneri</i>	50	0	45	1	100	0	40
<i>Providencia rettgeri</i>	0	0	10	5	15	35	0
<i>Providencia stuartii</i>	0	0	0	2	50	0	10
<i>Providencia alcalifaciens</i>	0	0	85	0	15	0	0
<i>Salmonella spp.</i>	0	0	90	1	1	5	2
<i>Salmonell typhi</i>	0	0	0	1	0	0	0
<i>Salmonella choleraesuis</i>	0	0	95	0	0	0	0
<i>Salmonella paratyphi A</i>	0	0	99	0	0	0	0
<i>Salmonella gallinarum</i>	0	0	0	0	0	0	10
<i>Salmonella pullorum</i>	0	0	90	0	0	0	0
<i>Salmonella outras</i>	1	V	100	V	1	0 ou 15	1
<i>Serratia marcescens</i>	90	3	55	2	99	95	98
<i>Serratia marcescens bio 1</i>	30	0	0	4	100	90	82
<i>Serratia liquefaciens</i>	90	2	75	10	98	97	85
<i>Serratia rubidae</i>	90	94	30	100	99	94	99
<i>Yersinia enterocolitica</i>	0	6	5	5	95	25	5

Fonte: ANVISA (2013).

Legenda: V = variável