UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENFERMAGEM DE RIBEIRÃO PRETO

GUILHERME SGOBBI ZAGUI

Avaliação da multirresistência a antibióticos e produção de ESBL e carbapenemases em bacilos gram-negativos de efluente hospitalar e urbano

Ribeirão Preto
2019

GUILHERME SGOBBI ZAGUI

Avaliação da multirresistência a antibióticos e produção de ESBL e carbapenemases em bacilos gram-negativos de efluente hospitalar e urbano

Dissertação apresentada à Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências, Programa de Pós-Graduação Enfermagem em Saúde Pública.

Linha de Pesquisa: Saúde Ambiental

Orientador: Susana Inés Segura-Muñoz

Ribeirão Preto
2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Zagui, Guilherme Sgobbi
Avaliação da multirresistência a antibióticos e produção de ESBL e carbapenemases em bacilos gram-negativos de efluente hospitalar e urbano. Ribeirão Preto, 2019.
89 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Enfermagem Saúde Pública.
Orientador: Susana Inés Segura-Muñoz

1. Multirresistência bacteriana. 2. Bacilos gram-negativos. 3. ESBL. 4. Carbapenemases. 5. Esgoto.

ZAGUI, Guilherme Sgobbi

Avaliação da multirresistência a antibióticos e produção de ESBL e carbapenemases em bacilos gram-negativos de efluente hospitalar e urbano

Dissertação apresentada à Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências, Programa de Pós-Graduação Enfermagem em Saúde Pública.

Aprovado em / /

Comissão Julgadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Dedicatória

*Aos meus pais, **Elaine e Valdir**, pela confiança depositada em mim e por todo o incentivo pela busca do conhecimento e crescimento. Muito obrigado!*

Dedico a vocês este trabalho!

Agradecimentos especiais

À minha querida orientadora, ***Prof.ª Dr.ª Susana Inés Segura-Muñoz****, que durante todo o período incentivou e confiou em mim. Agradeço pela excelente orientação durante o curso de Mestrado e por conceder-me um dos bens mais precioso que existe, o conhecimento! Agradeço não somente por ser orientadora, mas também pelos dias de cumplicidade e amizade que me ofereceu. Obrigado por tudo!*

À minha querida amiga, ***Prof.ª Dr.ª Karina Aparecida de Abreu Tonani****, que desde minha graduação depositou toda confiança e abriu as portas do meio científico. Agradeço não somente por ser minha professora e me ensinar muito, mas também por ser minha amiga. Obrigado por tudo!*

Agradecimentos

*Aos meus pais, **Elaine** e **Valdir**, e à minha irmã, **Natália**, por todo o incentivo, carinho e amor incondicional, fazendo-me buscar todos os dias conhecimento e crescimento pessoal e acadêmico. Vocês são os pilares que me sustentam, fundamentais para minha existência. Muito obrigado!*

*Aos meus amigos do Laboratório de Ecotoxicologia e Parasitologia Ambiental, **Brisa, Thaís, Carol, Gabriel, Meire**, e **Renato**, pelas inúmeras conversas, apoio e companheirismo. Muito obrigado!*

*Em especial, gostaria de agradecer à **Brisa** por todos cafés, gargalhadas e croissants de chocolate. Sua amizade e seu companheirismo são sem iguais. Agradeço por estar comigo em diversos momentos da minha vida, seja pessoal ou profissional. Muito obrigado por tudo que representa!*

*Agradecimento especial ao **Prof. Dr. Leonardo Neves de Andrade** e à **Prof.ª Dr.ª Ana Lúcia Costa Darini**, pela confiança e apoio nas análises moleculares, que contribuíram substancialmente para a realização desse trabalho!*

*Às amigas do LEBEM, **Anelise**, **Renata** e **Joseane**, pelas conversas, apoio, pelos almoços e risadas! Em especial, agradeço à **Natália** por toda instrução durantes as análises, todo carisma, atenção e companheirismo, muito obrigado!*

*Ao **Guilherme Luís** e meus **verdadeiros amigos**, os quais não preciso citar nomes, que sempre me apoiaram nas decisões, pelo companheirismo, desabafos, conselhos e risadas. Vocês tornam a vida mais fácil e bela.*

*Ao **Paulo**, funcionário do hospital onde foi realizado o estudo, por todo o auxílio durante as coletas de amostras de esgoto. Muito obrigado!*

*À empresa Ambient Serviços Ambientais S.A., em especial a **Karina Carregari**, por ceder as amostras de esgoto, proporcionando a realização deste estudo. Muito obrigado!*

*À **Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto**, pela oportunidade!*

*À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo** (FAPESP), pela concessão da bolsa de Mestrado e apoio financeiro (Processo: 2017/10723-0). Muito obrigado!*

*A **todos** que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho. Muito obrigado!*

Meus sinceros agradecimentos!

RESUMO

ZAGUI, Guilherme Sgobbi. **Avaliação da multirresistência a antibióticos e produção de ESBL e carbapenemases em bacilos gram-negativos de efluente hospitalar e urbano.** 2019. 89f. Dissertação (Mestrado em Enfermagem em Saúde Pública) – Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

A multirresistência aos antibióticos observada em bacilos gram-negativos é um grave problema de saúde pública devido a alta morbidade e mortalidade apresentada, especialmente em instituições assistenciais de saúde. Como consequência do intenso uso de antibióticos, a multirresistência a esses fármacos é principalmente mediada por enzimas hidrolisantes, onde destaca-se as enzimas β-lactamases, principal mecanismo de resistência aos β-lactâmicos verificado em bacilos gram-negativos. Os esgotos de origem hospitalar e de estações de tratamento de esgoto (ETE) são considerados como reservatórios de bactérias multirresistentes pela presença de antibióticos que as selecionam e por favorecem a transmissão de determinantes de resistência. Nesse sentido, o presente estudo objetivou avaliar a multirresistência a antibióticos e a produção de enzimas β-lactamases em bacilos gram-negativos isolados de efluente hospitalar e da estação de tratamento de esgoto, na cidade de Ribeirão Preto, SP. No hospital terciário, amostras de esgotos foram coletadas dos ambulatórios, das enfermarias e da junção do esgoto hospitalar. Na ETE, amostras foram coletadas na caixa de entrada do esgoto bruto e após ao tratamento. Dez microlitros foram semeados em ágar MacConkey, *Salmonella-Shigella*, Cetrimide e TCBS e a identificação dos bacilos gram-negativos foi realizada pelo kit Bactray®. O teste de susceptibilidade aos antibióticos foi realizado pelo método de disco-difusão em ágar. A detecção fenotípica de bacilos produtores de ESBL foi realizada pelos testes de sinergia de disco-duplo e disco combinado com ácido clavulânico, e para detecção de isolados produtores de carbapenemases foi utilizado os testes de disco combinado com ácido fenilborônico e EDTA e o teste Blue Carba. A PCR foi utilizada para amplificação dos genes codificadores de ESBL e carbapenemases. No total, 45 bacilos gram-negativos foram isolados, sendo as espécies *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* as de maiores prevalências. Ampla resistência foi verificada aos antibióticos β-lactâmicos, sendo a resistência ao aztreonam, a cefepime e a cefotaxima mais expressiva nos isolados do esgoto hospitalar, com diferenças estatisticamente significante ($p<0,05$). O fenótipo multidroga resistente foi atribuído a 33,3%, nos isolados exclusivamente do esgoto hospitalar, com diferença estatisticamente significante ($p = 0,0025$) em relação aos isolados do esgoto da ETE. Genes de β-lactamases foram encontrados em 35,6% das bactérias, sendo o bla_{KPC} e bla_{TEM} os de maiores ocorrências, ambos em 17,8% dos isolados, e os genes bla_{SHV} e $bla_{CTX\text{-}M}$ em 13,3% e 8,9%. Somente em um isolado de *Enterobacter cloacae* no esgoto tratado da ETE foi identificado o gene bla_{SHV}, os demais isolados portadores dos genes de β-lactamases foram encontrados no esgoto hospitalar. Os dados obtidos neste estudo são importantes levando em consideração que no Brasil o esgoto hospitalar pode ser lançado *in natura* na rede coletora municipal, no entanto, acredita-se que tal permissão favorece a disseminação da multirresistência bacteriana, posto que, os resultados demonstram alta frequência de bactérias portadoras de genes de resistência a antibióticos no esgoto hospitalar estudado. Assim, a implementação do tratamento de efluentes hospitalares, especialmente os de hospitais terciários, e adicionalmente ao tratamento da ETE evitaria a propagação dessas bactérias no ambiente e de impactar negativamente os recursos hídricos.

Palavras chave: 1. Multirresistência bacteriana. 2. Bacilos gram-negativos. 3. ESBL. 4. Carbapenemases. 5. Esgoto.

ABSTRACT

ZAGUI, Guilherme Sgobbi. **Evaluation of antibiotic multi-resistance and production of ESBL and carbapenemases in gram-negative bacilli of hospital and urban effluent.** 2019. 89f. Master's Thesis – Ribeirão Preto College of Nursing, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Antibiotic multi-resistance observed in Gram-negative bacilli is a serious public health problem due to high morbidity and mortality, especially in health care institutions. As a consequence of the intense use of antibiotics, multi-resistance to these drugs is mainly mediated by hydrolyzing enzymes, in which β-lactamases, the main β-lactam resistance mechanism observed in Gram-negative bacilli, are prominent. Hospital sewage and wastewater treatment plants (WWTP) are considered reservoirs of multiresistant bacteria by the presence of antibiotics that select these bacteria and favor the transmission of resistance determinants. In this sense, the present study aimed to evaluate the antibiotics multi-resistance and the production of β-lactamase enzymes in Gram-negative bacilli isolated from hospital effluent and the wastewater treatment plants in Ribeirão Preto city, SP. In the tertiary hospital, sewage samples from the outpatient clinics, rooms patients and the hospital sewage junction were collected. In the WWTP, raw and treated sewage were collected. Ten microliters were seeded on MacConkey, *Salmonella-Shigella*, Cetrimide and TCBS agar and the identification of Gram-negative bacilli was performed by the Bactray® kit. Antibiotic susceptibility test was performed by agar-diffusion method. Phenotypic detection of ESBL-producing bacilli was performed by double-disc and disc-synergy tests combined with clavulanic acid, and for the detection of carbapenemase-producing isolates the combined disk tests with phenylboronic acid and EDTA and Blue Carba test were used. PCR amplification of ESBL and carbapenemases-encoding genes was used. In total, 45 Gram-negative bacilli were isolated, and *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa* being the most prevalent. Extensive resistance was verified to β-lactam antibiotics and resistance to aztreonam, cefepime and cefotaxime was more pronounced in hospital sewage isolates, with statistically significant differences ($p<0.05$). Multidrug-resistant phenotype was attributed to 33.3% in isolates exclusively from hospital sewage, with a statistically significant difference ($p = 0.0025$) in relation to the sewage isolates from the WWTP. β-lactamase genes were found in 35.6% of the bacteria, with bla_{KPC} and bla_{TEM} having the highest occurrences, both in 17.8% of the isolates, and the bla_{SHV} and $bla_{CTX\text{-}M}$ genes in 13.3% and 8, 9%. Only in an isolate of *Enterobacter cloacae* in the treated sewage from WWTP was the bla_{SHV} gene identified, the other isolates carrying the β-lactamases genes were found in hospital sewage. The data obtained in this study are important considering that in Brazil the hospital sewage can be released *in nature* in municipal collection network, however, it is believed that such permission favors the dissemination of bacterial multi-resistance, since, the results show high frequency of bacteria carrying antibiotic resistance genes in the hospital sewer studied. Thus, the implementation of treatment of hospital effluents, especially those in tertiary hospitals, and in addition to the treatment of WWTP would prevent the spread of these bacteria in the environment and negatively impact water resources.

Keywords: 1. Multiresistant bacteria. 2. Gram-negative bacilli. 3. ESBL. 4. Carbapenemases. 5. Sewer.

RESUMEN

ZAGUI, Guilherme Sgobbi. **Evaluación de la multirresistencia a antibióticos y producción de ESBL y carbapenemasas en bacilos gram-negativos de alcantarillado hospitalario y urbano.** 2019. 89f. Tesis (Maestria) – Escuela de Enfermería de Ribeirão Preto, Universidad de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Multirresistencia a los antibióticos observada en bacilos gran-negativos es un grave problema de salud pública debido a la alta morbilidad y mortalidad presentada, especialmente en instituciones asistenciales de salud. Como consecuencia del intenso uso de antibióticos, multirresistencia a estos fármacos es principalmente mediada por enzimas hidrolizantes, donde se destacan las enzimas β-lactamasas, principal mecanismo de resistencia a los β-lactámicos verificado en bacilos gram-negativos. Las alcantarillas de origen hospitalario y de las estaciones de tratamiento de aguas residuales (ETAR), se consideran depósitos de bacterias multirresistentes por la presencia de antibióticos que seleccionan estas bacterias y favorecen la transmisión de determinantes de resistencia. En este sentido, el presente estudio objetivó evaluar la multirresistencia a antibióticos y producción de enzimas β-lactamasas (ESBL y carbapenemasas) en bacilos gram-negativos aislados de efluente hospitalario y de la estación de tratamiento de aguas residuales, en la ciudad de Ribeirão Preto, SP. En el hospital terciario, muestras de alcantarillas fueron recolectadas de los ambulatorios, de las enfermerías y de la unión del desagüe hospitalario. En la ETAR, muestras fueron recogidas en la caja de entrada del desagüe bruto y después del tratamiento. Diez microlitros fueron sembrados en agar MacConkey, *Salmonella-Shigella*, Cetrimide y TCBS y la identificación de los bacilos gram-negativos fue realizada por el kit Bactray®. La prueba de susceptibilidad a los antibióticos fue realizada por el método de disco-difusión en agar. La detección fenotípica de bacilos productores de ESBL fue realizada por las pruebas de sinergia de disco doble y disco combinado con ácido clavulánico y para la detección de aislados productores de carbapenemasas se utilizaron las pruebas de disco combinado ácido fenilborónico y EDTA y prueba Blue Carba. La PCR fue utilizada para la amplificación de los genes codificadores de ESBL y carbapenemasas. En total, 45 bacilos gram-negativos fueron aislados, siendo las especies *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa* las de mayores prevalencias. Se observó una gran resistencia a los antibióticos β-lactámicos, siendo la resistencia al aztreonam, la cefepime y la cefotaxima más expresiva en los aislados del alcantarillado hospitalario, con diferencias estadísticamente significativas ($p<0,05$). El fenotipo multidroga resistente fue atribuido al 33,3% en los aislados exclusivamente del desagüe hospitalario, con diferencia estadísticamente significativa ($p = 0,0025$) en relación a los aislados del alcantarillado de la ETAR. Los genes de β-lactamasas fueron encontrados en el 35,6% de las bacterias, siendo el bla_{KPC} y bla_{TEM} los de mayores ocurrencias, ambos en el 17,8% de los aislados, y los genes bla_{SHV} y bla_{CTX-M} en el 13,3% y 8, 9%. Sólo en un aislado de *Enterobacter cloacae* en el alcantarillado tratado de la ETAR fue identificado el gen bla_{SHV}, los demás aislados portadores de los genes de β-lactamasas fueron encontrados en el alcantarillado hospitalario. Los datos obtenidos en este estudio son importantes teniendo en cuenta que en Brasil el desagüe hospitalario puede ser lanzado in natura en la red colectora municipal, sin embargo, se cree que tal permiso favorece la diseminación de la multirresistencia bacteriana, puesto que, los resultados demuestran alta frecuencia de bacterias portadoras de genes de resistencia a antibióticos en el alcantarillado hospitalario estudiado. Así, la implementación del tratamiento de alcantarillado hospitalarios, especialmente los de hospitales terciarios, y adicionalmente al tratamiento de la ETAR evitaría la propagación de esas bacterias en el ambiente y de impactar negativamente los recursos hídricos.

Palabras clave: 1. Multirresistencia bacteriana. 2. Bacilos gram-negativos. 3. ESBL. 4. Carbapenemasas. 5. Alcantarillado.

LISTA DE FIGURA

Figura 1. Classificação dos antibióticos de acordo com seu alvo de ação em bactérias e seus respectivos exemplares..... 22

Figura 2. Ordem cronológica da descoberta dos principais antibióticos e do primeiro relato de resistência bacteriana..... 26

Figura 3. Esquema classificatório das enzimas β-lactamases de acordo com as classificações funcionais e moleculares, com os respectivos substratos, inibidores e representantes enzimáticos..... 29

Figura 4. Mecanismos de aquisição de genes de resistência por bactérias em esgoto. 35

Figura 5. Isolamento de bactérias de esgoto hospitalar e comunitário..... 42

Figura 6. Kit Bactray® I, II e III (Laborclin) para identificação bioquímica de bacilos gram-negativos..... 44

Figura 7. Sistema de identificação de bacilos gram-negativos pelo kit Bactray® (Laborclin): A) Bactray I. B) Bactray II..... 44

Figura 8. Teste de sensibilidade aos antibióticos pelo Método de Disco-Difusão em ágar Mueller-Hinton..... 46

Figura 9. Teste fenotípico positivo para detecção de β-lactamases do grupo ESBL pelo Teste de Sinergia de Disco Duplo..... 47

Figura 10. Teste fenotípico positivo para detecção de β-lactamases do grupo ESBL pelo Teste de Disco Combinado..... 48

Figura 11. Teste Blue Carba para a confirmação fenotípica de enzimas Carbapenemases..... 49

Figura 12. Eletroforese em gel de agarose para separação dos fragmentos amplificados de β-lactamases por PCR..... 51

Figura 13. Frequência de bacilos gram-negativos (n=45) isoladas de esgoto hospitalar e urbano em Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil..... 54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Princípios físico-químicos dos testes bioquímicos utilizados para a identificação bacteriana pelos sistemas Bactray® I, II e III..... 43

Tabela 2. Antibióticos utilizados no Teste de Sensibilidade aos Antibióticos em bacilos gram-negativos, com as respectivas concentrações..... 46

Tabela 3. Reagente utilizados na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para a análise de genes de resistência aos antibióticos..... 50

Tabela 4. Genes amplificados na PCR, *primers* utilizados, sequência de nucleotídeos e temperatura de annealing..... 52

Tabela 5. Perfil de resistência aos antibióticos e detecção de genes de resistência a antibióticos de bactérias isoladas de esgoto hospitalar e urbano em Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil..... 55

Tabela 6. Correlação entre os halos de inibição frente aos antibióticos testados..... 56

Tabela 7. Distribuição da resistência aos antibióticos de bacilos gram-negativos isoladas por ponto de amostragem..... 57

Tabela 8. Porcentagem do fenótipo multidroga resistentes (MDR) de bactérias isoladas em esgoto hospitalar e urbano em Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil..... 58

SUMÁRIO

1. **INTRODUÇÃO** 15
2. **OBJETIVOS** 18
3. **REVISÃO DE LITERATURA** 20
3.1. **Antibióticos** 21
3.1.1. Penicilinas 23
3.1.2. Cefalosporinas 23
3.1.3. Carbapenêmicos 24
3.1.4. Monobactâmicos 24
3.3. **Resistência Bacteriana aos Antibióticos** 25
3.3.1. β-Lactamases 27
3.3.1.1. Grupo Funcional 1 29
3.3.1.2. Grupo Funcional 2 30
3.1.1.3. Grupo Funcional 3 33
3.5. **Bactérias Multirresistentes em Matrizes Ambientais: Esgoto Hospitalar e Urbano** 34
3.5.1. Cenário Brasileiro 37
4. **MATERIAIS E MÉTODOS** 40
4.1. **Local de Estudo e Amostragem** 41
4.2. **Isolamento e Identificação Bacteriana** 42
4.3. **Teste de Sensibilidade aos Antibióticos** 45
4.4. **Detecção Fenotípica de Bactérias Produtoras de β-lactamases** 47
4.4.1. Detecção Fenotípica de Bactérias Produtoras de ESBL 47
4.4.2. Detecção Fenotípica de Bactérias Produtoras de Carbapenemases 48
4.5. **Detecção Molecular de Genes de ESBL e Carbapenemases** 50
4.6. **Análise de Dados** 51
5. **RESULTADOS** 53
6. **DISCUSSÃO** 60
7. **CONCLUSÕES** 71
REFERÊNCIAS 74

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, especialistas estimam que mais de 2 milhões de pessoas são infectadas por bactérias resistentes aos antibióticos e, destas, aproximadamente 23 mil morrem anualmente (BBC, 2017; CDC, 2017). A perspectiva para o ano de 2050 é de que 317 mil pessoas na América do Norte e 392 mil pessoas na América do Sul morram em decorrência de infecções resistentes aos antibióticos (BASSETTI et al., 2017). A resistência aos antibióticos representa um crescente desafio e seu impacto na saúde pública é ampliado por não haver desenvolvimento de novos medicamentos antimicrobianos capazes de controlar as infecções resistentes (QUADRI et al., 2015). Diversos mecanismos como mutações e transferência plasmidial são responsáveis pelo surgimento da resistência aos antimicrobianos, e nesse contexto, as bactérias da família *Enterobacteriaceae* se destacam pelo desenvolvimento constante da multirresistência e pela alta morbidade (CDC, 2017; POURMAND et al., 2017).

Entre os diversos mecanismos de resistência, a produção de enzimas hidrolisantes destacam-se como os principais mecanismos de resistência em bacilos gram-negativos, principalmente frente aos antibióticos β-lactâmicos, os de maior uso mundialmente (BONOMO, 2016; BUSH; BRADFORD, 2016). O surgimento de β-lactamases, enzimas hidrolisantes de β-lactâmicos, representam a maior ameaça ao uso desses agentes antimicrobianos, e nesse sentido as enzimas β-lactamases de espectro-estendido (ESBLs) e as carbapenemases destacam-se pela capacidade de inativação de potentes antibióticos (BONOMO, 2016; POTTER; D'SOUZA; DANTAS, 2016).

Diversos bacilos gram-negativos, especialmente as enterobactérias, são consideradas ubíquas, uma vez que podem ser encontradas em diversos ambientes. Nesse sentido, os esgotos hospitalares e urbanos destacam-se por conter ampla diversidade microbiana. Ademais, os esgotos hospitalares se distinguem de outros pela composição química de fármacos. Entre os fármacos, destacam-se os antibióticos que podem atingir esgotos hospitalar através das fezes e urinas de pacientes devido ao metabolismo parcial (AMADOR et al., 2015). Assim, em decorrência da diversidade bacteriana e de antibióticos presentes, as águas residuárias em geral representam um ambiente favorável para a adaptação, desenvolvimento e disseminação de genes de resistência aos antibióticos (AUGUET et al., 2017; RIZZO et al., 2013).

Considerando os esgotos gerados em instituições assistenciais de saúde, sabe-se que estes representam uma matriz capaz de contaminar águas superficiais pela presença de matéria orgânica, antibióticos, metais pesados, desinfetantes e microrganismos, e por isso precisam receber tratamento adequado antes do descarte em corpo hídrico (CANTAS et al., 2013). No Brasil, estes esgotos podem ser destinados para a rede coletora municipal sem prévio

tratamento, em casos da existência de Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) na cidade (ANVISA, 2002). Visto o potencial contaminante de esgotos, as ETEs foram construídas para o tratamento das águas residuárias dos municípios e retorná-las ao ambiente causando mínimos impactos à natureza. No entanto, as ETEs podem funcionar como um biorreator da troca de genes bacterianos e favorecer o desenvolvimento da resistência aos antibióticos, bem como a disseminação ambiental (AUGUET et al., 2017; RIZZO et al., 2013).

Nesse contexto, o presente estudo visa a avaliação concomitante de microrganismos multirresistentes em esgotos hospitalar e da ETE, com finalidade de verificar a contribuição destas matrizes para contaminação ambiental e a necessidade de implantação de tecnologias alternativas para a desinfecção destas águas, uma vez que os efluentes tratados são despejados em águas superficiais que podem ser utilizadas para recreação de contato primário, bem como para abastecimento público de água após tratamento convencional.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Objetivo Geral

● Avaliar a condição microbiológica de bacilos gram-negativos oriundos de esgoto hospitalar e urbano quanto a multirresistência aos antibióticos.

Objetivos Específicos

● Identificar bactérias no esgoto de um Hospital de Grande Porte (HGP) da cidade de Ribeirão Preto – SP, das alas do ambulatório, enfermaria e junção dos efluentes.

● Identificar bactérias no esgoto bruto e tratado da Estação de Tratamento de Esgoto urbano, do município de Ribeirão Preto – SP.

● Verificar a multirresistência aos antibióticos em bactérias isoladas do esgoto hospitalar e urbano.

● Avaliar a resistência aos antibióticos mediante ao mecanismo de produção de enzimas β-lactamases.

● Identificar os possíveis impactos para a saúde pública e ambiental devido a exposição às bactérias multirresistentes.

REVISÃO DE LITERATURA

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Antibióticos

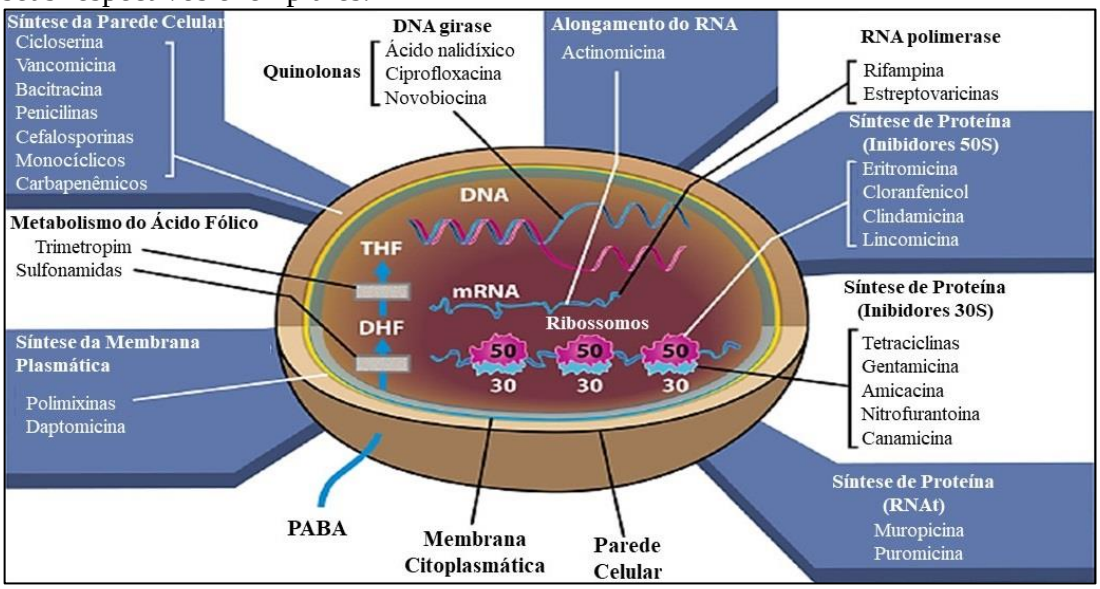
Em estudos com *Staphylococcus aureus*, o bacteriologista Alexander Fleming descobriu o primeiro antibiótico de origem natural produzido pelo fungo *Penicillium chrysogenum*, denominando-o posteriormente de penicilina. Ainda nos primórdios do século XX, além de intervenções como vacinas e melhorias sanitárias, a introdução da penicilina e seus derivados na prática clínica representou uma importante intervenção capaz de controlar as doenças infecciosas e aumentar a expectativa de vida da população (AMINOV, 2017; ALÓS, 2015).

Os antibióticos são compostos químicos de origem natural (e.x.: fungos, bactérias) e/ou sintética, utilizados principalmente na terapia de infecções causadas por bactérias patogênicas em humanos e animais (BOUKI; VENIERI; DIAMADOPOULOS, 2013). Compreendem o grupo de produtos farmacêuticos mais bem-sucedidos, embora estejam sujeitos a evasão evolutiva, ou seja, propiciam o desenvolvimento de bactérias resistentes aos antibióticos (PAWLOWSKI; JOHNSON; WRIGHT, 2016; BOUKI; VENIERI; DIAMADOPOULOS, 2013).

A toxicidade seletiva dos antibióticos é responsável pela inibição do crescimento microbiano sem consequências para as células humanas. A referida seletividade é obtida pela exploração entre as diferenças metabólicas e estruturais dos microrganismos em relação às células humanas. Antibióticos de amplo espectro referem-se aos que são ativos contra várias espécies de microrganismos, como por exemplo a tetraciclina que é amplamente utilizada em bacilos gram-negativos, bem como em clamídias, micoplasmas e riquétsias. Ainda, existem antibióticos de pequeno espectro que atuam sobre espécies específicas de microrganismos, como por exemplo a vancomicina atuante em espécies de *Staphylococcus* e *Enterococcus*. As atividades dos antibióticos sobre as bactérias resumem-se em dois mecanismos: i) bactericida, causando a morte das bactérias; e ii) bacteriostático, inibindo o crescimento bacteriano sem causar morte (TOTORA; FUNKE; CASE, 2016).

A classificação dos antibióticos mais empregada atualmente está relacionada com o alvo de ação do antibiótico, como inibição da síntese da parede celular, do ácido nucleico, proteica e de processos metabólicos (BROOKS; BROOKS, 2014; CASTANHEIRA, 2013). Na figura 1 estão representados os alvos de ações dos antibióticos com seus respectivos exemplares.

Figura 1. Classificação dos antibióticos de acordo com seu alvo de ação em bactérias e seus respectivos exemplares.



Fonte: Adaptado de BROOKS; BROOKS, 2014.

Os β-lactâmicos conformam um grupo de antibióticos entre os mais utilizados na medicina humana na maioria dos países, representando aproximadamente 50-70% do uso total de antibiótico. Sua ampla utilização está relacionada com seu mecanismo bactericida no tratamento de infecções graves, devido a inibição da síntese da parede celular bacteriana (BUSH; BRADFORD, 2016; KÜMMERER, 2009).

A parede celular é uma estrutura constituída de peptideoglicano, macromolécula composta de dissacarídeos polimerizados formadora de uma malha, essencial para a proteção da bactéria. Os antibióticos inibidores da síntese da parede celular inativam enzimas responsáveis pela biogênese do peptideoglicano, acarretando na morte da bactéria. Por esta razão, tais antibióticos compreendem o grupo de maior potencialidade e ampla utilização (DÖRR et al., 2016).

Como mecanismo de ação, os antibióticos β-lactâmicos interrompem a formação da parede celular bacteriana em decorrência da ligação covalente entre o antibiótico com proteínas de ligação à penicilina (PBPs), responsáveis pela reticulação do peptideoglicano (BUSH; BRADFORD, 2016). Em bacilos gram-negativos, a morte bacteriana resulta da inibição de uma ou mais PBPs de alto peso molecular que estão descritas a seguir: as PBPs 1a e 1b estão envolvidas na lise celular; PBP 2, cuja inibição impede a divisão celular e na formação de células esféricas; e PBP 3, a qual que quando inibida resulta no impedimento da divisão celular e formação de filamentos (SPRATT, 1977; SPRATT, 1983).

No grupo dos antibióticos β-lactâmicos estão compreendidas as classes das penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e monobactâmicos, que estão descritos a seguir (BUSH; BRADFORD, 2016).

3.1.1. Penicilinas

Após a descoberta da penicilina por Fleming, diversos antibióticos derivados surgiram no decorrer do século como a ampicilina, amoxicilina, meticilina, nafcilina, oxacilina, entre outros. Introduzidas na década de 1970, ampicilina e amoxicilina apresentavam melhor atividade sobre bacilos gram-negativos, especialmente no tratamento de infecções causadas pelas bactérias da família *Enterobacteriaceae*, embora não tenha apresentado efetividade no tratamento de *Pseudomonas aeruginosa*, bactéria que se tornou um problema de saúde pública no fim da década de 1970 (BUSH; BRADFORD, 2016).

O uso terapêutico das penicilinas como monoterapia está comprometido em razão do crescente número de espécies bacterianas capazes de produzir β-lactamases, enzimas degradadoras de antibióticos β-lactâmicos (BUSH, 2013a). As bactérias *Streptococcus* do grupo A e *Treponema pallidum* são duas das bactérias não produtoras de β-lactamases as quais ampicilina, amoxicilina, entre outros, são eficazes como monoterapia (SCHAAR et al., 2014). No entanto, recentemente, derivados da penicilina como a ampicilina, amoxicilina, piperacilina e ticarcilina são utilizados na antibióticoterapia especialmente quando associados à inibidores de β-lactamases (ácido clavulânico, tazobactam, entre outros) (BUSH, 2013a).

3.1.2. Cefalosporinas

A cefalosporina foi descoberta a partir do fungo *Cephalosporium acremonium* durante a década de 1950, sendo introduzida na prática clínica principalmente para o tratamento de infecções causadas pelas espécies de *Staphylococcus aureus* produtoras de penicilinase, atuante também sobre *Streptococcus pneumoniae* e bactérias entéricas não produtoras de β-lactamase (BUSH; BRADFORD, 2016).

Estes antibióticos são classificados em gerações (1ª a 4ª geração) de acordo com seu espectro de ação, com atividade bactericida sobre espécies de bacilos gram-negativos e Gram-positivas. Alguns exemplares dessa classe de antibiótico são: cefepime, cefotaxima, cefoxitina e ceftazidima. Ao passo que se avança nas gerações, o espectro de ação contra bacilos gram-negativos amplia-se e, concomitantemente, são menos eficazes contra Gram-positivos (CASTANHEIRA, 2013). No entanto, a recente descoberta da ceftobiprole tem demonstrado ação contra cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à oxacilina (MIMICA, 2011).

3.1.3. Carbapenêmicos

Os carbapenêmicos foram incluídos na prática clínica no final da década de 1980 e mostraram efetividade no tratamento de *Klebsiella pneumoniae* produtora de enzimas β-lactamases de espectro-estendido (IOVLEVA; DOI, 2017; PATERSON et al., 2004). São considerados como a classe de antibióticos de maior potencialidade com eficácia comprovada na terapia de pacientes com graves infecções bacterianas, incluindo ainda, atividade antimicrobiana frente as infecções causadas por microrganismos multirresistentes (IOVLEVA; DOI, 2017).

Alguns exemplos de carbapenêmicos são: doripenem, ertapenem, imipenem, meropenem. O doripenem apresenta maior potencialidade *in vitro* contra *Pseudomonas aeruginosa* em relação aos outros carbapenêmicos e grande eficácia na terapia de pneumonia nosocomial. Ertapenem é muito ativo contra bacilos gram-negativos produtoras de β-lactamase de espectro-estendido e possui o tempo de meia vida longo o que propicia dosagem única durante o dia. Assim como o meropenem, o imipenem é mais ativo contra bactérias Gram-positivas e especialmente aos Gram-negativos *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* (EL-GAMAL et al., 2017).

Normalmente, os antibióticos carbapenêmicos possuem melhor estabilidade contra enzimas β-lactamases em relação aos outros β-lactâmicos, logo são altamente ativos frente as espécies da família *Enterobacteriaceae* produtoras dessas enzimas. Contudo, algumas espécies bacterianas são capazes de apresentar resistência a esses antibióticos por diversos mecanismos, como enzimas hidrolisantes (EL-GAMAL et al., 2017).

3.1.4. Monobactâmicos

O aztreonam é o único antibiótico monobactâmico com aprovação para uso terapêutico. Possui atividade contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* e *Enterococcus faecalis*. Quando introduzido na prática clínica, o aztreonam apresentou resistência à hidrolise pelas β-lactamases comuns. No entanto, o surgimento de β-lactamases de espectro-estendido e carbapenemases tornaram-no menos eficaz frente a microrganismos produtores destas enzimas (BUSH; BRADFORD, 2016; WANG et al., 2014; SYKES et al., 1982).

O antibiótico BAL30072 está atualmente em desenvolvimento e é considerado como uma opção terapêutica para infecções graves causadas por bacilos gram-negativos multirresistentes aos antibióticos. Mesmo não apresentando toxicidade hepática em estudos pré-clínicos com animais e estudos clínicos com humanos de dosagem única, a hepatotoxicidade

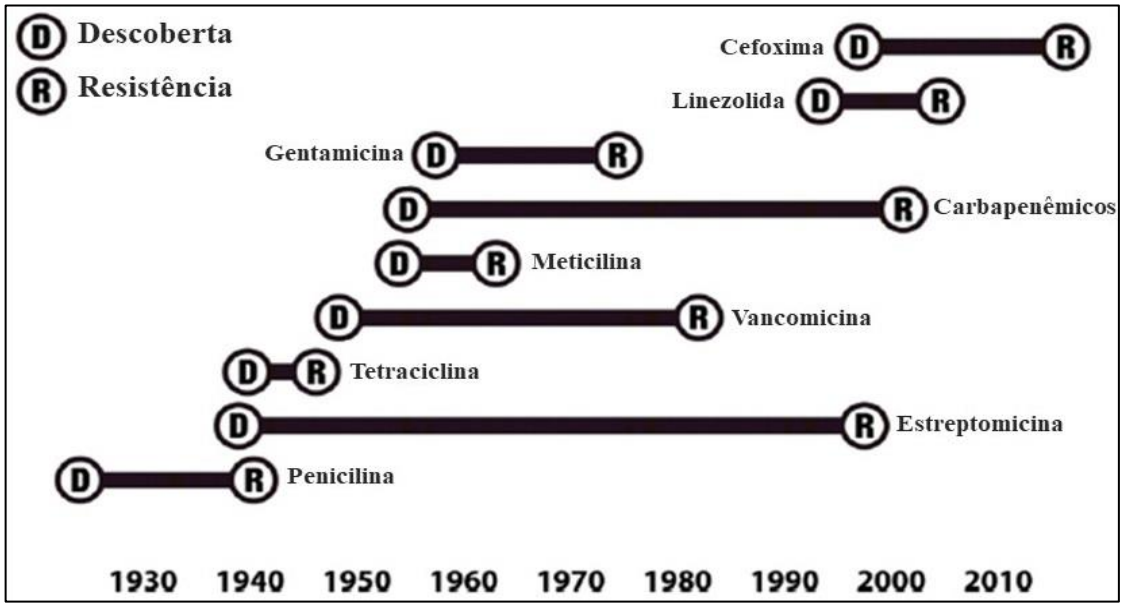
foi observada em humanos que receberam o tratamento com este composto a longo prazo, com possível explicação do comprometimento funcional de mitocôndrias e inibição da glicólise (PAECH et al., 2017). Em decorrência desta toxicidade este medicamento não está aprovado para uso clínico e encontra-se na fase 1 de testes (BUSH; BRADFORD, 2016).

3.3. Resistência Bacteriana aos Antibióticos

A resistência bacteriana aos antibióticos é definida como a capacidade de sobrevivência destes microrganismos às concentrações de antibióticos capazes de inibir a reprodução ou matar outras bactérias da mesma espécie (ALÓS, 2015). De acordo com *Center for Disease Control and Prevention* (CDC), aproximadamente 2 milhões de pessoas são infectadas por bactérias resistentes aos antibióticos, e, destas, 23 mil morrem anualmente nos Estados Unidos (CDC, 2017). Estima-se que no ano de 2050 será relatado aproximadamente 393.000 mortes/ano atribuídas às infecções resistentes aos antibióticos na América do Sul, 4.150.000 na África, 4.730.000 na Ásia, 317.00 na América do Norte, 390.000 na Europa e 22.000 na Oceania (BASSETI et al., 2017).

A resistência bacteriana é um desafio no âmbito da saúde pública no contexto do cuidado à saúde e pela alta morbidade e mortalidade. Os desafios para o controle e desenvolvimento de bactérias resistentes estão associados à falta de medidas de prevenção bem-sucedidas, escassez de terapias efetivas e a falta de investimentos da indústria farmacêutica para o desenvolvimento de novos medicamentos antimicrobianos alternativos capazes de combater as infecções resistentes (FRIERI; KUMAR; BOUTIN, 2017; POURMAND et al., 2017). Na Figura 2 é apresentado a ordem cronológica da descoberta dos principais antimicrobianos e as datas dos primeiros relatos referentes a resistência aos mesmos.

Figura 2. Ordem cronológica da descoberta dos principais antibióticos e do primeiro relato de resistência bacteriana.



Fonte: Adaptado de BROOKS; BROOKS, 2014.

Em 2017, a *World Health Organization*/Organização Mundial de Saúde – WHO/OMS divulgou uma lista de patógenos bacterianos resistentes aos antibióticos classificados como "patógenos prioritários" por apresentarem ameaças a saúde humana. Dentre os patógenos listados, as bactérias *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e bactérias da família *Enterobacteriaceae* (*Klebsiella* spp., *Escherichia coli*, *Serratia* spp. e *Proteus* spp.) resistentes aos carbapenêmicos e produtores de β-lactamase de espectro-estendido compreendem o grupo de prioridade 1 (crítica). As espécies bacterianas citadas são responsáveis por causar infecções oportunistas graves capazes de levar pacientes à óbito e, atualmente, são resistentes a diversos antibióticos como carbapenêmicos e cefalosporinas de terceira geração, as melhores medidas terapêuticas para o tratamento de infecções multirresistentes (WHO, 2017).

Nesse contexto, Mahmoudi et al. (2017) avaliaram o perfil de resistência de bacilos gram-negativos isoladas de infecções sanguíneas em crianças de um hospital no Irã, e verificaram resistência de *Acinetobacter baumannii* (100%), *Escherichia coli* (77%), *Klebsiella pneumoniae* (86%) e *Pseudomonas aeruginosa* (100%) ao antibiótico cefotaxima, uma cefalosporina de terceira geração utilizada para o tratamento de bactérias multirresistentes. Ainda nesse sentido, Navarro et al. (2015) avaliaram o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos de enterobactérias (*Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter* spp., *Escherichia coli*, *Klebsiella ozaenae* e *Citrobacter freundii*) isoladas de infecções sanguíneas de pacientes de um hospital terciário em Medellín (Colômbia), e constataram ampla

resistência aos carbapenêmicos (doripenem 96%, ertapenem 93,75%, imipenem 92,2%, e meropenem 77,5%), o que acarretou em alta mortalidade.

Uma das razões pelas quais as bactérias tornam-se resistentes é devido ao uso inapropriado e/ou excessivo de antibióticos e a descontinuidade do tratamento de infecções. Nesse sentido, existem diversos mecanismos de resistência como pressão seletiva, transmissão e/ou alteração de genes/plasmídeos, alteração do sítio alvo dos antimicrobianos, diminuição da permeabilidade de membranas, bomba de efluxo e inativação enzimática (POURMAND et al., 2017; NAQUIN et al., 2015).

Entre os mecanismos de resistência, a resistência intrínseca é um fenômeno natural que está presente em bactérias de todas as espécies, desde antes a introdução dos antibióticos como quimioterápicos. Especialmente em bacilos gram-negativos, a resistência intrínseca consiste em mecanismo como alteração da permeabilidade de membrana e bomba de efluxo que reduzem a susceptibilidade de agentes patogênicos, limitando as opções terapêuticas (RAHMAN; YARNALL; DOYLE, 2017; COX; WRIGHT, 2013).

Com relação ao mecanismo de resistência aos antibióticos pela inibição enzimática, as bactérias da família *Enterobacteriaceae* se destacam pela ampla resistência aos antibióticos β-lactâmicos, os de maior utilização mundialmente, e a produção de enzimas hidrolisantes desses antibióticos, denominadas de β-lactamases. A resistência presente em bacilos Gram-negativos a esses antibióticos é devido a aquisição de plasmídeos que contém genes que codificam a síntese de β-lactamases e ao uso generalizado de antibióticos que permitiu a evolução e transmissão da resistência entre as espécies de bacilos gram-negativos, especialmente em *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* (CAG et al., 2016; IREDELL; BROWN; TAGG, 2016; WATKINS; BONOMO, 2016).

3.3.1. β-Lactamases

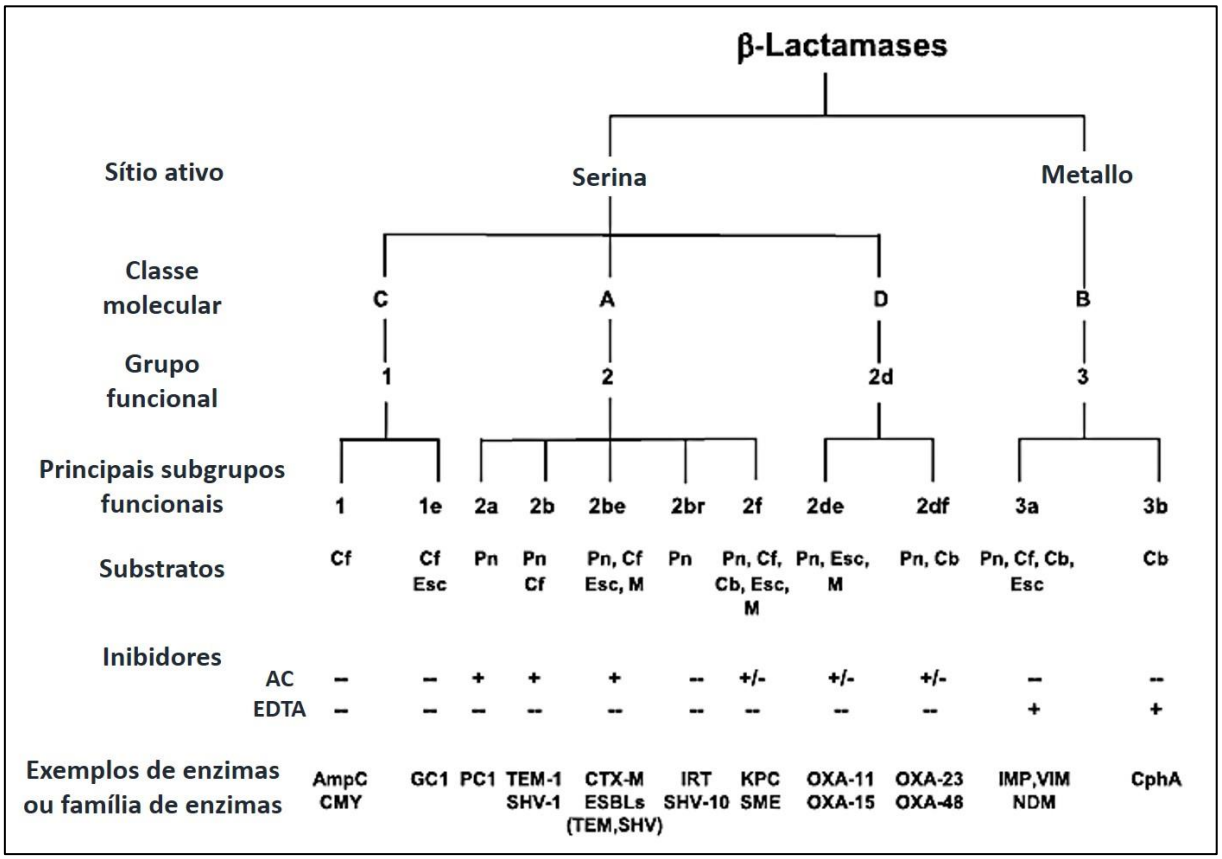
As β-lactamases são enzimas que hidrolisam os antibióticos β-lactâmicos e representam o mecanismo de resistência de maior relevância entre os bacilos gram-negativos por serem comumente produzidas, principalmente por enterobactérias (MOXON; PAULUS, 2016; BUSH; JACOBY, 2010). A partir da introdução das penicilinas na clínica e advento de novos antibióticos β-lactâmicos, a pressão seletiva sob as bactérias aumentou o que promoveu o desenvolvimento de diversas β-lactamases efetivas, conferindo resistência a esses microrganismos. A constante utilização desses antibióticos e a expressão enzimática levou à descoberta massiva dessas enzimas em espécies como *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp. e *Pseudomonas aeruginosa* (BONOMO, 2016). Em consequência, o impacto na clínica médica

é crítico principalmente pela dependência de carbapenêmicos e cefalosporinas para o tratamento de graves infecções. Logo, o uso excessivo desses antimicrobianos resultou em múltiplos genes codificadores de β-lactamases em único patógeno, juntamente com a resistência para diversas outras classes de antibióticos (BONOMO, 2016; BUSH, 2013b).

A primeira β-lactamase a ser identificada foi em uma cepa de *Bacillus coli* (*Escherichia coli*) em 1940, por Abraham e Chain (ABRAHAM; CHAIN, 1940). Nos primórdios das descobertas dessas enzimas, as β-lactamases recebiam o nome da cepa bacteriana ou do plasmídeo que codificava a produção da enzima, como por exemplo PC1 e P99, onde as origens dos nomes são das bactérias *Staphylococcus aureus* cepa PC1 e *Enterobacter cloacae* cepa P99, respectivamente (JACOBY, 2006; RICHMOND, 1963). Mais recentemente, as β-lactamases começaram a também receber nomes de antibióticos os quais hidrolisam (OXA: ativa contra oxacilina), local de descoberta (CTX-M: ativa contra cefotaxima, com primeiro isolamento em Munique, Alemanha), nome de paciente (TEM: Temoneira), nome de bactéria (KPC: *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemases), entre outros (JACOBY, 2006; YIGIT et al., 2001; BAUERNFEIND; GRIMM; SCHWEIGHART, 1990; HEDGES et al., 1974; DATTA; KONTOMICHALOU, 1965).

Atualmente sabe-se que existe mais de 2.000 enzimas β-lactamases identificadas com sequências de aminoácidos e perfil hidrolítico específicos (BONOMO, 2016) e podem ser classificadas por dois esquemas: classificação funcional que considera as propriedades enzimáticas, agrupando-as em três grupos (1, 2, 3), de acordo os substratos bioquímicos e perfis de inibição, com posteriores subdivisões (BUSH, 2013c; BUSH; JACOBY, 2010; BUSH; JACOBY; MEDEIROS, 1995); e a classificação molecular que se baseia na sequência de aminoácidos e as divide em quatro grupos (A, B, C e D), de acordo também com a utilização do sítio ativo (serina, metallo) para hidrólise dos substratos (AMBLER, 1980). Na Figura 3 está apresentada ambas classificações com seus respectivos exemplares enzimáticos.

Figura 3. Esquema classificatório das enzimas β-lactamases de acordo com as classificações funcionais e moleculares, com os respectivos substratos, inibidores e representantes enzimáticos.



AC: ácido clavulânico. **Cb:** carbapenêmicos. **Cf:** cefalosporinas. **EDTA:** ácido etilenodiaminotetraacético. **Esc:** cefalosporinas de espectro estendido. **M:** monobactâmicos. **Pn:** penicilinas.
Fonte: Adaptado de BUSH, 2013a.

3.3.1.1. Grupo funcional 1

O grupo funcional 1 (Figura 3), correspondente a classe molecular C de Ambler, compreende o grupo das serinas-β-lactamases denominadas cefalosporinases que são codificadas por plasmídeos e cromossomos de diversas espécies bacterianas, mas principalmente as da família *Enterobacteriaceae* (MOXON; PAULUS, 2016; BUSH; JACOBY, 2010). Entre as cefalosporinases, as β-lactamases do tipo AmpC são clinicamente importantes por conferir espectro de resistência às cefalosporinas (JACOBY, 2009).

O primeiro relato de enzima AmpC foi em 1989 na Coréia do Sul, e a partir de então outros exemplares enzimáticos foram isolados em regiões da Ásia, Europa, América do Norte e América do Sul (JACOBY, 2009). As expressões dessas enzimas são por genes *bla* (ex.: bla_{CMY}, bla_{FOX}, bla_{MOX}) localizados no cromossomo em bactérias como *Enterobacter* spp., *Serratia marcescens*, *Citrobacter freundii*, *Providencia* spp. e *Morganella morganii*,

principalmente. No entanto a transmissão e codificação plasmidial tem sido mais frequentemente detectada e conferem resistência a múltiplos antibióticos como a maioria das cefalosporinas, penicilinas e inibidores de β-lactamases, como verificado em cepas de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* (LIU; LIU, 2016; MOXON; PAULUS, 2016; JACOBY, 2009).

No Brasil, a enzima FOX-5 foi a primeira AmpC mediada por plasmídeo (pAmpC) a ser detectada em um isolado de *Escherichia coli* que pertencia a um estudo que avaliava a presença do gene *qnrA* (gene de resistência a quinolonas) em 144 isolados de *Escherichia coli* resistente a ciprofloxacina (CASTANHEIRA et al., 2007). No ano seguinte, em 2008, outra pAmpC foi detectada em isolados de *Escherichia coli* (PAVEZ et al., 2008). Neste estudo, quatro cepas foram isoladas de um paciente onde a pAmpC CMY-2 foi detectada em todos os isolados, apresentando ainda resistência as cefalosporinas de amplo espectro, carbapenêmicos, quinolonas e sulfonamidas (PAVEZ et al., 2008). Mais recentemente, um estudo com 2.266 cepas de *Escherichia coli* resistentes a cefoxitina, isoladas de infecções urinárias, verificou que 2,26% apresentavam pAmpC, sendo a CMY-2 e CMY-4 as de maiores frequências (ROCHA et al., 2016). Em virtude do amplo espectro de hidrólise das enzimas AmpC, Cheng et al. (2017) desenvolveram um estudo para avaliar a ação do antibiótico piperacilina-tazobactam frente às infecções sanguíneas causadas por enterobactérias produtoras de AmpC, e concluíram que este antibiótico é uma opção viável para essas infecções, diminuindo a dependência de antibióticos de amplo espectro e favorecimento da resistência microbiana (CHENG et al., 2017).

3.3.1.2. Grupo funcional 2

O grupo funcional 2 (Figura 3), que corresponde a classe molecular A, representa o grupo com maior número de serinas-β-lactamases identificadas capazes de hidrolisar a maior parte dos antibióticos β-lactâmicos (BUSH, 2013a; BUSH; JACOBY, 2010). Em geral, essas enzimas são suscetíveis à ação de inibidores utilizados na clínica, como avibactam, clavulanato, sulbactam e tazobactam (BONOMO, 2016). Entre as enzimas desse grupo funcional, as β-lactamases de espectro-estendido (ESBLs) e serinas carbapenemases destacam-se como grave problema de saúde pública pela capacidade de hidrolisar quase todos os antibióticos β-lactâmicos (BUSH, 2013a).

As ESBLs, como por exemplo CTX-M, SHV e TEM-variantes e alguns tipos de OXA, são capazes de hidrolisar penicilinas, cefalosporinas de primeira a quarta geração e monobactâmico (aztreonam) e já foram isoladas de diversas espécies de interesse clínico como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter cloacae*,

Citrobacter freundii, *Proteus mirabilis*, *Salmonella enterica* e *Morganella morganii*. (MOXON; PAULUS, 2016; POIREL; FERNÁNDEZ; NORDMANN, 2016; SHAIKH et al., 2015). Em virtude da troca gênica, principalmente de plasmídeos com genes codificadores de ESBLs, as bactérias da família *Enterobacteriaceae* produtoras dessas enzimas também podem expressar resistência à múltiplas classes de antibióticos, uma vez que outros genes de resistência podem ser transmitidos juntamente com os genes das enzimas ESBLs (JASPER et al., 2015; VAIDYA, 2011). Dentro dessa perspectiva, um estudo conduzido em Dhaka, Bangladesh, identificou a produção de ESBLs em 1.113 isolados bacterianos de diversas amostras clínicas e verificaram resistência destes à antibióticos β-lactâmicos, bem como à amicacina, gentamicina, ciprofloxacina, sulfazotrim, levofloxacina e colistina, concluindo que existem poucas opções terapêuticas para o tratamento de infecções bacterianas produtoras de ESBLs (JOBAYER et al., 2017). Sendo assim, é de relevância a identificação de ESBLs não somente para a determinação da antibióticoterapia mais viável, mas também para evitar a disseminação da resistência (AL-BAYSSARI et al., 2015).

Ainda pertencente ao grupo funcional 2 (Figura 3), e classe molecular A, encontram-se as serinas carbapenemases que podem ser codificadas cromossomicamente (ex.: SME), por plasmídeos (ex.: KPC) ou ambos (ex.: IMI) (NAAS; DORTET; IORGA, 2016). Essas enzimas possuem a capacidade de hidrolisar diversos antibióticos β-lactâmicos como os carbapenêmicos, penicilinas, cefalosporinas e o monobactâmico aztreonam, sendo inibidas parcialmente pelo ácido clavulânico e tazobactam (BUSH; JACOBY, 2010; BUSH; JACOBY; MEDEIROS, 1995). A disseminação das carbapenemases do grupo 2 entre as enterobactérias é preocupante visto que estão presentes em diversos agentes patogênicos causadores de infecções nosocomiais e pela hidrólise também de cefalosporinas de espectro expandido utilizada para o tratamento dessas infecções (NORDMANN; NASS; POIREL, 2011). As primeiras serinas carbapenemases foram reconhecidas durante a década de 1980, ganhando maior destaque com a descoberta das enzimas KPC, em 1996, e com sua disseminação mundial a partir da década de 2000 (YIGIT et al., 2001).

O primeiro reporte da enzima KPC foi em uma cepa de *Klebsiella pneumoniae* isolada em um hospital da Carolina Norte, Estados Unidos, em 1996 (YIGIT et al., 2001). Após a descoberta, isolados positivos para KPC foram detectados em hospitais da cidade de Nova York, Estados Unidos, entre os anos de 1997 e 2001 (BRADFORD et al., 2004). Os isolados produtores de KPC são considerados endêmicos em diversos países da América como Estados Unidos, Colômbia, Argentina e Brasil. Na Europa, Grécia e Itália são consideradas países endêmicos e outros países como França e Espanha apenas com relatos esporádicos e alguns

casos ligados a importação de pacientes de áreas endêmicas. Em outras regiões do mundo, Israel e China são considerados países endêmicos, diferentemente da Índia, Austrália, Nova Zelândia e África com casos esporádicos (MUNOZ-PRICE et al., 2013). No Brasil, o primeiro relato da enzima KPC envolveu a identificação da enzima KPC-2 em quatro isolados de *Klebsiella pneumoniae* em uma unidade de terapia intensiva na cidade de Recife. Concomitantemente ao isolamento da enzima KPC-2, foram identificadas outras enzimas β-lactamases como TEM-1, SHV-11 e CTX-M-2 apresentando resistência a diversos antibióticos (MONTEIRO et al., 2009). Mais recentemente, foi identificado *in vivo* a transferência do gene $bla_{\text{KPC-2}}$ entre as espécies *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter cloacae*, indicando que a aquisição da resistência aos carbapenêmicos por enterobactérias pode ocorrer durante a terapia (MARTINS et al., 2017).

Nesse contexto, as carbapenemases têm ganhado relevância por sua capacidade de hidrólise dos antibióticos β-lactâmicos em geral. A preocupação com essa enzima é aumentada com a expressão conjunta de outras β-lactamases com eficiência catalítica para cefalosporinas e penicilinas, em uma mesma bactéria. Bem como as enzimas ESBLs, as carbapenemases mais efetivas na hidrólise dos antibióticos podem ser transferidas em conjunto com outros mecanismos de resistências o que confere resistência a quase todas as classes de antibióticos utilizados no tratamento de infecções. Assim, os antibióticos aminoglicosídeos e as fluoroquinolonas são os mais afetados por essas ações bacterianas, reduzindo as opções terapêuticas, uma vez que esses antimicrobianos são empregados para o tratamento de infecções causadas por diversas espécies de Gram-negativas (BUSH, 2013b).

No grupo funcional 2d (Figura 3), correspondente a classe molecular D de Ambler, encontram-se as serinas-β-lactamases conhecidas como OXA, denominação esta que se refere ao fato de que as primeiras enzimas desse grupo a ser identificadas possuíam capacidade expandida de hidrolisar a penicilina oxacilina, logo adotou-se o prefixo OXA para a denominação de todas as enzimas desse grupo funcional (ANTUNES; FISHER, 2014; BUSH; JACOBY; MEDEIROS, 1995). Essas enzimas são frequentemente isoladas de bacilos gram-negativos tanto de origem cromossômica quanto de elementos genéticos móveis, tal qual os plasmídeos (EVANS et al., 2014; POIREL; NAAS; NORDMANN, 2010). Atualmente existem aproximadamente 500 enzimas descritas de acordo a estrutura e atividades hidrolíticas frente aos β-lactâmicos, e algumas são restritas a algumas espécies bacterianas, tais como OXA-23, -40, -58, -143 e -235 que são encontradas nas bactérias do gênero *Acinetobacter*; OXA-198 restrita a *Pseudomonas aeruginosa*; e OXA-48 presente em bactérias da família *Enterobacteriaceae* (BOGAERTS et al., 2017; LAHEY, 2017).

O primeiro isolado de OXA-48 foi em uma cepa de *Klebsiella pneumoniae* multirresistente na Turquia, em 2001 (POIREL et al., 2004). A partir dessa identificação enzimas semelhantes foram identificadas, passando a integrar o grupo OXA-48 (ex.: OXA-54, -162, -245, entre outras) (ANTUNES; FISHER, 2014). Entre as OXA-48 existem as que de fato possuem atividade hidrolítica frente a penicilinas e carbapenêmicos (OXA-244, -245, -370, e outras) e variantes sem qualquer atividade contra os carbapenêmicos, mas apresentando atividade frente as cefalosporinas de espectro estendido (OXA-405, e outras) (DORTET et al., 2015; SAMPAIO et al., 2014; OTEO et al., 2013). Recentemente, a enzima OXA-372, não relacionada ao grupo OXA-48, foi identificada em um isolado de *Citrobacter freundii* oriundo de esgoto hospitalar indicando a possibilidade da existência de outras enzimas OXA presentes em enterobactérias (ANTONELLI et al., 2015).

3.3.1.3. Grupo funcional 3

Diferentemente dos grupos funcionais anteriormente citados que utilizam a serina como sítio para a hidrólise dos antibióticos, no grupo funcional 3 (Figura 3), correspondente a classe B de Ambler, encontram-se as carbapenemases denominadas de metallo-β-lactamases (MBLs) que necessitam de pelo menos um cofator metálico (íon de Zn^{2+}) para exercer a atividade hidrolítica em todos os antibióticos β-lactâmicos, exceto o aztreonam, sendo expressadas por genes presentes em plasmídeos ou cromossomos (ROTONDO; WRIGHT, 2017; BONOMO, 2016). Pela dependência de íons metálicos para realizar a atividade catalítica nos β-lactâmicos, as MBLs são inibidas por agentes quelantes metálicos, como o EDTA (ROTONDO; WRIGHT, 2017). A enzima IMP-1, de atividade catalítica frente ao imipenem, foi a primeira MBL a ser descoberta em 1991 e até os dias atuais mais de 50 enzimas variantes foram relatadas (MOJICA; BONOMO; FAST, 2016).

A nível molecular, as MBLs são divididas em três subclasses de acordo com a estrutura e aminoácidos ligados ao íon Zn^{2+}. Na subclasse B1 as principais enzimas são as IMP, VIM, SPM-1; na subclasse B2 as CphA e Sfh-1; e B3 as FEZ-1 e CAU-1. Diferentemente da subclasse B2 que possui apenas um íon de zinco divalente, as subclasses B1 e B3 possuem dois íons de zinco divalente para atividade catalítica dos substratos (BUSH, 2013c; GARAU et al., 2004). Em 2009 foi reportado a existência de uma nova enzima denominada de New Delhi Metallo-β-lactamase, NDM-1, na Índia, estruturalmente diferente, com apenas 32,4% de similaridade com outras enzimas MBLs da subclasse B1, surgindo então uma divisão nesta subclasse, denominada de B1b (YONG et al., 2009). Apesar do gene $bla_{\text{NDM-1}}$ ter sido identificado primeiramente em um isolado de *Klebsiella pneumoniae* como relatado por Yong

et al. (2009), a disseminação de genes entre espécies bacterianas é rápida, posto que já foram detectados o referido gene em outras espécies de bactérias da família *Enterobacteriaceae*, bem como em *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* (LÜ et al., 2017; RAHMAN et al., 2017; AN et al., 2016).

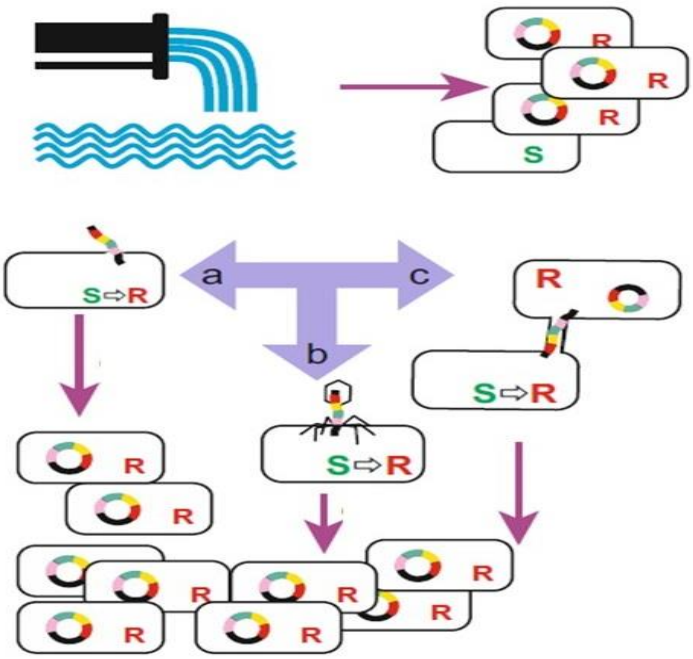
3.5. Bactérias Resistentes em Matrizes Ambientais: Esgoto Hospitalar e Urbano

Diversos estudos mostram a capacidade de águas de rios, águas costeiras e principalmente esgotos funcionarem como reservatórios e favorecerem o desenvolvimento de bactérias e genes de multirresistência aos antibióticos, bem como a disseminação e contaminação ambiental (AUGUET et al., 2017; MONTEZZI et al., 2015; RODRIGUEZ-MOZAZ et al., 2015; RIZZO et al., 2013). Nesse contexto, os esgotos urbanos e principalmente os hospitalares destacam-se por conter antibióticos parcialmente metabolizados em decorrência da excreção de materiais biológicos tanto humano quanto animal e ampla diversidade microbiológica (AMADOR et al., 2015; CAI; JU; ZHANG, 2014).

Os primeiros estudos que verificaram a presença de bactérias e perfis de resistência em esgotos datam da década de 1980. Os autores pesquisaram a resistência a múltiplos antibióticos e transferência de resistência à gentamicina em enterobactérias e *Pseudomonas* spp. próximas ao Rio Danúbio, na Alemanha em 1984. Evidenciaram a transferência de determinantes de resistência entre as espécies, principalmente frente ao β-lactâmicos. Naquela época já inferiram que esgotos e águas de córregos poderiam funcionar como reservatórios de estirpes resistentes com capacidade de transferência desses determinantes (KRÁLIKOVÁ; KRCMÉRY; KRCMÉRY, 1984).

Bactérias sem e com genes de resistência estão presentes nos esgotos e podem adquirir genes de resistência por três vias, principalmente: a) transformação, onde a bactéria interioriza fragmentos de materiais genéticos móveis com genes de resistência, integrando-os em seu cromossomo; b) transdução, onde um bacteriófago insere seu material genético (DNA ou RNA) com genes de resistência; e c) conjugação, onde uma bactéria duplica o plasmídeo portador de genes de resistência e, através do *pilus* sexual, transfere tais genes para a bactéria, até então, sensível (KARKMAN et al., 2018). A Figura 4 ilustra os mecanismos de transferência e aquisição de genes de resistência por bactérias em esgotos.

Figura 4. Mecanismos de aquisição de genes de resistência por bactérias em esgoto.



Fonte: KARKMAN et al., 2018.

Mais recentemente, Moura et al. (2012) verificaram a ocorrência de bactérias, resistência aos antibióticos e diversidade de integrons e cassetes em enterobactérias e *Aeromonas* spp. isoladas de esgoto urbano de uma ETE, em Ermesinde, Portugal, no ano de 2007. Diversas espécies de *Aeromonas* spp. foram isoladas, bem como *Enterobacter* spp., *Klebsiella oxytoca* e *Shigella* spp. e apresentaram concomitantemente positividade para integrons e maior frequência de resistência a ampicilina, cefalotina, eritromicina e ácido nalidíxico, entre outros. Com a descoberta de novos de cassetes, os autores sugerem que os esgotos podem favorecer a formação de novos cassetes genéticos, elementos móveis geralmente associados a resistência antimicrobiana.

Um estudo realizado na cidade de Olsztyn, na Polónia, investigou a prevalência de bactérias da família *Enterobacteriaceae* produtoras de enzimas ESBL em esgotos de três hospitais de diversas alas hospitalares (laboratórios, urologia, cardiologia, serviços de diálises e quimioterapias, entre outras). Ao isolarem 310 enterobactérias, verificaram que a maioria apresentou resistência às cefalosporinas: 95,2% eram resistentes a cefotaxima, 81,6% a ceftazidima e 73,5% a cefpodoxima. Noventa e um isolados possuíam genes de enzimas ESBL, onde $bla_{CTX\text{-}M}$ foi o de maior prevalência (54,9%), seguido de bla_{SHV} e bla_{TEM}. Verificaram ainda que as bactérias *Escherichia coli* e *Citrobacter freundii* foram com maior positividade para enzimas ESBL e correlação significante entre o consumo de antibióticos em cada hospital

e incidência de isolados de ESBL nos esgotos hospitalares (KORZENIEWSKA; HARNISZ, 2013).

Amador et al. (2015) verificaram a contribuição de esgotos de origem hospitalar e urbana para a disseminação de resistência aos antibióticos nas águas residuais tratadas no Rio Mondego, Coimbra, Portugal. A presença de *Enterobacteriaceae* foi investigada, bem como a multirresistência e a produção de β-lactamases das Classe A e Classe C. Os resultados mostraram elevada resistência aos antibióticos β-lactâmicos ampicilina, cefoxitina, amoxicilina clavulanato, cefotaxima, aztreonam, cefpirome, ceftazidima, entre outros antibióticos de outras classes, apresentando sensibilidade apenas ao cloranfenicol e a gentamicina. Quanto a produção enzimática, 51,9% dos isolados foram positivos para ESBL, 44,4% para AmpC e 35,2% para ambos, e os genes mais prevalentes de ESBL foram bla_{OXA} e bla_{TEM} com 33,3% e 24,1%, respectivamente, e do grupo AmpC foram bla_{EBC} (38,9%) e bla_{FOX} (1,9%). Verificaram que a incidência de bactérias resistentes a múltiplos antibióticos é maior em esgoto de origem hospitalar com relação ao esgoto de origem urbana e, portanto, representam a contribuição de maior significância para a disseminação de bactérias resistentes.

Röderová et al. (2016), na República Checa, investigaram a presença de bactérias resistentes no esgoto hospitalar, com foco em bactérias produtoras de enzimas ESBL e AmpC e genes de resistência a fluoroquinolonas (*qnr*). Verificaram maior prevalência de *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*. Quanto ao teste de sensibilidade aos antibióticos, encontraram elevada resistência às cefalosporinas de terceira geração (61,9% a ceftazidima e 57,1% a cefotaxima), a tetraciclina (96,7%), ciprofloxacina (86,7%) e gentamicina (80%), e a identificação enzimática revelou alta frequência das enzimas TEM, SHV, CTX-M e do gene *qnr*B, que confere resistência as fluoroquinolonas. Ademais, os autores detectaram dois isolados idênticos de *Klebsiella pneumoniae*, um do cateter urinário de um paciente e outro no esgoto, evidenciando a disseminação de bactérias resistentes de origem hospitalar através de águas residuárias.

Em 2017, Daoud et al. (2017) avaliaram a ocorrência e os mecanismos de resistências de bacilos gram-negativos em ETEs de dois hospitais no Líbano. Para tal, o teste de sensibilidade aos antibióticos de diversas classes foi empregado, bem como a detecção de enzimas dos grupos ESBL, AmpC, MBL, KPC. Resistência a diversas classes de antibióticos foi observada, entre elas as penicilinas, monobactâmico, aminoglicosídeos, entre outros. De ambos os hospitais, todos os isolados de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* eram produtores de ESBLs, as enzimas AmpC estavam presentes em 25% e 28,9%, respectivamente, e $bla_{\mathrm{CTX\text{-}M}}$ foi o gene codificador de β-lactamase de maior prevalência (88,2%), seguido de

bla$_{OXA}$, *bla*$_{SHV}$ e *bla*$_{TEM}$. Quanto as MBLs, o único gene identificado foi *bla*$_{NDM-1}$ em dois isolados de *Enterobacter cloacae*.

3.5.1. Cenário Brasileiro

No Brasil, o primeiro estudo que investigou bactérias em esgoto foi realizado na cidade de Rio de Janeiro, em 1984, que pesquisou a diversidade de espécies de *Salmonella* e a sensibilidade aos antibióticos. O estudo conduzido por Vinhas e Almeida (1984) identificou a *Salmonella typhimurium* e *Salmonella agona* como os sorotipos mais prevalentes e com perfil de resistência a ampicilina (92%), cloranfenicol (76%), gentamicina (84%), estreptomicina (96%), tetraciclina (76%), sulfazotrim (84%) e ácido nalidíxico (52%). Verificaram ainda que duas cepas com padrão de resistência à estreptomicina e tetraciclina eram colicinogênicas, substância tóxica que é liberada para o meio extracelular para reduzir a competitividade com outras cepas bacterianas (VINHAS; ALMEIDA, 1984).

Com final da década 2000 até a presente data, prevalecem os estudos com esgoto hospitalar em relação ao esgoto urbano, em cidades metropolitanas. No ano de 2006, na cidade de Rio de Janeiro, encontraram isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de enzimas ESBL (46,5%) em diferentes pontos de amostragem de uma ETE pertencente a um hospital, com ampla resistência às cefalosporinas e gentamicina. No referido hospital, a ETE utiliza o reator anaeróbico de fluxo ascendente (RAFA) para tratamento dos efluentes e concluíram que este processo de tratamento não foi eficiente para a eliminação desses patógenos, evidenciando a necessidade de outros processos pós-tratamento de desinfecção com finalidade de minimizar os impactos das águas residuais nos corpos hídricos receptores e a disseminação de genes de resistência no meio ambiente (PRADO et al., 2008).

Chagas et al. (2011) investigaram a diversidade bacteriana, bem como o perfil de resistência e β-lactamases em Gram-negativas isoladas de esgoto hospitalar no Rio de Janeiro. Diversas espécies bacterianas foram identificadas como *Klebsiella* spp., *Aeromonas* spp., *Acinetobacter* spp., *Enterobacter* spp., *Shigella* spp., *Escherichia* spp., *Leptospira* spp., entre outras. O antibiograma mostrou que os antibióticos cefalotina, sulfazotrim, ciprofloxacina, cefotaxima, cefoxitina, amicacina, ceftazidima foram os que apresentaram menores taxas de susceptibilidade, enquanto os carbapenêmicos apresentaram maiores porcentagens de sensibilidade. Aproximadamente 44% de 221 isolados eram produtores de enzimas ESBL, sendo a *Klebsiella pneumoniae* de maior prevalência (39,2%), com identificação dos genes *bla*$_{CTX-M}$, *bla*$_{TEM}$ e *bla*$_{SHV}$. A identificação concomitante dos três genes foi verificada em 23%

dos 97 isolados positivos para ESBL, evidenciando a diversidade de mecanismos de existentes em uma mesma bactéria.

Diversos estudos foram realizados na cidade metropolitana de Rio de Janeiro pela densidade populacional atendida nos hospitais e pelo volume de esgoto bruto e tratado descarregado em áreas de recreação, como a Baía de Guanabara (MONTEZZI et al., 2015). Nesse sentido, um estudo realizado em águas costeiras da Baía de Guanabara identificou espécies como *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Aeromonas* spp., *Citrobacter* sp., e *Kluyvera* spp. produtoras de β-lactamases como $bla_{\text{KPC-2}}$, bla_{GES}, bla_{TEM}, bla_{SHV} e $bla_{\text{CTX-M}}$ e com perfil de resistência a cefotaxima (77,8%), cefepima (50%), gentamicina (27,8%), amicacina (27,8%) e ciprofloxacina (5,6%). Assim como os esgotos, as águas costeiras podem representar reservatórios e vetores de microrganismos multirresistentes em locais com déficits de saneamento ambiental, com capacidade de disseminação da resistência na comunidade (MONTEZZI et al., 2015).

Mais recentemente, Conte et al. (2017) desenvolveram um estudo na cidade de Curitiba, Paraná, que visaram identificar bacilos gram-negativos e β-lactamases em esgoto hospitalar, urbano e em água superficial próximo ao Rio Iguaçu. Em todos os sítios de amostragem foram encontradas bactérias como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Klebsiella oxytoca*, com produção de enzimas SHV, CTX-M e GES, bem como determinantes de resistência a ciprofloxacina. Destacaram a resistência multifatorial bacteriana presente no meio ambiente e o uso de antimicrobianos em diversos segmentos antrópicos que contribuem para o surgimento e propagação de genes de resistência no meio ambiente, tornando-o em um reservatório natural.

Visto o potencial contaminante dos esgotos, estes devem ser coletados e encaminhados para Estações de Tratamento de Esgoto (ETEs) antes de ser lançados em um curso hídrico receptor (lagos, córregos, rios), com finalidade de remover a matéria orgânica, químicos, e redução e/ou inviabilização de organismos patogênicos causadores de doenças em humanos (VON SPERLING, 2005). Quanto aos esgotos de origem hospitalar, as unidades de saúde constantemente geram efluentes que, por vezes, requerem tratamento e destinação apropriada (EMMANUEL et al., 2005). No entanto a legislação brasileira, Resolução RDC 50 de 21 de fevereiro de 2002, que dispõe sobre o regulamento técnico para planejamento, programação, elaboração e avaliação de projetos físicos de estabelecimentos assistenciais de saúde (EAS), da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), determina que se a região onde está a EAS possuir coleta pública e tratamento de esgoto, o esgoto resultante desses serviços pode ser lançado na rede coletora sem qualquer tratamento.

No Brasil, os efluentes tratados devem estar dentro dos parâmetros prescritos pelas Resoluções nº 357, de 17 de março de 2005, e nº 430 de 13 de maio de 2011, do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA, 2011), que dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes em corpos hídricos. Nessa perspectiva, existem diversos métodos de tratamento de esgoto que envolvem processos físicos, químicos e biológicos, como a lagoa de estabilização, reator anaeróbico de fluxo ascendente (RAFA/UASB), lodos ativados, entre outros (CESAN, 2013).

Embora o papel das ETEs seja de promover a desinfecção e interromper o ciclo infectocontagioso de diversas doenças, as ETEs recebem esgotos de diversas fontes e bactérias de diferentes ambientes, bem como antibióticos advindos das excretas humanas (AMADOR et al., 2015; CAI; JU; ZHANG, 2014; LANGERGRABER, 2013). Portanto, os esgotos e as ETEs representam um reservatório e biorreator de materiais genéticos de resistência, favorecendo a transferência e o desenvolvimento da resistência, bem como contribuir para sua disseminação ambiental e contaminação de corpos hídricos receptores de efluentes tratados (AUGUET et al., 2017; GIEBUŁTOWICZ et al., 2017; RIZZO et al., 2013).

Partindo do pressuposto da existência de bactérias multirresistentes aos antibióticos no esgoto hospitalar e ETEs, reitera-se a significância da realização de estudos nessas matrizes a fim de verificar a contribuição destas para a contaminação de águas superficiais locais e o potencial risco à população e meio ambiente, bem como para contribuir com o monitoramento e epidemiologia sobre genes de resistência a antibióticos.

MATERIAIS E MÉTODOS

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Local de Estudo e Amostragem

A cidade de Ribeirão Preto está localizada na região nordeste do Estado de São Paulo, com população estimada em 694.534 habitantes, distribuídos em um perímetro de 650,916 km² (IBGE, 2018). Ribeirão Preto possui um hospital de grande porte (HGP), localizado na zona oeste da cidade, que presta serviços de apoio, especializado e de diagnóstico. Uma das unidades do referido hospital possui estrutura de 162.773,27m^2 de área construída, 727 leitos e um subtotal de 678.091 atendimentos (procedimentos e consultas) no ano de 2017 (último relatório emitido) (HCFMRP, 2017). Seguindo normas da RDC 050/02 (ANVISA, 2002), o hospital descarta todo o esgoto gerado no sistema coletor da cidade que é levado para Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) Ribeirão Preto.

A Ambient – Serviços Ambientais de Ribeirão Preto S. A. tem como objetivo de construir, operar e manter o sistema de tratamento de esgoto das duas ETEs de Ribeirão Preto, ETE-Caiçara e ETE-Ribeirão Preto. A ETE-Ribeirão Preto trata 84% do esgoto gerado no município pela tecnologia de lodos ativados. O tratamento de esgoto por esta tecnologia é amplamente utilizado mundialmente e consiste em um processo estritamente biológico, onde o esgoto é submetido a uma população de microrganismos que, na presença de oxigênio dissolvido, depuram a matéria orgânica. Esta técnica confere algumas vantagens como: pouca área necessária para implantação do sistema de tratamento; maior eficiência no tratamento; e maior flexibilidade de operação. No entanto demanda altos custos, operadores especializados e análises laboratoriais diárias (CASAN, 2017). Após o tratamento a disposição final dos efluentes tratados é no Córrego Ribeirão Preto com desague no Rio Pardo, em Ribeirão Preto (AMBIENT, 2017). O Rio Pardo tem sua nascente no município de Ipuiúna, MG, e confluência com o Rio Grande, SP, após percorrer 550km. A maior extensão deste rio (84%) está no Estado de São Paulo, onde cidades o utilizam como fonte de abastecimento público de água e para recreação de contato primário, como clubes recreativos e praias de água doce (SIGRH, 2017; FREGONESI, 2017).

Durante o período de Abril a Setembro de 2018, amostras de esgotos foram coletadas do HGP e da ETE-Ribeirão Preto. No HGP, as amostras de esgotos foram coletadas em três caixas de inspeção que interceptam o esgoto dos ambulatórios, enfermaria e junção/saída dos efluentes, excetuando os da lavanderia. Na ETE-Ribeirão Preto, amostras de esgoto foram coletadas caixa de entrada e após o tratamento (saída do decantador secundário). As amostras (100 mL) foram coletadas em frascos de vidro com auxílio de um instrumento para coleta

desenvolvido, sendo então encaminhadas ao Laboratório de Ecotoxicologia e Parasitologia Ambiental da Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

4.2. Isolamento e Identificação Bacteriana

O isolamento de bacilos gram-negativos foi por meio da semeadura de 10µL das amostras em meios seletivos ágar MacConkey (indicado para bacilos gram-negativos), ágar *Salmonella-Shigella*, ágar Cetrimide (meio seletivo para isolamento de *Pseudomonas aeruginosa*) e TCBS (indicado para o isolamento de *Vibrio* spp.), seguido de repique para isolamento, após 24 horas de incubação (Figura 5).

Figura 5. Isolamento de bactérias de esgoto hospitalar e comunitário.

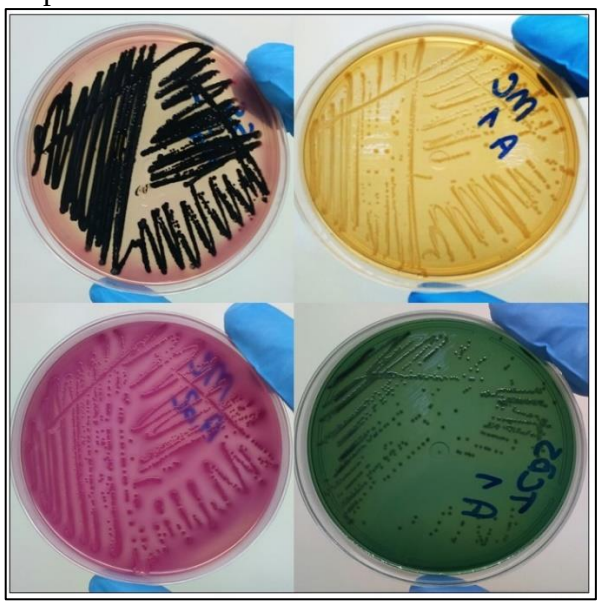


Foto: Zagui (2018). Laboratório de Ecotoxicologia e Parasitologia Ambiental, EERP, USP.

Previamente à identificação, as bactérias foram testadas quanto a oxidase para determinação de qual sistema de identificação bioquímico utilizar. As bactérias que apresentaram negatividade para a oxidase foram submetidas a identificação pelos sistemas Bactray® I e II (Laborclin). As bactérias positivas para oxidase foram identificadas pelo sistema Bactray® III (Laborclin). Cada sistema possui 10 testes bioquímicos, os quais estão descritos a seguir com seus respectivos princípios físico-químicos (Tabela 1).

Tabela 1. Princípios físico-químicos dos testes bioquímicos utilizados para a identificação bacteriana pelos sistemas Bactray® I, II e III.

Testes	Princípios físico-químicos
	Bactray I
ONPG	A hidrólise da β-galactosidase (o-nitrofenol-β-d-galacto-piranoside) para galactose na presença do o-nitrofenol desenvolve cor amarela.
Arginina dehidrolase	Arginina dehidrolase transforma a arginina em citrulina e amônia. Isto ocasiona uma elevação do pH do sistema com a consequente mudança do indicador de amarelo para púrpura.
Lisina descarboxilase	Lisina descarboxilase transforma a lisina num composto básico de amina primária (cadaverina) e CO_2. Esta amina produz uma elevação do pH do sistema com a consequente mudança do indicador de amarelo para púrpura.
Ornitina descarboxilase	Ornitina descarboxilase transforma a ornitina num composto básico de amina primária (putrescina) e CO_2. Esta amina produz uma elevação do pH do sistema com a conseqüente mudança do indicador de amarelo para púrpura.
H_2S	O sulfeto de hidrogênio é produzido pela hidrólise enzimática do tiossulfato. Na presença do citrato férrico forma um precipitado negro.
Ureia	A urease hidrolisa enzimaticamente a ureia com produção de amônia e CO_2.
VP	Este é um teste para verificação da produção de acetoína, produto este intermediário da degradação da glicose. Sua presença é indicada pela cor vermelha ou rosa, formada pela reação do complexo hidróxido de potássio e alfa naftol.
PD	A desaminação da fenilalanina, produzida pelo ácido fenil pirúvico, forma uma cor verde na presença de cloreto férrico.
Indol	A metabolização do triptofano pela triptofanase resulta na produção de indol formando um complexo de cor rosa ou vermelho com o reagente de Kovac's.
Citrato	Consiste na utilização de citrato como única fonte de carbono, o qual quando metabolizado, resulta num produto alcalino de coloração azul ou verde azulado.
	Bactray II
Malonato	Consiste na utilização de malonato como única fonte de carbono, o qual quando metabolizado, resulta num produto alcalino de coloração azul ou verde azulado.
Rhamnose Adonitol Salicina Arabinose Inositol Sorbitol Sacarose Manitol Rafinose	Consiste na utilização de carboidratos com a concomitante produção de ácido, mudando o indicador de azul para amarelo.
	Bactray III
Cetrimide	Crescimento indica tolerância para cetrimide.
Acetamida Malonato Citrato	A utilização destas substâncias como única fonte metabólica de carbono, produz a alcalinização do meio. Uma elevação do pH muda o indicador de verde para azul.
Maltose	A utilização de carboidratos resulta na produção de ácido, mudando o indicador (vermelho de fenol) de vermelho para amarelo, ou amarelo-alaranjado.
Esculina	A hidrólise da esculina é detectada pelo citrato férrico amoniacal, formando um precipitado negro.
L-Arginina	A arginina dehidrolase transforma a arginina em citrulina e amônia. Isto ocasiona uma elevação do pH do sistema, mudando o indicador de amarelo para alaranjado ou vermelho.
Controle (arginina)	Esta prova serve de branco para leitura da arginina. Observe a coloração deste controle. Caso a cor obtida na arginina seja de maior intensidade (vermelho, laranja ou rosa), esta é considerada positiva.
Ureia	A hidrólise enzimática da ureia pela urease resulta na produção de amônia e CO_2, mudando o indicador para vermelho.
Indol	A desagregação (metabolização) do triptofano pela triptofanase resulta na produção de indol, formando um complexo de cor rosa para vermelho com o reagente de Kovac's.

Fonte: Sistema de identificação Bactray® (Laborclin).

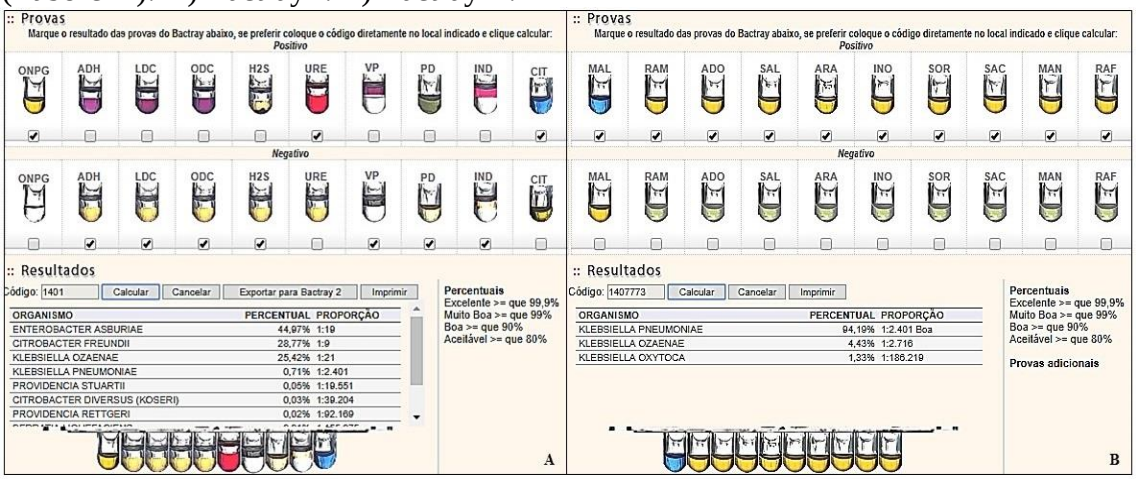
Para a inoculação nos sistemas bioquímicos foi feito uma suspensão da bactéria a ser identificada (1mL) semelhante a turvação 0,5 da Escala McFarland, sendo adicionado 100µL da suspensão em cada poço com o teste bioquímico. A seguir é apresentado os kits Bactray após 24 horas de incubação em câmara úmida para avaliação da positividade/negatividade das provas bioquímicas (Figura 6).

Figura 6. Kit Bactray® I, II e III (Laborclin) para identificação bioquímica de bacilos gram-negativos.

Foto: Zagui (2018). Laboratório de Ecotoxicologia e Parasitologia Ambiental, EERP, USP.

As provas bioquímicas, cuja positividade é determinada pela coloração, foram transferidas para o software de identificação bacteriano do fornecedor dos kits. A seguir (Figura 7) é exemplificado a identificação bacteriana utilizando os sistemas Bactray® I e II (Laborclin).

Figura 7. Sistema de identificação de bacilos gram-negativos pelo kit Bactray® (Laborclin): A) Bactray I. B) Bactray II.



Nota-se que com as provas bioquímicas positivas contidas no Bactray I foi apresentado diversos microrganismos com seus respectivos percentuais, sendo a bactéria *Enterobacter absuriae* de maior probabilidade (44,97%). Nesses casos a utilização do Bactray II é necessária para complementar a caracterização bioquímica da bactéria oxidase negativa e posterior identificação, uma vez que se admite a identificação como satisfatória quando o percentual for superior a 80%. Exportando o resultado para o Bactray II e adicionando as provas positivas do mesmo, o resultado aponta como boa identificação de *Klebsiella pneumoniae* com percentual de 94,19%.

Para o controle de qualidade e plenitude dos resultados da identificação bacteriana, as bactérias padrão *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 foram submetidas ao teste de oxidase e posteriormente à identificação pelos kits Bactray®.

4.3. Teste de Sensibilidade aos Antibióticos

O antibiograma foi pela técnica de disco-difusão em ágar Mueller-Hinton padronizado pelo *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2017).

Colônias da bactéria isolada foram inoculadas em tubo contendo 5mL NaCl 0,9% até atingir a turvação semelhante a 0,5 da Escala McFarland. Após a suspensão bacteriana estar semelhante a turvação necessária, um swab foi submergido por alguns segundos e pressionado contra a parede do tubo para remoção do excesso de bactérias. Assim, foi feito a semeadura em placas de Petri contendo Ágar Mueller-Hinton em toda a superfície do meio. Este passo foi repetido três vezes girando a placa aproximadamente 60º a cada semeadura. Por fim, o swab foi passado na extremidade da placa para garantir o crescimento homogêneo.

Assim que o inóculo foi absorvido pelo ágar, discos de antibióticos (Tabela 2) foram distribuídos nas placas com o auxílio de uma pinça flambada. As placas foram incubadas por 24 horas a temperatura de 37ºC.

Tabela 2. Antibióticos utilizados no Teste de Sensibilidade aos Antibióticos em bacilos gram-negativos, com as respectivas concentrações.

Grupo / Classe	Antibiótico	Concentração
β-lactâmicos	Amoxicilina	10 µg
	Amoxicilina clavulanato	20/10 µg
	Ampicilina	10 µg
	Aztreonam	30 µg
	Cefepime	30 µg
	Cefotaxima	30 µg
	Cefoxitina	30 µg
	Ceftazidima	30 µg
	Ertapenem	10 µg
	Imipenem	10 µg
	Meropenem	10 µg
Quinolonas	Ciprofloxacina	5 µg
Sulfonamidas	Sulfazotrim	25 µg
Aminoglicosídeos	Gentamicina	10 µg
Tetraciclinas	Tetraciclina	30 µg
Cloranfenicol	Cloranfenicol	30 µg

Com auxílio de um paquímetro digital foi realizada a medição dos halos da inibição (Figura 8) e posterior classificação como resistentes, resistentes intermediárias e sensíveis, de acordo com as recomendações do CLSI (2017).

Figura 8. Teste de sensibilidade aos antibióticos pelo Método de Disco-Difusão em ágar Mueller-Hinton.

Foto: Zagui (2018). Laboratório de Ecotoxicologia e Parasitologia Ambiental, EERP, USP.

4.4. Detecção de Fenotípica de Bactérias Produtoras de β-Lactamases

4.4.1. Detecção Fenotípica de Bactérias Produtoras de ESBL

O teste de detecção fenotípica de β-lactamase de espectro-estendido foi realizado pelos Teste de Sinergia de Disco Duplo (DDST) e Teste de Disco Combinado (TDC) com ácido clavulânico, de acordo com as normas do *Clinical Laboratory Standards Institute* e *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (CLSI, 2017; EUCAST, 2017).

Para tal, uma suspensão da bactéria com turvação semelhante a 0,5 da Escola McFarland foi preparada e semeada em uma placa de Petri contendo ágar Muller-Hinton, assim como no TSA. Um disco de amoxicilina clavulanato (20/10µg) foi disposto no centro da placa e a 20mm, em quatro direções, um disco de aztreonam (30µg), cefepime (30µg), cefotaxima (30µg) e ceftazidima (30µg) (Figura 9). As placas foram incubadas em estufa por 24 horas, a temperatura de 37ºC. No DDST, a bactéria foi considerada como potencial produtora de ESBL quando houve aumento da zona de inibição (zona fantasma) em torno de qualquer um dos discos de antibióticos na direção do disco de amoxicilina contendo ácido clavulânico (inibidor de β-lactamases de espectro estendido).

Figura 9. Teste fenotípico positivo para detecção de β-lactamases do grupo ESBL pelo Teste de Sinergia de Disco Duplo.

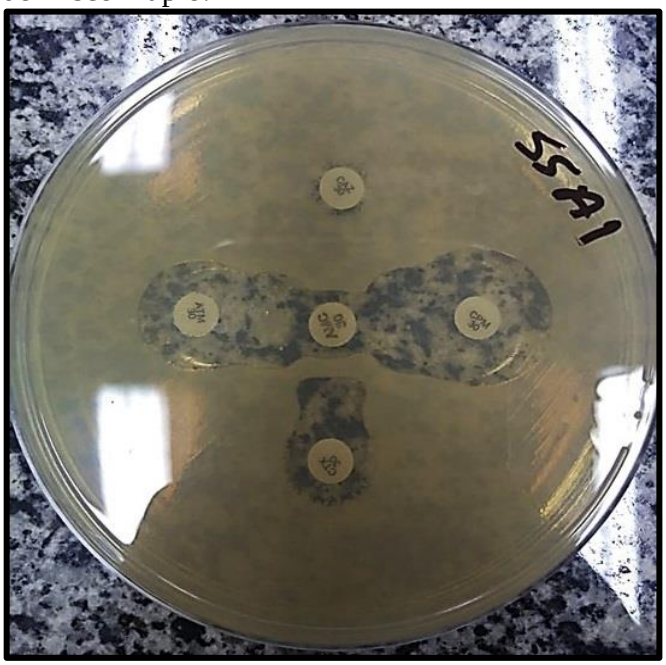


Foto: Zagui (2018). Laboratório de Ecotoxicologia e Parasitologia Ambiental, EERP, USP.

Para o teste de disco combinado com ácido clavulânico, uma suspensão da bactéria teste foi preparada, com turvação semelhante a 0,5 da Escola McFarland, e semeada em placa de Petri contendo ágar Mueller-Hinton. Um disco de cefotaxima (30µg) e ceftazidima (30µg) foi disposto na placa, assim como um disco de cefotaxima (30µg) e ceftazidima (30µg) acrescido de 10µL de ácido clavulânico (10µg/mL). As placas foram incubas a 37ºC por um período de 24 horas. A bactéria foi considerada como produtora de ESBL quando o tamanho do halo de inibição referente aos discos de cefalosporinas com ácido clavulânico foi ≥5mm em comparação ao tamanho do halo de inibição dos discos de cefalosporinas sem o ácido clavulânico (Figura 10).

Figura 10. Teste fenotípico positivo para detecção de β-lactamases do grupo ESBL pelo Teste de Disco Combinado.

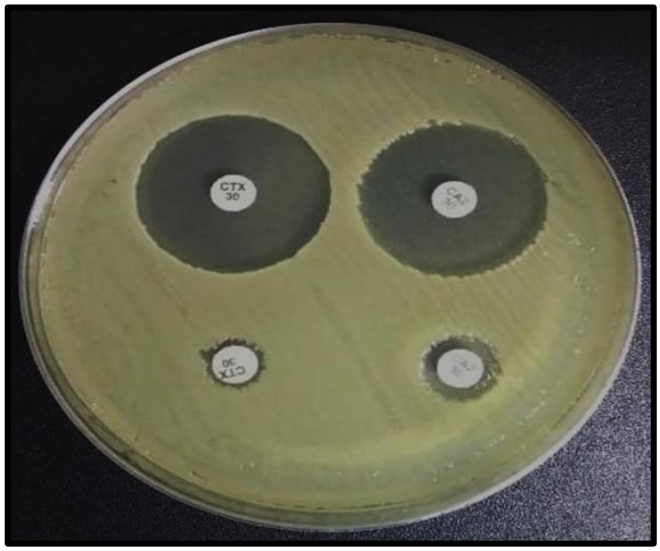


Foto: Zagui (2018). Laboratório de Ecotoxicologia e Parasitologia Ambiental, EERP, USP.

4.4.2. Detecção Fenotípica de Bactérias Produtoras Carbapenemases

As espécies bacterianas que apresentaram resistência/resistência intermediária a um ou mais carbapenêmicos foram testados para a confirmação da produção de AmpC e Carbapenemases (KPC e Metallo-β-lactamase) de acordo com a Norma Técnica nº 01/2013 da ANVISA (ANVISA, 2013).

Para tal, discos de carbapenêmicos acrescidos com inibidores de β-lactamases (ácido fenilborônico, cloxacilina e EDTA) foram utilizados. A solução de ácido fenilborônico foi preparada dissolvendo 240mg do ácido em 3mL de dimetilsulfóxido (DMSO) e 3mL em água grau reagente. A cloxacilina foi preparada dissolvendo 750mg do referido inibidor em 10mL de água grau reagente. A solução de EDTA foi preparada dissolvendo 1,86g de EDTA em 40mL

de água grau reagente, ajustando o pH para 7,5±0,1 com solução de NaOH 5M. Após a preparação, 10µL de cada inibidor foi adicionado em discos de imipenem e meropenem.

Em uma placa de Petri (15 x 150 mm) foi semeada a bactéria que apresentou resistência a pelo menos um carbapenêmico. Após a absorção do inóculo no ágar, discos de imipenem e meropenem com e sem aditivos (ácido fenilborônico 40mg/mL, cloxacilina 75mg/mL e EDTA 0,1M) foram adicionados.

Isolados com diferença de diâmetro de halo de inibição ≥ 5 mm com ácido fenilborônico e cloxacilina, para qualquer um dos carbapenêmicos, foram considerados produtores de AmpC plasmidial. Isolados com diferença de diâmetro ≥ 5 mm apenas para o ácido fenilborônico em relação ao disco sem o referido ácido, seja imipenem ou meropenem, foi considerado produtores das enzimas KPC. Isolados com diâmetro ≥ 5 mm para imipenem ou meropenem com EDTA em relação ao carbapenêmico sem o aditivo serão considerados potenciais produtores de metallo-β-lactamases (IMP, VIM, NDM).

Para as bactérias do grupo CESP (*Citrobacter freundii*, *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Providencia* spp., *Morganella morganii* e *Hafnia alvei*) foram considerados apenas os substratos imipenem e meropenem. Isolados com diferença ≥ 5 mm entre o diâmetro do halo de inibição com disco de carbapenêmico adicionado de EDTA em relação ao disco sem EDTA foram considerados potenciais produtores de metallo-β-lactamases (IMP, VIM, NDM).

O teste Blue Carba foi utilizado para confirmar a produção de Carbapenemases para os isolados que apresentaram positividade no teste com os inibidores enzimáticos, anteriormente descrito (PIRES; NOVAIS; PEIXE, 2013). Esse teste baseia-se na hidrólise do antibiótico imipenem e pela mudança do pH do meio que contém um marcador. A coloração azul-esverdeado (inalterado) é considerado como prova negativa para a produção de carbapenemase e a coloração amarela indicando positividade (Figura 11).

Figura 11. Teste Blue Carba para a confirmação fenotípica de enzimas Carbapenemases.

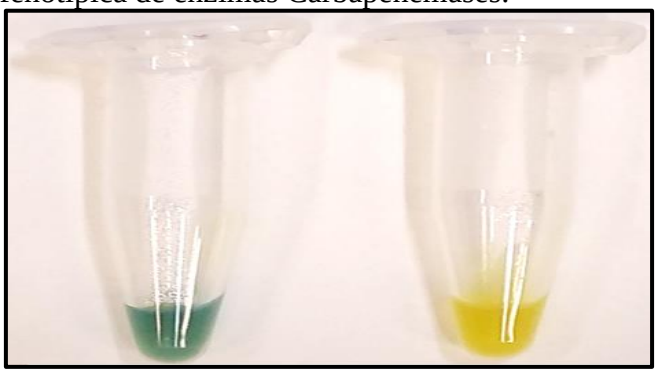


Foto: Zagui (2018). Laboratório Especial de Bacteriologia e Epidemiologia Molecular, FCFRP, USP.

4.5 Detecção Molecular de Genes de ESBL e Carbapenemases

As bactérias que apresentaram positividade para os testes de detecção fenotípica de β-lactamases foram conservadas a -20ºC em Caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) acrescido de glicerol 20% (v/v), para posterior análise molecular. A detecção molecular dos genes codificadores das enzimas β-lactamases foi realizado pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). As referidas análises moleculares foram realizadas no Laboratório Especial de Bacteriologia e Epidemiologia Molecular da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Para a extração de DNA foi feita uma suspensão turva de bactérias em 300µL de água deionizada em microtubo. Os tubos contendo a suspensão bacteriana foram colocados em água fervente por 15 minutos e, após o período, centrifugados por 15 minutos a 15.000 rpm. Posteriormente, 200µL do sobrenadante foi transferido para um microtubo, seguido de congelamento a -20ºC até o momento das análises. O espectrofotômetro NanoDrop2000 (Thermo Scientific) foi utilizado para avaliar a quantidade (ng/µL) e pureza dos DNAs extraídos.

Para a PCR foi utilizado reagentes para o volume final de reação de 23µL, excetuando para PCR Multiplex com cinco pares de *primers*, onde o volume final de reação foi de 25µL. Os reagentes utilizados estão descritos na tabela a seguir.

Tabela 3. Reagente utilizados na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para a análise de genes de resistência aos antibióticos.

Reagentes	Volume	Concentração final
Água deionizada	10,375 µL	-
5X Green GoTaq® Reaction Buffer (5X)	5 µL	1X
$MgCl^2$ (25 mM)	2,5 µL	2,5 mM
Mistura dos 4 nucleotídeos – dNTP	2 µL	2,5 nmol
Primer forward (16 pmol/µL)	1,5 µL	24 pmol
Primer reverse (16 pmol/µL)	1,5 µL	24 pmol
GoTaq® DNA Polymerase (5 U/µL)	0,125 µL	0,625 U/µL

O termociclador utilizado para a amplificação dos genes foi o modelo Mastercycler® ep (Eppendorf). Inicialmente o DNA foi desnaturado por aquecimento a 95ºC por 5 minutos. Após a desnaturação, o DNA foi submetido a 30 ciclos que compõe de desnaturação do DNA (95ºC, por 1 minuto), *annealing* dos *primers* (temperatura a depender de cada *primer*, por 1 minuto) e extensão (72ºC, por 1 minuto). Após os 30 ciclos, o material foi submetido a extensão final por 10 minutos a 72ºC. Os genes de resistência bla_{NDM}, bla_{VIM}, bla_{IMP}, bla_{KPC}, bla_{OXA-48}, $bla_{CTX-M\ (-1,\ -2,\ -8,\ -9,\ -25)}$ foram pesquisados por PCR Multiplex. A separação dos fragmentos

amplificados foi feita por eletroforese em gel de agarose (1,5%) e visualizados através do fotodocumentador AlphaImager (Alpha Innotech), sob luz UV (Figura 12)

Os genes codificadores de β-lactamases, bem como a sequência de nucleotídeos, tamanho do fragmento amplificado e temperatura de *annealing* estão apresentados na Tabela 4 (página 52).

Figura 12. Eletroforese em gel de agarose para separação dos fragmentos amplificados de β-lactamases por PCR.

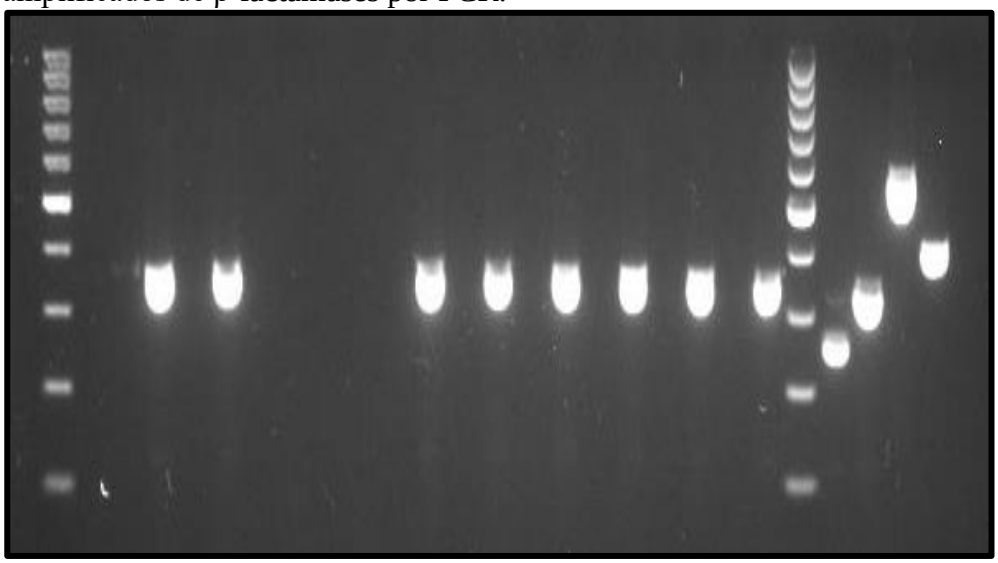


Foto: Zagui (2018). Laboratório Especial de Bacteriologia e Epidemiologia Molecular, FCFRP, USP.

4.6. Análise de Dados

A determinação do fenótipo multidroga resistente (MDR) seguiu os critérios de Magiorakos et al. (2012), onde as bactérias são classificadas como MDR se apresentarem resistência a pelo menos um antibiótico de três classes distintas.

As análises estatísticas foram realizadas no software SPSS 20.0, com interpretação de acordo com as frequências e porcentagens apresentadas. A comparação da resistência aos antibióticos entre os diferentes pontos amostrais foi realizada pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis, seguido do teste *post-hoc* de Dunn quando rejeitou-se H_0. A Correlação Linear de Pearson foi utilizada para a comparação entre os valores de halos de inibição com finalidade de verificar o padrão comum de resistência ou sensibilidade aos antibióticos e para correlação entre os genes de resistência aos antibióticos, considerando $r > 0,7$ e $r < -0,7$ como correlação forte, $r > 0,9$ e $r < -0,9$ correlação muito forte e $r = 1/-1$ como correlação perfeita. O nível de significância adotado foi de $p<0,05$.

Tabela 4. Genes amplificados na PCR, *primers* utilizados, sequência de nucleotídeos e temperatura de annealing.

Gene	*Primers**	Sequência de nucleotídeos (5' – 3')	Tamanho do gene amplificado (pb)	T (ºC) *annealing*	Referência
bla$_{NDM}$	*bla*$_{NDM}$ f bla$_{NDM}$ r	ACT TGG CCT TGC TGT CCT T CAT TAG CCG CTG CAT TGA T	603	57ºC	BOGAERTS et al., 2013
bla$_{VIM}$	*bla*$_{VIM}$ f *bla*$_{VIM}$ r	TGT CCG TGA TGG TGA TGA GT ATT CAG CCA GAT CGG CAT C	437	57ºC	BOGAERTS et al., 2013
bla$_{IMP}$	*bla*$_{IMP}$ f *bla*$_{IMP}$ r	ACA YGG YTT RGT DGT KCT TG GGT TTA AYA AAR CAA CCA CC	387	57ºC	BOGAERTS et al., 2013
bla$_{KPC}$	*bla*$_{KPC}$ f *bla*$_{KPC}$ r	TCG CCG TCT AGT TCT GCT GTC TTG ACA GCT CCG CCA CCG TCA T	353	57ºC	BOGAERTS et al., 2013
bla$_{OXA}$	*bla*$_{OXA-48}$ f *bla*$_{OXA-48}$ r	ATG CGT GTA TTA GCC TTA TCG CAT CCT TAA CCA CGC CCA AAT C	265	57ºC	BOGAERTS et al., 2013
bla$_{CTX-M}$	*bla*$_{CTX-M-1}$ f *bla*$_{CTX-M-1}$ r	AAA AAT CAC TGC GCC AGT TC AGC TTA TTC ATC GCC ACG TT	415	52ºC	WOODFORD; FAGAN; ELLINGTON, 2006
bla$_{CTX-M}$	*bla*$_{CTX-M-2}$ f *bla*$_{CTX-M-2}$ r	CGA CGC TAC CCC TGC TAT T CCA GCG TCA GAT TTT TCA GG	552	52ºC	WOODFORD; FAGAN; ELLINGTON, 2006
bla$_{CTX-M}$	*bla*$_{CTX-M-8}$ f *bla*$_{CTX-M-8}$ r	TCG CGT TAA GCG GAT GAT GC AAC CCA CGA TGT GGG TAG C	666	52ºC	WOODFORD; FAGAN; ELLINGTON, 2006
bla$_{CTX-M}$	*bla*$_{CTX-M-9}$ f *bla*$_{CTX-M-9}$ r	CAA AGA GAG TGC AAC GGA TG ATT GGA AAG CGT TCA TCA CC	205	52ºC	WOODFORD; FAGAN; ELLINGTON, 2006
bla$_{CTX-M}$	*bla*$_{CTX-M-25}$ f *bla*$_{CTX-M-25}$ r	GCA CGA TGA CAT TCG GG AAC CCA CGA TGT GGG TAG C	327	52ºC	WOODFORD; FAGAN; ELLINGTON, 2006
bla$_{SHV}$	*bla*$_{SHV}$ f *bla*$_{SHV}$ r	ATG CGT TAT ATT CGC CTG TG GTT AGC GTT GCC AGT GCT CG	860	53ºC	SPANU et al. 2002
bla$_{TEM}$	*bla*$_{TEM}$ f *bla*$_{TEM}$ r	ATG AGT ATT CAA CAT TTC CGT G TTA CCA ATG CTT AAT CAG TGA G	860	51ºC	SPANU et al. 2002

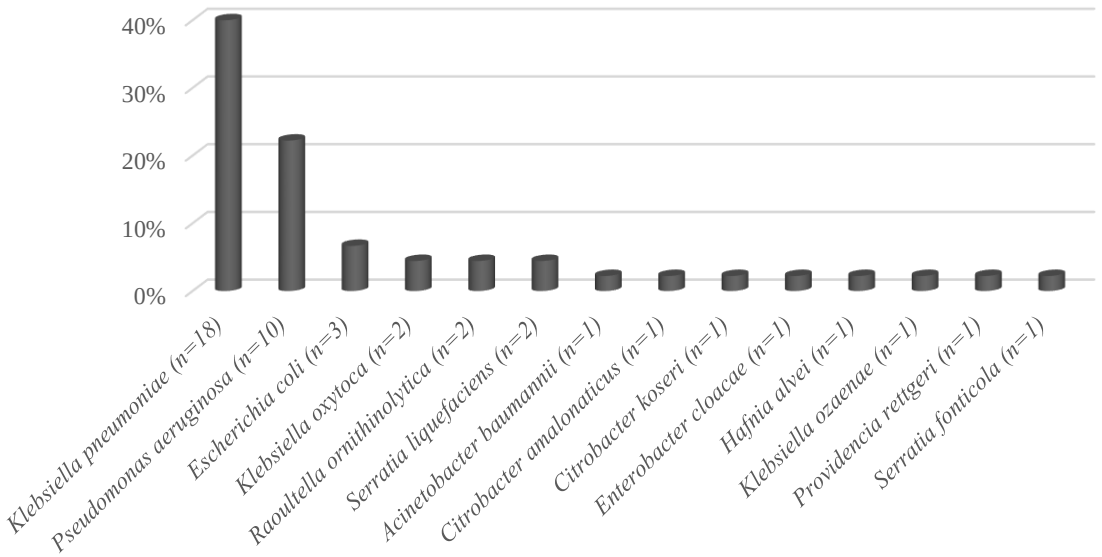
**Primers* degenerados: D = A, G ou T; R = A ou G; Y = C ou T; K = G ou T.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

No total, dos cinco pontos de amostragem, 45 bactérias foram isoladas de 14 espécies. Na Figura 13 é apresentada a distribuição da frequência de isolamentos de acordo com as espécies.

Figura 13. Frequência de bacilos gram-negativos (n=45) isoladas de esgoto hospitalar e urbano em Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil.



Como observado na Figura 13, as bactérias com maior frequência de isolamento foram *Klebsiella pneumoniae* (40,0%), seguido de *Pseudomonas aeruginosa* (22,0%). Destaca-se o isolamento da bactéria *Raoultella ornithinolytica*, anteriormente denominada de *Klebsiella ornithinolytica*, devido a emergência dessa bactéria como patógeno humano.

Na Tabela 5 estão apresentados os resultados da pesquisa de genes de resistência aos antibióticos, bem como o perfil de resistência aos antimicrobianos e fenótipo MDR.

Tabela 5. Perfil de resistência aos antibióticos e detecção de genes de resistência a antibióticos de bactérias isoladas de esgoto hospitalar e urbano em Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil.

Ponto de amostragem	Isolado	Espécies	Perfil de resistência aos antibióticos	Fenótipo de resistência	ESBL		Carbapenemases		*bla* genes
					DDST	TCD	TCD (Anvisa)	Blue Carba	
Esgoto dos ambulatórios	EA1	*P. aeruginosa*	AMO, AMC, AMP, ATM, CTX, CFO, CLO, ERT, STX, TET	-	+	-	-	-	-
	EA2	*P. aeruginosa*	AMO, AMC, AMP, CTX, CFO, CLO, ERT, STX, TET	-	-	-	-	-	-
	EA3	*K. oxytoca*	AMO, AMC, AMP, CAZ, STX, TET	MDR	+	+	-	-	-
	EA4	*P. aeruginosa*	AMO, AMC, AMP, CTX, CFO	-	-	-	+	-	-
	EA5	*K. oxytoca*	AMO, AMP, ATM, CAZ	-	+	+	-	-	-
	EA6	*E. coli*	AMO, AMP, CTX	-	+	+	-	-	CTX-M-8
	EA7	*R. ornithinolytica*	AMP, AMP, CAZ	-	-	-	-	-	-
	EA8	*K. ozaenae*	AMO, AMP	-	-	-	-	-	-
	EA9	*K. pneumoniae*	AMO, AMP	-	-	-	-	-	-
	EA10	*E. coli*	TET	-	-	-	-	-	-
	EA11	*C. koseri*	-	-	-	-	-	-	-
Esgoto das enfermarias	EE1	*K. pneumoniae*	AMO, AMC, AMP, ATM, CPM, CTX, CFO, CIP, ERT, IPM, STX	MDR	+	+	+	+	KPC, CTX-M-8, SHV, TEM
	EE2	*S. liquefaciens*	AMO, AMC, AMP, ATM, CPM, CTX, CFO, CAZ, ERT, IPM, MER	MDR	-	-	+	+	KPC
	EE3	*E. coli*	AMO, AMC, AMP, ATM, CPM, CTX, CFO, CAZ, CLO, STX, TET	MDR	+	-	-	-	-
	EE4	*H. alvei*	AMO, AMC, AMP, ATM, CTX, CFO, CAZ, CLO, GEN, STX	MDR	+	+	-	-	CTX-M-1, SHV, TEM
	EE5	*K. pneumoniae*	AMO, AMC, AMP, ATM, CPM, CTX, CAZ, CIP, CLO, STX	MDR	+	+	-	-	CTX-M-1, SHV, TEM
	EE6	*K. pneumoniae*	AMO, AMC, AMP, ATM, CFO, ERT, IPM, MER, STX	MDR	-	-	-	-	-
	EE7	*P. aeruginosa*	AMO, AMC, AMP, CTX, CFO, CLO, ERT, STX, TET	-	-	-	+	-	-
	EE8	*P. aeruginosa*	AMO, AMC, AMP, CTX, CFO, CLO, ERT, STX	-	-	-	+	-	-
	EE9	*K. pneumoniae*	AMO, AMC, AMP, ATM, CTX, GEN, STX	MDR	-	-	-	-	SHV, TEM
	EE10	*K. pneumoniae*	AMO, AMC, AMP	-	-	-	+	+	KPC
	EE11	*K. pneumoniae*	AMO, AMP	-	-	-	-	-	-
	EE12	*S. fonticola*	AMO, AMP	-	-	-	-	-	-
	EE13	*P. aeruginosa*	-	-	-	-	-	-	-
Esgoto da junção dos efluentes	EJ1	*K. pneumoniae*	AMO, AMC, AMP, ATM, CPM, CTX, CFO, CAZ, ERT, IPM, MER, STX	MDR	+	+	+	+	KPC, TEM
	EJ2	*K. pneumoniae*	AMO, AMC, AMP, ATM, CPM, CTX, CFO, CAZ, ERT, IPM, MER	MDR	-	-	+	+	KPC, SHV
	EJ3	*K. pneumoniae*	AMO, AMC, AMP, ATM, CPM, CTX, CFO, CAZ, STX, TET	MDR	+	+	-	-	TEM
	EJ4	*K. pneumoniae*	AMO, AMC, AMP, ATM, CPM, CTX, CAZ, ERT, IPM, MER	MDR	-	-	+	+	KPC
	EJ5	*P. aeruginosa*	AMO, AMC, AMP, ATM, CTX, CFO, CLO, ERT, STX	-	-	-	-	-	-
	EJ6	*P. aeruginosa*	AMO, AMC, AMP, CTX, CFO, CLO, ERT, STX, TET	-	-	-	+	+	KPC
	EJ7	*K. pneumoniae*	AMO, AMC, AMP, ATM, CPM, CTX, CFO, STX	MDR	-	-	-	-	TEM
	EJ8	*K. pneumoniae*	AMO, AMC, AMP, ATM, CTX, ERT	MDR	-	-	+	+	KPC
	EJ9	*K. pneumoniae*	ATM, CPM, CTX, CFO	MDR	-	-	-	-	TEM
	EJ10	*P. aeruginosa*	ATM	-	-	-	-	-	-
Esgoto bruto ETE	EB1	*R. ornithinolytica*	AMO, AMC, AMP, CFO	-	-	-	-	-	-
	EB2	*S. liquefaciens*	AMO, AMC, AMP, CFO	-	-	-	-	-	-
	EB3	*K. pneumoniae*	AMO, AMP	-	-	-	-	-	-
	EB4	*K. pneumoniae*	AMO, AMP	-	-	-	-	-	-
	EB5	*K. pneumoniae*	AMO, AMP	-	-	-	-	-	-
	EB6	*C. amalonaticus*	AMO, AMP	-	-	-	-	-	-
Esgoto tratado ETE	ET1	*E. cloacae*	AMO, AMC, AMP, ATM, CTX, CFO, CAZ	-	-	-	-	-	SHV
	ET2	*P. aeruginosa*	AMO, AMC, AMP, ATM, CTX, CLO, ERT, STX	-	-	-	-	-	-
	ET3	*P. rettgeri*	AMO, AMC, TET	-	-	-	-	-	-
	ET4	*K. pneumoniae*	AMO, AMP	-	-	-	-	-	-
	ET5	*A. baumannii*	-	-	-	-	-	-	-

[+]**Resistência intrínseca.** ***C. koseri*:** ampicilina. ***E. cloacae*:** amoxicilina, amoxicilina clavulanato, cefoxitina. ***H. alvei*:** ampicilina, amoxicilina clavulanato, cefoxitina. ***K. pneumoniae*:** ampicilina. ***P. aeruginosa*:** amoxicilina, amoxicilina clavulanato, ampicilina, cefotaxima, cloranfenicol, ertapenem, sulfazotrim, tetraciclina.

Avaliando os resultados do teste de susceptibilidade aos antibióticos, 42/45 bactérias apresentaram resistência a pelo menos um antibiótico. Como esperado, altas porcentagens de resistências a amoxicilina (89%) e ampicilina (84%) foram verificadas. Às cefalosporinas, 51% foram resistentes a cefotaxima, 44% a cefoxitina, 27% a ceftazidima e 22% a cefepime. Ao grupo de antibióticos carbapenêmicos, 31% das bactérias foram resistentes ao ertapenem e 13% e 11% ao imipenem e meropenem, respectivamente. Fechando o grupo de antibióticos β-lactâmicos, 60% foram resistentes a amoxicilina clavulanato e 44% ao aztreonam. As porcentagens de resistência para o grupo de antibióticos não β-lactâmicos compreende de 38% a sulfazotrim, 22% a cloranfenicol, 20% a tetraciclina, e 4% para ciprofloxacina e gentamicina.

A Tabela 6 apresenta os resultados do teste de Correlação Linear de Pearson (r), estatisticamente significante ($p<0,05$), onde foram comparados os valores dos halos de inibição de todas as bactérias frente entre os antibióticos.

Tabela 6. Correlação entre os halos de inibição frente aos antibióticos testados.

Antibióticos	**r (Pearson)**	**IC 95%**	***p*-valor**
Amoxicilina e ampicilina	0,9518	[0,91;0,97]	**< 0,0001**
Aztreonam e cefepime	0,8928	[0,81;0,94]	**< 0,0001**
Aztreonam e cefotaxima	0,8675	[0,77;0,93]	**< 0,0001**
Aztreonam e ceftazidima	0,7117	[0,53;0,83]	**< 0,0001**
Cefepime e cefotaxima	0,8948	[0,82;0,94]	**< 0,0001**
Cefepime e ceftazidima	0,7127	[0,53;0,83]	**< 0,0001**
Cefotaxima e cefoxitina	0,7082	[0,52;0,83]	**< 0,0001**
Cefotaxima e ceftazidima	0,7406	[0,57;0,85]	**< 0,0001**
Ertapenem e meropenem	0,8371	[0,72;0,91]	**< 0,0001**
Imipenem e meropenem	0,7634	[0,61;0,86]	**< 0,0001**

Analisando tais resultados, pode-se constatar semelhanças entre os halos de inibição para alguns antibióticos (Tabela 6). Como todas as correlações foram positivas infere-se que o perfil de resistência ou sensibilidade aos antibióticos correlacionados são semelhantes, de acordo com os valores dos halos de inibição. Ou seja, ao ser verificado ampla resistência a amoxicilina, espera-se também ampla resistência a ampicilina. Tal fato corrobora com os valores encontrados de resistência a amoxicilina (89%) e a ampicilina (84%).

Na Tabela 7 é apresentada a distribuição de resistência aos antibióticos por ponto de amostragem.

Tabela 7. Distribuição da resistência aos antibióticos de bacilos gram-negativos isoladas por ponto de amostragem.

Antibióticos*	Pontos de coleta**					*p*-valor
	EA-HGP	EE-HGP	EJ-HGP	EB-ETE	ET-ETE	
AMO	82%	92%	80%	100%	80%	0,7292
AMC	36%	77%	80%	33%	60%	0,1167
AMP	82%	92%	80%	100%	60%	0,3918
ATM	18%	54%	90%	0%	40%	**0,0025**
CPM	0%	31%	60%	0%	0%	**0,0052**
CTX	36%	62%	90%	0%	40%	**0,0043**
CFO	27%	54%	70%	33%	20%	0,3385
CAZ	27%	31%	40%	0%	20%	0,5177
CIP	0%	15%	0%	0%	0%	0,2835
CLO	18%	38%	20%	0%	20%	0,4396
ERT	18%	38%	60%	0%	20%	0,0954
GEN	0%	15%	0%	0%	0%	0,2835
IMP	0%	23%	30%	0%	0%	0,1524
MER	0%	15%	30%	0%	0%	0,1578
STX	27%	62%	50%	0%	20%	0,0780
TET	36%	15%	20%	0%	20%	0,3693

*__AMO:__ amoxicilina. **AMC:** amoxicilina clavulanato. **AMP:** ampicilina. **ATM:** aztreonam. **CPM:** cefepime. **CTX:** cefotaxima. **CFO:** cefoxitina. **CAZ:** ceftazidima. **CIP:** ciprofloxacina. **ERT:** ertapenem. **GEN:** gentamicina. **IPM:** imipenem. **MPM:** meropenem. **SUT:** sulfazotrim. **TET:** tetraciclina.
****EA-HGP:** Esgoto dos ambulatórios. **EE-HGP:** Esgoto das enfermarias. **EJ-HGP:** Esgoto da junção dos efluentes. **EB-ETE:** Esgoto bruto da estação de tratamento de esgoto urbano. **ET-ETE:** Esgoto tratado da estação de tratamento de esgoto urbano.

De acordo com os pontos de amostragem, constatou-se que as bactérias isoladas do esgoto hospitalar apresentaram perfil de resistência mais amplo em comparação com as bactérias do esgoto coletado na estação de tratamento de esgoto urbano. Ainda, entre os pontos de amostragem no hospital, as bactérias do esgoto da enfermaria e da junção dos efluentes apresentaram perfil mais amplo de resistência em comparação com os isolados oriundos do esgoto dos ambulatórios.

Avaliando os resultados presentes na Tabela 7, verificou-se, através dos testes de Kruskal-Wallis, diferença estatisticamente significante ($p<0,05$) na comparação entre as porcentagens de resistência a aztreonam, cefepime e a cefotaxima nos diferentes pontos de amostragem. Aplicando o teste *post-hoc* de Dunn foi observado que a resistência para os antibióticos em questão foi apresentada por mais bactérias isoladas da caixa de inspeção que intercepta os efluentes das enfermarias e de todas as alas do hospital (junção) em comparação com os isolados bacterianos dos demais pontos de amostragem.

No total, 33,3% (15/45) dos isolados apresentaram fenótipo de resistência MDR, com maior frequência em *Klebsiella pneumoniae*. Na Tabela 8 é apresentada a distribuição em porcentagem do fenótipo MDR nos diferentes pontos amostrais.

Tabela 8. Porcentagem do fenótipo multidroga resistentes (MDR) de bactérias isoladas em esgoto hospitalar e urbano em Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil.

Fenótipo de resistência	**Pontos de amostragem***					***p*-valor**
	EA-HGP	**EE-HGP**	**EJ-HGP**	**EB-ETE**	**ET-ETE**	
MDR	9,1%	53,8%	70,0%	0,0%	0,0%	**0,0024**

***EA-HGP:** Esgoto dos ambulatórios. **EE-HGP:** Esgoto das enfermarias. **EJ-HGP:** Esgoto da junção dos efluentes. **EB-ETE:** Esgoto bruto da estação de tratamento de esgoto urbano. **ET-ETE:** Esgoto tratado da estação de tratamento de esgoto urbano.

Pode-se observar que o fenótipo MDR esteve em maior frequência em bactérias dos esgotos oriundos das enfermarias e da junção dos efluentes, com diferença estatisticamente significante (p = 0,0024) entre os pontos, demonstrando maior prevalência de bactérias com este fenótipo no ponto da junção dos efluentes.

Das 45 bactérias isoladas, 10 apresentaram positividade no teste de sinergia de disco duplo para a detecção fenotípica de bactérias produtoras de ESBL. No entanto, 8 isolados apresentaram positividade para o teste de disco combinado com ácido clavulânico, os quais tiveram os genes pesquisados por PCR. Quanto ao teste de detecção fenotípica de carbapenemase, 11 bactérias apresentaram positividade para a produção de carbapenemases do tipo KPC. Destas, 8 bactérias apresentaram positividade também para o teste Blue Carba, sendo então submetidas a PCR para a detecção dos genes de resistência.

Genes de resistência aos antibióticos foram encontrados em 35,6% (16/45) dos isolados, sendo mais prevalentes nas bactérias oriundas dos esgotos das enfermarias e da junção dos efluentes. O gene codificador de ESBL $bla_{\text{CTX-M}}$ foi encontrado em 4 das 8 bactérias positivas no teste de disco combinado com ácido clavulânico, sendo dois isolados positivos para $bla_{\text{CTX-M-1}}$ (*Hafnia alvei* e *Klebsiella pneumoniae*) e dois positivos para $bla_{\text{CTX-M-8}}$ (*Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*), correspondendo a 8,9% (4/45). O gene de resistência aos antibióticos bla_{KPC} foi detectado nos 8 isolados positivos no teste Blue Carba, sendo 6 em *Klebsiella pneumoniae*, 1 em *Pseudomonas aeruginosa* e 1 em *Serratia liquefaciens*, correspondendo a 17,8% do total de isolados (Tabela 5).

Nas bactérias que apresentaram positividade no teste de disco combinado para detecção de ESBL, mas não apresentaram positividade para *bla*$_{CTX-M}$, foi pesquisado os genes *bla*$_{SHV}$ e *bla*$_{TEM}$ devido a variante de espectro estendido, assim como em bactérias que apresentaram os genes *bla*$_{CTX-M}$ e também nas que apresentaram resistência à cefotaxima e/ou ceftazidima, mesmo sendo negativas para os testes fenotípicos. Sendo assim 17 isolados foram submetidos a pesquisa dos genes *bla*$_{SHV}$ e *bla*$_{TEM}$. Seis isolados (13,3%) apresentaram positividade para *bla*$_{SHV}$ (4 *Klebsiella pneumoniae*, 1 *Enterobacter cloacae* e 1 *Hafnia alvei*) e 8 (17,8%) positivos para *bla*$_{TEM}$ (7 *Klebsiella pneumoniae* e *1 Hafnia alvei*). Destaca-se que dois isolados de *Klebsiella oxytoca*, positivos para ambos os testes de triagem de ESBL, apresentaram resultados negativos para a pesquisa dos genes *bla*$_{CTX-M, SHV, TEM}$.

A coexistência de β-lactamases foi verificada em 6 isolados, sendo 5 em *Klebsiella pneumoniae* e 1 em *Hafnia alvei* (Tabela 5). Destaca-se um isolado de *Klebsiella pneumoniae* com todos os genes de β-lactamases pesquisados *bla*$_{KPC}$, *bla*$_{CTX-M-8}$, *bla*$_{SHV}$ e *bla*$_{TEM}$, com resistência a 11 dos 16 antibióticos testados. Por meio da Correlação Linear de Pearson verificou-se correlação forte entre a coexistência dos genes *bla*$_{SHV}$ e *bla*$_{TEM}$ (r = 0,8015, IC95% [0,66;0,89], p<0,0001).

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Embora a resistência microbiana seja um fenômeno de ocorrência natural, atualmente no Brasil, microrganismos resistentes a antibióticos infectam aproximadamente 2 milhões de pessoas e matam 23 mil anualmente, revelando-se como um grave problema de saúde pública devido a alta morbidade e mortalidade, especialmente em instituições de saúde, e a escassez de novas drogas antimicrobianas (BBC, 2017; CDC, 2017; RÖDEROVÁ et al., 2016; QUADRI et al., 2015).

Diversas espécies bacterianas, especialmente os bacilos gram-negativos, são considerados ubíquos por serem encontrados em diversos ambientes. No esgoto, grande parte da composição microbiana é encontrada no trato gastrointestinal de humanos e/ou animais, a depender de sua origem (ABDULHAQ; BASODE, 2015). Nesse sentido, o presente estudo identificou 45 bactérias de 14 espécies comumente encontradas na biota humana (Figura 12), mas que também são potenciais causadores de doenças e que podem caracterizar o perfil de infecções de pacientes atendidos no hospital, condizendo com os achados de outros estudos (BUELOW et al., 2018; HALLER et al., 2018; WANG; WANG; YANG, 2018).

O presente estudo verificou alta frequência de isolamento de *Klebsiella pneumoniae* (40%) e *Pseudomonas aeruginosa* (22%), ambos microrganismos causadores de infecções capazes de levar pacientes à óbito, classificados como prioridade 1 (crítica) pela *World Health Organization* (WHO, 2017). A bactéria *Escherichia coli* foi a terceira mais frequentemente isolada e embora esteja presente na microbiota intestinal é considerada como um dos principais agentes causadores de infecções entéricas e urinárias (CHERVET et al., 2018). Ademais, a veracidade da existência da mesma bactéria causadora de infecção em pacientes e em esgoto foi evidenciada por Röderová et al. (2016) ao identificar dois isolados geneticamente idênticos de *Klebsiella pneumoniae*, um de cateter urinário de um paciente internado no hospital e outro isolado no esgoto da cidade. Tal achado fundamenta que as bactérias identificadas no esgoto hospitalar no presente estudo podem se originar de infecções e se disseminar através das galerias de coleta municipal até a ETE da cidade.

Ainda sobre a identificação bacteriana, destaca-se o isolamento da bactéria *Raoultella ornithinolytica* pela sua emergência como patógeno humano. Na literatura, estudos já apontam a capacidade dessa bactéria de manifestar diferentes tipos de manifestações clínicas como bacteremia, febre entérica, infecção articular protética e infecção urinária (SENG et al., 2016; YAMAKAWA et al., 2016; NAKASONE et al., 2015; TSENG et al., 2014; MORAIS et al., 2009). Ademais, em 2015, foi registrado pela primeira vez a coprodução de enzimas β-lactamases (bla_{KPC-2} e bla_{IMP-4}) nessa espécie, a primeira de seu gênero, reforçando a rápida

transmissão dos genes de enzimas entre as espécies da família *Enterobacteriaceae* (ZHENG et al., 2015). Embora os isolados identificados não apresentaram amplo perfil de resistência, principalmente aos antibióticos considerados mais potentes, como aztreonam, cefepime e aos carbapenêmicos, um dos isolados apresentou resistência a ceftazidima (cefalosporina de terceira geração), chamando atenção pela emergência dessa bactéria como patógeno humano e pela transmissão de elementos de resistência entre a família *Enterobacteriaceae*, como já verificado na literatura.

Das 45 bactérias isoladas, 93,3% apresentaram resistência a pelo menos um antibiótico e 33,3% apresentaram o fenótipo MDR (Tabela 5). As altas porcentagens de resistência a amoxicilina (89%) e ampicilina (84%) eram esperadas devido à resistência intrínseca presente em várias bactérias como *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp., *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, entre outras (CLSI, 2017). Expressivas porcentagens também foram verificadas para os antibióticos amoxicilina clavulanato (60%), cefotaxima (51%), aztreonam (44%) e cefoxitina (44%). Menores porcentagens de resistência foram verificadas para os carbapenêmicos imipenem (13%) e meropenem (11%), ciprofloxacina (4%) e gentamicina (4%). Rabbani, Howlader e Kabir (2017) avaliaram o perfil de resistência de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* de esgoto hospitalar em Bangladesh e verificaram porcentagens que se assemelham para ampicilina, cefotaxima, cloranfenicol e imipenem, e algumas que divergiram, como para ciprofloxacina, ceftazidima e gentamicina. As diferenças no perfil de resistência podem representar diferenças nas espécies analisadas, bem como do padrão de antibióticoterapia empregado em diferentes países.

Na Tabela 6, foi verificada correlação estatisticamente significante entre os valores dos halos de inibição para alguns antibióticos através da Correlação Linear de Pearson, o que pode inferir que as bactérias resistentes a amoxicilina, por exemplo, sejam também resistente a ampicilina, como verificado no teste estatístico ($r = 0,9518$, IC95% [0,91;0,97], $p < 0,0001$). Essa correlação pode-se explicar por se tratar de antibióticos que são facilmente degrados por β-lactamases de espectro restrito ou efluídas por bombas de efluxo. De acordo com os resultados espera-se também que isolados resistentes a cefotaxima apresentem resistência a ceftazidima, fato este explicável por tais antibióticos serem cefalosporinas de terceira geração de espectro de ação estendido, e, portanto, capazes de serem hidrolisadas por enzimas ESBLs. O mesmo se aplica entre a cefepime e ao aztreonam, bem como entre os carbapenêmicos (Tabela 6). Sabe-se que os resultados encontrados têm que ser avaliados cautelosamente por se tratar de bactérias de diferentes espécies, com perfis fenotípicos e genéticos distintos.

Ao avaliar os pontos de amostragem, foi verificado que as bactérias isoladas do esgoto hospitalar apresentaram um perfil de resistência mais amplo em relação as bactérias isoladas do esgoto da ETE (Tabela 5 e 7). Tais diferenças foram comprovadas estatisticamente pelo teste de Kruskal-Wallis que revelou diferença significante na resistência ao aztreonam (p = 0,0025), cefepime (p = 0,0052) e cefotaxima (p = 0,0043) em bactérias isoladas no esgoto da junção e das enfermarias. Devido ao seu espectro de ação e potencialidade do efeito bactericida, tais antibióticos são mais frequentemente utilizados e controlados nos hospitais, diferentemente de outros antibióticos, como amoxicilina e ampicilina, que são amplamente empregados para o tratamento de infecções no âmbito domiciliar, o que pode explicar a expressiva resistência das bactérias isoladas no esgoto hospitalar em comparação com os demais pontos de amostragem.

Ainda considerando por ponto de amostragem, 33,3% das bactérias apresentaram o fenótipo MDR, exclusivamente no esgoto hospitalar (Tabela 5). Um estudo em Curitiba, Paraná – Brasil, também identificou o fenótipo MDR com maior prevalência em bactérias de origem do esgoto hospitalar com relação às isoladas no esgoto da ETE (CONTE et al., 2017). Ao contrário do presente estudo e seguindo os mesmos critérios classificatórios de bactérias MDR, em Portugal foram verificadas porcentagens superiores do fenótipo MDR em bactérias oriundas de esgoto hospitalar (91,7%), do esgoto bruto (91,7%) e tratado (72,4%) da ETE (VAZ-MOREIRA et al., 2016).

As bactérias do esgoto da enfermaria e da junção dos efluentes apresentaram maior prevalência do fenótipo MDR (p = 0,0024) em relação as bactérias dos demais pontos amostrais (Tabela 5 e 8). Das 13 bactérias isoladas no esgoto das enfermarias, 7 apresentaram o fenótipo MDR o que pode também ser justificado pelo tempo de internação dos pacientes. O período de internação médio no hospital onde foi realizado o estudo é de aproximadamente 7 dias (HCFMRP, 2017). Sabe-se que o tempo de internação, bem como a administração de antibióticos nos pacientes, podem levar ao aparecimento de bactérias MDR e subsequentemente possibilitar a presença dessas no esgoto das enfermarias. Já o fato de apresentarem maior prevalência em bactérias da junção dos efluentes pode ser o resultado da rápida transferência horizontal dos genes de resistência e da aquisição de elementos genéticos móveis observadas em bacilos gram-negativos, bem como na permanência dessas bactérias no esgoto durante toda a extensa galeria de coleta na presença de antibióticos, metais pesados e desinfetantes como substâncias selecionadores de bactérias multirresistentes. Sabe-se que as bactérias se tornam resistentes não somente pelo uso de antibióticos na clínica, mas também pela presença desses nas águas residuais, tornando-as em um ambiente fortemente seletivo, especialmente no ambiente hospitalar (PROIA et al., 2018; SZEKERES et al., 2017; AMADOR et al., 2015).

Proia et al. (2018), avaliaram as concentrações de antibióticos em esgoto hospitalar e de duas ETEs na Bulgária. No estudo encontraram concentrações de amoxicilina que variaram de 29,2 µg L^{-1} a 116,4 µg L^{-1}, de sulfazotrim que variaram de <LD (limite de detecção) a 66,4 µg L^{-1}, com maior concentração no esgoto hospitalar, ácido nalidíxico variando de <LD a 0,007 µg L^{-1} e tetraciclina variando de 0,22 µg L^{-1} a 1,96 µg L^{-1}. Em um estudo realizado na Romênia, com esgoto de três hospitais, foram verificadas concentrações de antibióticos variando entre 3,67 a 53,05 µg L^{-1}. Os antibióticos ampicilina, ceftazidima, imipenem e trimetropim foram os de maior abundância totalizando os achados entre os três hospitais e em menores concentrações foram identificados cefepime, tetraciclina, gentamicina e sulfametoxazol. Ademais, diversos genes de resistência a β-lactâmicos (bla_{VIM}, bla_{SHV}), tetraciclina (*tet*A, *tet*B, *tet*C, *tet*O, *tet*W), aminoglicosídeos (*aac*C2), cloranfenicol (*cat*A1, *flo*R) e sulfonamidas (*sul*I, *sul*II) foram identificados, bem como outros genes de resistência a outras classes de antibióticos (SZEKERES et al., 2017). A literatura aponta para a existência de antibióticos de diversas classes no esgoto hospitalar e urbano, portanto, as bactérias expostas a esses diferentes antibióticos no esgoto podem desenvolver diversos mecanismos de resistência, pois atuam de diferentes formas nas células bacterianas propiciando a expressão do fenótipo MDR, bem como a disseminação seus elementos genéticos móveis de resistência.

Genes de resistência a antibióticos foram detectados em 35,6% dos isolados (16/45), sendo os genes bla_{KPC} e bla_{TEM} de maiores prevalências, com 17,8% cada, e bla_{SHV} e $bla_{CTX\text{-}M\text{-}1,\text{-}8}$ com 13, 3% e 8,9%, respectivamente, e coprodução em 37,5% (6/16) dos isolados positivos para β-lactamases (Tabela 5). Tais genes foram encontrados em maior prevalência em bactérias do esgoto hospitalar em relação às da ETE. Para efeito de comparação, um estudo com esgoto hospitalar na cidade do Rio de Janeiro detectou porcentagem semelhante de bactérias portadoras de genes de β-lactamases. No estudo, 40% dos isolados eram produtores de enzimas CTX-M, SHV e TEM, sendo a coprodução verificada mais frequentemente (CHAGAS et al., 2011). Em esgoto de ETEs, já foi relatado os genes $bla_{CTX\text{-}M}$, bla_{TEM}, bla_{SHV} e bla_{OXA} em diversas espécies pertencentes a família *Enterobacteriaceae* (CONTE et al., 2017; OJER-USOZ et al., 2014). No presente estudo, somente em um isolado de *Enterobacter cloacae* no esgoto tratado da ETE foi identificado o gene de β-lactamase ($bla_{SHV)}$, o que pode estar relacionado ao número amostral de bactérias isoladas nessa matriz e fatores como a composição microbiana do esgoto e diluição da amostra, considerando que a coleta das amostras foi no período da manhã, um dos períodos de maior vazão do esgoto na ETE.

Os genes codificadores de β-lactamases encontrados nas bactérias (Tabela 5) são amplamente distribuídos geograficamente e endêmicos em diversos países, inclusive no Brasil

(SAMPAIO; GALES, 2016). Ao que se refere a detecção de genes de β-lactamases, a detecção do gene *bla*$_{KPC}$ é o principal achado devido a capacidade de expressar uma enzima com amplo espectro de hidrólise de todos os antibióticos β-lactâmicos – penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e monobactâmico – e ser facilmente disseminado (BONOMO, 2016).

O gene *bla*$_{KPC}$ não foi isolado frequentemente em bactérias de esgoto, ao passo que, em isolados clínicos, sua distribuição já foi bem caracterizada (BASODE et al., 2018; SAMPAIO; GALES, 2016). Como esperado, seu isolamento foi mais frequente em *Klebsiella pneumoniae* e os resultados da pesquisa por PCR são coerentes com os fenótipos de resistências apresentados pelas bactérias KPC-positivas, excetuando um isolado (E10) que apresentou resistência apenas às penicilinas e outro isolado (EJ8) com atividade restrita aos carbapenêmicos, apresentando resistência somente ao ertapenem, às penicilinas, à cefotaxima e ao aztreonam. Os demais isolados KPC-positivos apresentaram coerência com o espectro de ação dessa enzima, degradando os antibióticos β-lactâmicos testados. Ademais, três isolados KPC-positivos apresentaram também resistência a tetraciclina e/ou sulfazotrim, evidenciando a existência de múltiplos mecanismos de resistência na mesma bactéria. O isolamento do gene *bla*$_{KPC}$ em *Pseudomonas aeruginosa* (EJ6) é incomum, no entanto já foi relatado em casos isolados pelo mundo (GE et al., 2011; POIREL et al., 2010; AKPAKA et al., 2009). No Brasil, o gene *bla*$_{KPC}$ foi encontrado em *Pseudomonas aeruginosa* em 2010, em Recife, PE (JÁCOME et al., 2012), sendo assim acredita-se que o referido gene pode estar disseminado nessa espécie pelo país. Assim como em *Pseudomonas*, o gene *bla*$_{KPC}$ não é muito frequente em *Serratia liquefaciens* (EE2), embora já tenha sido detectado em outras espécies dos mesmos gêneros (TAVARES et al., 2015), evidenciando a disseminação desse gene de resistência entre as diferentes espécies de bacilos gram-negativos.

Em parte, a resistência aos carbapenêmicos pode ser atribuída a produção da enzima KPC, no entanto, em isolados KPC-negativos, a resistência pode ser explicada pelo sistema de efluxo capaz de expulsar esses antibióticos em *Pseudomonas aeruginosa* e pela deficiência na expressão da porina OmpK37, presente em *Klebsiella pneumoniae*, que permite a entrada desses antibióticos nas células bacterianas (BRADFORD et al., 2004; OKAMOTO; GOTOH, NISHINO, 2001; DOMENECH-SANCHEZ et al., 1999). Os resultados obtidos são preocupantes, posto que as espécies KPC-positivas e/ou resistente aos carbapenêmicos estão compreendidas entre o grupo de prioridade crítica listada pela WHO, já que podem causar diversas manifestações clínicas, principalmente em hospitalizados e em pacientes que requerem o uso de ventilação mecânica e cateteres, e limitadas opções terapêuticas (WHO, 2017).

A detecção dos genes *bla*$_{CTX-M}$ nos isolados produtores de ESBL está condizente com o perfil de resistência sobre cefotaxima e outras cefalosporinas de espectro estendido, como ceftazidima e cefepime. Nos isolados CTX-M-positivos (8,9%), o presente estudo identificou a produção de dois grupos de enzimas, CTX-M-1 e CTX-M-8, em *Escherichia coli*, *Hafnia alvei* e *Klebsiella pneumoniae* (Tabela 5). Estudos nacionais e internacionais mostram a identificação das enzimas CTX-M em bactérias presentes no esgoto hospitalar e urbano (PARVEZ; KHAN, 2018; CONTE et al., 2017; CHAGAS et al., 2011). As enzimas CTX-M são as ESBLs mais amplamente distribuídas, encontradas especialmente em *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, e podem ser divididas em grupos (CTX-M$_{-1, -2, -8, -9, -25, -74, -75}$) devido as sequências de aminoácidos serem distintas, mas com atividade hidrolítica em comum sobre cefotaxima do que sobre ceftazidima (ROCHA; PINTO; BARBOSA, 2016; LAHLAOUI; KHALIFA; MOUSSA, 2014; BONNET, 2004). No Brasil, as enzimas CTX-M são as ESBLs mais prevalentes e de acordo com uma revisão sistemática realizada em 2016, verificou-se que as enzimas CTX-M-15 (pertencente ao grupo CTX-M-1) e CTX-M-2 são as enzimas mais detectadas no Estado de São Paulo, seguido da enzima CTX-M-8 (ROCHA; PINTO; BARBOSA, 2016). Plasmídeos que contém os genes *bla*$_{CTX-M}$ frequentemente carreiam genes de resistência a aminoglicosídeos, tetraciclina, sulfonamidas e quinolonas (LAHLAOUI; KHALIFA; MOUSSA, 2014) e, embora não tenham sido pesquisados, tal fato corrobora com os fenótipos de susceptibilidade antimicrobiana apresentados pelas bactérias CTX-M-positivas (EE1, EE4 e EE5), que demonstraram resistência a gentamicina, sulfazotrim e ciprofloxacina (Tabela 5). Assim como os isolados produtores de KPC, os bacilos produtores de ESBL estão compreendidos no rol de bactérias categorizados como “prioridade crítica” pela WHO (WHO, 2017).

Os genes de resistência *bla*$_{TEM}$ e *bla*$_{SHV}$ foram pesquisados nas bactérias que apresentaram positividade para ESBL, CTX-M, bem como naquelas que apresentaram resistência às cefalosporinas de terceira geração. Os genes de resistência *bla*$_{TEM}$ e *bla*$_{SHV}$ foram encontrados em 17,8% e 13,3% dos isolados, respectivamente, com maior frequência em *Klebsiella pneumoniae* (Tabela 5). Dois isolados de *Klebsiella pneumoniae* ESBL-positivos, mas CTX-M-negativos, foram positivos para o gene *bla*$_{TEM}$. Embora um desses isolados coproduzia KPC, e, portanto, justifica o amplo espectro de resistência, o outro isolado apresentou ampla resistência aos antibióticos β-lactâmicos, excetuando os carbapenêmicos. O mesmo se aplica ao isolado de *Enterobacter cloacae* portador somente do gene *bla*$_{SHV}$ com resistência às penicilinas, cefalosporinas de espectro estendido e ao aztreonam. Primordialmente, as enzimas TEM e SHV tinham potencial de hidrólise apenas de penicilinas

e cefalosporinas de primeira e segunda geração, no entanto, devido ao uso excessivo de cefotaxima e ceftazidima para o tratamento de infecções, houve mutações nos genes codificadores dessas enzimas que passaram a expressá-las com capacidade de hidrolisar também as cefalosporinas de terceira e quarta geração e ao aztreonam, sendo então denominadas de ESBL (ANDRADE; DARINI, 2017; BRADFORD, 2001). Embora os genes das enzimas TEM e SHV não terem sido sequenciados para verificar se são variantes de espectro estendido, o fato de isolados TEM e SHV-positivos, e CTX-M-negativos, apresentarem resistência ao aztreonam, cefepime, cefotaxima e ceftazidima sugere a existência dessas enzimas variantes do tipo ESBL, como também verificado por outros estudos em bactérias de esgoto hospitalar e urbano (CONTE et al., 2017; CHAGAS et al., 2011).

Ainda, os dois isolados de *Klebsiella oxytoca* (EA3 e EA5) com perfil de resistência às penicilinas, à ceftazidima, ao aztreonam e, adicionalmente à sulfazotrim e tetraciclina, foram confirmados fenotipicamente como produtores de ESBL por ambos os testes de detecção, mas geneticamente não foram encontrados os genes de enzimas ESBL pesquisados ($bla_{\text{CTX-M}}$, bla_{TEM} e bla_{SHV}). Essa espécie de *Klebsiella* possui intrinsicamente o gene bla_{OXY}, que codifica uma enzima de espectro restrito denominada OXY, que quando hiperproduzida pode conferir o fenótipo de ESBL e levar a resultados falsos de detecção fenotípica de ESBL (GONZÁLEZ-LÓPEZ et al., 2009; FOURNIER et al., 1994; ARAKAWA et al., 1989). O mesmo foi verificado em um estudo com enterobactérias suspeitas de causar meningite, onde isolados de *Klebsiella oxytoca* apresentaram resultados fenotípicos de produção de ESBL e negatividade genética para os genes de ESBL, sendo então os resultados fenotípicos de resistência atribuídos a existência intrínseca do gene bla_{OXY} (ANDRADE et al., 2010).

Houve divergências entre os resultados fenotípicos e genéticos de detecção de ESBL e carbapenemases (Tabela 5). O teste de sinergia de disco duplo (DDST) detectou 10 isolados como produtores de ESBL enquanto o teste de disco combinado com ácido clavulânico (TCD) detectou oito isolados, dos quais: quatro isolados apresentaram positividade para CTX-M (EA6, EE1, EE4 e EE5); dois isolados para TEM (possivelmente ESBLs – EJ1 e EJ3) e dois isolados que foram negativos para PCR, mas atribuídos a existência da enzima OXY em *Klebsiella oxytoca*, como descrito anteriormente. O isolado EA1, *Pseudomonas aeruginosa*, apresentou positividade para o DDST e negatividade para o TCD, no entanto esse teste foi desenvolvido e recomendado para avaliação em *Enterobacteriaceae* (EUCAST, 2017; DRIEUX et al., 2008). Essa espécie apresenta resistência intrínseca a diversos antibióticos como amoxicilina, ampicilina, cefotaxima, cloranfenicol, ertapenem, sulfazotrim e tetraciclina, o que pode justificar o amplo espectro de resistência verificado. Na literatura, já foi relatado que o TCD

apresenta maior sensibilidade e especificidade em comparação com outros testes de detecção fenotípica de ESBL (DRIEUX et al., 2008; WIEGAND et al., 2007).

Quanto aos testes fenotípicos para detecção de carbapenemases, houve discordância entre o TCD-Anvisa e o teste Blue Carba. O TCD-Anvisa identificou 11 isolados produtores de carbapenemases, mas quando testados com o teste Blue Carba, verificou-se que oito isolados eram produtores de carbapenemases, os quais também apresentaram positividade para o gene bla_{KPC}, considerando o teste Blue Carba mais específico e sensível para a detecção de carbapenemases em bacilos gram-negativos. Os isolados de *Pseudomonas aeruginosa* (EA4, EE7 e EE8) foram detectados como produtores de carbapenemases com o TCD-Anvisa, no entanto este teste é empregado exclusivamente para enterobactérias. Sendo assim, reitera-se que na clínica seja importante o uso de mais de um teste de detecção fenotípica de ESBL e carbapenemases, bem como de técnicas moleculares, para a correta identificação de isolados produtores de enzimas hidrolisantes de antibióticos, com finalidade de atribuir a antibióticoterapia mais adequada (WILLEMS et al., 2013).

A incidência de bactérias multirresistentes aumentou nos últimos anos devido a coexistência de genes de resistência a múltiplos antibióticos, de classes distintas. Os resultados do presente estudo demonstram a coexistência de genes de resistência aos antibióticos β-lactâmicos de bactérias isoladas no esgoto hospitalar. A coexistência foi verificada com maior frequência em *Klebsiella pneumoniae*, fato este preocupante devido à escassez de novos medicamentos antimicrobianos para o tratamento de bactérias MDR e a importância médica dessa bactéria como causadora de diversas manifestações clínicas e responsável por infecções hospitalares e infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS). A disseminação da resistência bacteriana ameaça os avanços proporcionados pela introdução dos antibióticos na clínica, fazendo com que o cenário da era pré-antibiótica volte a ser uma realidade (WATKINS; BONOMO, 2016). É recomendado o uso de carbapenêmicos para o tratamento de infecções causadas por bacilos gram-negativos produtores de ESBL, pois esses antibióticos não são afetados pelo potencial de hidrólise dessas enzimas. Já para bacilos produtores de carbapenemases, as polimixinas, tigeciclina, aminoglicosídeos e fosfomicina podem ser considerados opções viáveis para o tratamento, assim como uso de antibióticos em combinação com inibidores de β-lactamases (RODRÍGUEZ-BAÑO et al., 2018). Recentemente o antibiótico ceftazidima-avibactam foi aprovado para o tratamento contra KPC e OXA-48. Novos antibióticos demonstraram ser ativos contra carbapenemases e estão em desenvolvimento, como meropenem-vaborbactam, imipenem-relebactam e aztreonam-avibactam (RODRÍGUEZ-BAÑO et al., 2018). A coexistência de mecanismos de resistência

deve ser frequentemente avaliada para que a administração dos antibióticos seja prudente e individualizada, de acordo com o perfil de susceptibilidade aos antibióticos apresentado pelas bactérias, bem como as características do paciente.

A permissão da legislação brasileira quanto ao descarte de esgoto hospitalar *in natura* na rede coletara municipal pode agravar a situação verificada pelo presente estudo, posto que nessa matriz podem estar contidos antibióticos que selecionam as bactérias resistentes e essas, por sua vez, facilmente disseminam seus genes de resistência para bactérias não portadoras principalmente através da conjugação (FERREIRA et al., 2019; KARKMAN et al., 2018). Acredita-se que a responsabilidade do tratamento de efluentes hospitalares não deve ser atribuída para as ETEs municipais, uma vez que os resultados obtidos demonstram que o método biológico empregado para o tratamento de esgoto não garante em sua totalidade a eliminação de bactérias multirresistente portadoras de β-lactamase, o que pode ser resultado também do desenvolvimento da resistência ao tratamento biológico por lodos ativados, por parte dessas bactérias. Na literatura há diversas evidências científicas que detectaram genes de resistência a antibióticos no esgoto após o tratamento em ETE (BUELOW et al., 2018; PROIA et al., 2018; CONTE et al., 2017; AMADOR et al., 2015). Tal fato representa um risco para a saúde humana e ambiental, visto que em rios impactados por efluentes de ETEs já foram detectadas bactérias e/ou genes de resistência a antibióticos (SANCHEZ et al., 2018; LAMBA; AHAMMAD, 2017; TACÃO et al., 2014), assim como em peixes selvagens que muitas vezes são destinados para o consumo humano em áreas ribeirinhas (MARTI et al., 2018). Portanto, verifica-se a necessidade de implementação de novas tecnologias complementares para o tratamento de esgoto para evitar o impacto negativo nos recursos hídricos, assim como de expor a população a este tipo de microrganismo, com potencial patogênico para humanos.

Reitera-se que a condição microbiológica verificada no presente estudo, caracteriza o esgoto de um hospital de alta complexidade que interna mais de 25.000 pacientes por ano (HCFMRP, 2017), portanto não se pode inferir que os resultados encontrados são padrões para todas as instituições de saúde do munícipio e país. Sendo assim, acredita-se que seja necessário uma avaliação frequente dos esgotos hospitalares quanto a ocorrência de bactérias MDR portadoras de genes de resistência, especialmente naqueles com alto fluxo de internações, destacando a necessidade de implementação de sistema de tratamento desses efluente a fim de evitar a disseminação de bactérias multirresistentes nas galerias de esgoto, uma vez que é considerado como uma das principais matrizes para disseminar a resistência microbiana (AUGUET et al., 2017). Estudos que avaliaram a eficiência do tratamento da ETE do município mostraram alta eficiência na remoção da carga orgânica, no entanto apontam o tratamento por

lodos ativados como parcialmente eficaz para a remoção de químicos e bioagentes patogênicos (TONANI et al., 2013; TONANI et al., 2011), condição que pode ser agravada com a recepção do esgoto de hospitais de grande porte. Ademais, já foi verificado o potencial de ETEs como reservatórios de bactérias multirresistentes e ambiente facilitadores da troca de genes de resistência, o que é agravado pelo fato de receberem esgotos de origem hospitalar com a possível presença de bactérias portadoras de genes de resistência, como verificado pelo presente estudo (KARKMAN et al., 2018; AUGUET et al., 2017; KORZENIEWSKA; HARNISZ, 2013; RIZZO et al., 2013). Nos últimos anos, a preocupação com a disseminação de bactérias multirresistentes no ambiente veio à tona e, com isso, diversos estudos vêm trabalhando com tecnologias alternativas para o tratamento de esgoto, como coagulação, cloração, ozonização e irradiação UV, com a finalidade de reduzir a carga de bactérias resistentes a antibióticos e/ou genes de resistência de antibióticos para garantir a segurança pública e ambiental (LI et al., 2017; SHARMA et al., 2016; RIZZO et al., 2013). Ainda, são necessários estudos para avaliar a real situação de esgotos hospitalares e de ETEs pelo Brasil, assim como a tomada de medidas para evitar o desenvolvimento da multirresistência bacteriana e a disseminação de genes de resistência no meio urbano e ambiental.

CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

- No geral, o estudo identificou diversas espécies de bactérias no esgoto hospitalar e urbano que podem fazer parte da microbiota humana ou serem originados de infecções dos pacientes atendidos no hospital.

- O fenótipo MDR foi verificado na maior parte das bactérias, que demonstraram resistência às distintas classes de antibióticos, inferindo a existência de diferentes mecanismos de resistência presente em bactérias no esgoto.

- As bactérias do esgoto hospitalar apresentaram espectro amplo de resistência aos antibióticos em comparação com as bactérias isoladas no esgoto da ETE, e nesse sentido, a resistência ao aztreonam, cefepime e cefotaxima foi verificada principalmente nos isolados do esgoto da enfermaria e da junção do efluentes do hospital, quando comparado estatisticamente com os outros pontos de amostragem.

- Verificou-se expressiva porcentagem de bactérias produtoras de genes de β-lactamases (35,6%), sendo os genes bla_{KPC} e bla_{TEM} com maiores prevalências, principalmente no esgoto hospitalar.

- Houve discordância no teste de detecção fenotípica de carbapenemases entre o teste de disco combinado padronizado pela Anvisa e o teste Blue Carba. O gene bla_{KPC} foi encontrado em todos os isolados positivos no teste Blue Carba e, como esperado, foi predominantemente em *Klebsiella pneumoniae*, mas também encontrado em *Pseudomonas aeruginosa* e *Serratia liquefaciens*.

- A detecção fenotípica de ESBL pelo teste de sinergia de disco duplo demonstrou dez isolados positivos, no entanto houve discordância com resultados do teste de disco combinado com ácido clavulânico, sendo oito isolados fenotipicamente positivos para ESBL. Desses, quatro apresentaram o gene $bla_{CTX\text{-}M}$ e dois o gene bla_{TEM}. Os outros dois isolados positivos para ESBL nos testes fenotípicos, ambos *Klebsiella oxytoca*, apresentaram negatividade para os genes de ESBL, sugerindo a hiperprodução da enzima OXY.

- Foram detectados isolados multirresistentes, no esgoto tratado da ETE, demonstrando não ser totalmente eficiente na remoção de bactérias resistentes aos antibióticos e/ou genes de resistência, o que pode impactar negativamente os recursos hídricos e representar um risco para a saúde humana e ambiental.

- Acredita-se que a legislação referente ao descarte de esgoto hospitalar na rede coletora municipal deva ser revista para a necessidade de implementação de tecnologias complementarem de desinfecção do esgoto, especialmente para hospitais de nível terciário, assim como na ETE, para evitar a disseminação de bactérias multirresistentes portadoras de genes de resistência a antibióticos no ambiente.

- Outros estudos, com maior número amostral de bactérias, devem ser realizados nesta ETE para verificar a real composição microbiológica do efluente tratado e possivelmente identificar os possíveis impactos na saúde pública e ambiental.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ABDULHAQ, A.; BADOSE, V. K. Prevalence of extended-spectrum b-lactamase-producing bacteria in hospital and community sewage in Saudi Arabia. **American Journal of Infection Control**, v. 43, p. 1139-1141, 2015.

ABRAHAM, E. P.; CHAIN, E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. **Nature**, v. 146, p. 837-837, 1940.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução – RDC nº 50, de 21 de fevereiro de 2002. **Dispõe sobre o Regulamento Técnico para planejamento, programação, elaboração e avaliação de projetos físicos de estabelecimentos assistenciais de saúde.** Acesso em: 03 de abril de 2017. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/anvisalegis/resol/2002/50_02rdc.pdf>.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Nota Técnica – 01/2013, de 17 de abril de 2013. **Medidas de prevenção e controle de infecções por enterobactérias multirresistentes.** Acesso em: 04 de fevereiro de 2018. Disponível em: < http://portal.anvisa.gov.br/documents/33852/271858/Nota+t%C3%A9cnica+n%C2%BA+01+de+2013/5be89853-7eca-4b4b-98e4-5096b9f5a2ec>.

AKPAKA, P. E.; SWANSTON, W. H.; IHEMERE, H. N.; CORREA, A.; TORRES, J. A.; TAFUR, J. D.; MONTEALEGRE, M. C.; QUINN, J. P.; VILLEGAS, M. V. Emergence of KPC-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Trinidad and Tobago. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 8, p. 2670-2671, 2009.

AL-BAYSSARI, C.; DABBOUSSI, F.; HAMZE, M.; ROLAIN, J. M. Detection of expanded-spectrum β-lactamases in Gram-negative bacteria in the 21st century. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 13, n. 9, p. 1139-1159, 2015.

ALÓS, J. I. Resistencia bacteriana a los antibióticos: uma crisis global. **Enfermedades Infeciosas y Microbiología Clínica**, v. 33, n. 10, p. 692-699, 2015.

AMADOR, P. P.; FERNANDES, R. M.; PRUDÊNCIO, M. C.; BARRETO, M. P.; DUARTE, I. M. Antibiotic resistance in wastewater: occurrence and fate of *Enterobacteriaceae* producers of Class A and Class C β-lactamases. **Journal of Environmental Science and Health, Part A**, v. 50, n. 1, p. 26-39, 2015.

AMBIENT. 2017. Disponível em: <http://www.ambient.com.br/>. Acesso em: 06 de abril de 2017.

AMBLER, R. P. The structure of beta-lactamases. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, v. 289, n. 1036, p. 321-331, 1980.

AMINOV, R. History of antimicrobial drug discovery: major classes and health impact. **Biochemical Pharmacology**, v. 133, p. 4-19, 2017.

AN, J.; GUO, L.; ZHOU, L.; MA, Y.; LUO, Y.; TAO, C.; YANG, J. NDM-producing *Enterobacteriaceae* in a Chinese hospital, 2014-2015: indentification of NDM-producing

Citrobacter werkanii and acquisition of *bla*$_{NDM-1}$-carrying plasmid *in vivo* in a clinical *Escherichia coli* isolate. **Journal of Medical Microbiology**, v. 65, p. 1253-1259, 2016.

ANDRADE, L. N.; DARINI, A. L. C. Bacilos gram-negativos produtores de beta-lactamases: que bla bla bla é esse? **Journal of Infection Control**, v. 6, n. 1, p. 16-25, 2017.

ANDRADE, L. N.; MINARINI, L. A.; PITONDO-SILVA, A.; CLÍMACO, E. C.; PALAZZO, I. C.; MEDEIROS, M. I.; DARINI, A. L. Determinants of beta-lactam resistance in meningitis-causing *Enterobacteriaceae* in Brazil. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 56, n. 5, p. 399-407, 2010.

ANTONELLI, A.; D'ANDREA, M. M.; VAGGELLI, G.; DOCQUIER, J. D.; ROSSOLINI, G. M. OXA-372, a novel carbapenem-hydrolysing Class D β-lactamase from a *Citrobacter freundii* isolated from a hospital wastewater plant. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, n. 10, p. 2749-2756, 2015.

ANTUNES, N. T.; FISHER, J. F. Acquired Class D β-lactamases. **Antibiotics**, v. 3, n. 3, p. 398-434, 2014.

APHA. American Public Health Association**. Standard Methods for the Examination Water and Wastewater**. 22ª ed. Washington, DC: APHA INC. 1015, P. 1490. 2012.

ARAKAWA, Y.; OHTA, M.; KIDO, N.; MORI, M.; ITO, H.; KOMATSU, T.; FUJII, Y.; KATO, N. Chromosomal beta-lactamase of *Klebsiella oxytoca*, a new class A enzyme that hydrolyzes broad-spectrum beta-lactam antibiotics. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 33, n. 1, p. 63-70, 1989.

AUGUET, O.; PIJUAN, M.; BORREGO, C. M.; RODRIGUEZ-MOZAZ, S.; TRIADÓ-MARGARIT, X.; GIUSTINA, S. V. D.; GUTIERREZ. Sewers as potential reservoirs of antibiotic resistance. **Science of the Total Environment**, v. 605-606, p. 1047-1054, 2017.

BASODE, V. K; ABDULHAQ, A.; ALAMOUDI, M. U. A.; TOHARI, H. M.; QUHAL, W. A.; MADKHALI, A. M.; HOBANI, Y. H.; HERSHAN, A. A. Prevalence of a carbapenem-resistance gene (KPC), vancomycin-resistance genes (van A/B) and a methicillin-resistance gene (mecA) in hospital and municipal sewage in a southwestern province of Saudi Arabia. **BMC Research Notes**, v. 11, n. 1, p. 2-6, 2018.

BASSETTI, M.; POULAKOU, G.; RUPPE, E.; BOUZA, E.; HAL, S. J. V.; BRINK, A. Antimicrobial resistance in the next 30 years, humankind, bugs and drugs: a visionary approach. **Intensive Care Medicine**, v. 43, n. 10, p. 1464-1475, 2017.

BAUERNFEIND, A.; GRIMM, H.; SCHWEIGHART, S. A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*. **Infection**, v. 18, n. 5, p. 294-298, 1990.

BBC. Superbactérias avançam no Brasil e levam autoridades de saúde a correr contra o tempo. Disponível em: <http://www.bbc.com/portuguese/brasil-40561948>. Acesso em: 02 de janeiro de 2018.

BOGAERTS, P.; CASTRO, R.; MENDONÇA, R.; HUANG, T. D.; GLUPCZYNSKI, Y. Validation of carbapenemase and extended-spectrum b-lactamase multiplex endpoint PCR

assays according to ISO 15189. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, p. 1576-1582, 2013.

BOGAERTS, P.; NAAS, T.; SAEGEMAN, V.; BONNIN, R. A.; SCHUERMANS, A.; EVRARD, S.; BOUCHAHROUF, W.; JOVE, T.; TANDE, D.; BOLLE, X.; HUANG, T. D.; DORTET, L.; GLUPCZYNSKI, Y. OXA-427, a new plasmid-borne carbapenem-hydrolysing Class D β-lactamases in *Enterobacteriaceae*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 72, n. 9, p. 2469-2477, 2017.

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

BONOMO, R. A. β-lactamases: a focus on current challengs. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine,** v. 7, n. 1, a025239, 2016.

BOUKI, C. B.; VENIERI, D.; DIAMADOPOULOS, E. Detection and fate of antibiotic resistant bacteria in wastewater treatment plants: A review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 91, p. 1-9, 2013.

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

BRADFORD, P. A.; BRATU, S.; URBAN, C.; VISALLI, M.; MARIANO, N.; LANDMAN, D.; RAHAL, J. J.; BROOKS, S.; CEBULAR, S.; QUALE, J. Emergence of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* species possessing the Class A carbapenem-hydrolyzing KPC-2 and inhibitor-resistant TEM-30 β-lactamases in New York City. **Clinical Infectious Diseases**, v. 39, n. 1, p. 55-60, 2004.

BUELOW, E.; BAYJANOV, J. R.; MAJOOR, E.; WILLEMS, R. J. L.; BONTEM M. J. M.; SCHMITT, H.; SCHAIK, W. Limited influence of hospital wastewater on the microbiome and resistome of wastewater in a community sewerage system. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 94, n. 7, p. 1-9, 2018.

BUSH, K. Proliferation and significance of clinically relevant β-lactamases. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1277, p. 84-90, 2013a.

BUSH, K. Carbapenemases: Partners in crime. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 1, p. 7-16, 2013b.

BUSH, K. The ABCD's of β-lactamase nomenclature. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 19, n. 4, p. 549-559, 2013c.

BUSH, K.; BRADFORD, P. A. β-Lactams and β-Lactamase Inhibitors: An Overview. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 6, n. 8, p. 1-22, 2016.

BUSH, K.; JACOBY, G. A. Updated functional classification of β-lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 3, p. 969-976, 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**, v. 39, n. 6, 1995.

BROOKS, B. D.; BROOKS, A. E. Therapeutic strategies to combat antibiotic resistance. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 78, p. 14-27, 2014.

CAG, Y.; CASKURLU, H.; FAN, Y.; CAO, B.; VAHABOGLU, H. Resistance mechanisms. **Annals of Translational Medicine**, v. 4, n. 17, p. 326, 2016.

CAI, L.; JU, F.; ZHANG, T. Tracking human sewage microbiome in a municipal wastewater treatment plant. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 7, p. 3317-3326, 2014.

CANTAS, L.; SHAH, S. Q. Q.; CAVACO, L. M.; MANAIA, C. M.; WALSH, F.; POPOWSKA, M.; GARELICK, H.; BÜRGMANN, H.; SORUM, H. A brief multi-disciplinary review on antimicrobial resistance in medicine and its linkage to the global environmental microbiota. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, n. 96, p. 1-14, 2013.

CASTANHEIRA, B. A. M. G. **Mecanismos de Resistências a Antibióticos**. 57f. Dissertação (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade Ciências e Tecnologias da Saúde, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisboa. 2013.

CASTANHEIRA, M.; PEREIRA, A. S.; NICOLETTI, A. G.; PIGNATARI, A. C. C.; BARTH, A. L.; GALES, A. C. First report of plasmid-mediated *qnrA1* in a ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* strain in Latin America. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 4, p. 1527-1529, 2007.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Acesso em: 08 de junho de 2017. Disponível em: < https://www.cdc.gov/>.

CHAGAS, T. P. G.; SEKI, L. M.; CURY, J. C.; OLIVEIRA, J. A. L.; DÁVILA, A. M. R.; SILVA, D. M.; ASENSI, M. D. Multiresistance, beta-lactamase-encoding genes and bacterial diversity in hospital wastewater in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 111, n. 3, p. 572-581, 2011.

CHENG, L.; NELSON, B. C.; MEHTA, M.; SEVAL, N.; PARK, S.; GIDDINS, M. J.; SHI, Q.; WHITTIER, S.; GOMEZ-SIMMONDS, A.; UHLEMANN, A. C. Pipercillin-tazobactam versus other antibacterial agents for treatment of bloodstream infections due to AmpC β-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 6, p. 1-10, 2017.

CHERVET, D.; LORTHOLARY, O.; ZAHAR, J. R.; DUFOUGERAY, A.; PILMIS, B.; PARTOUCHE, H. Antimicrobial resistance in community-acquired urinary tract infections in Paris in 2015. **Medicine et Maladies Infectieuses**, v. 48, p. 188-192, 2018.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing.** 27th edition. 2017.

COMPANHIA CATARINENSE DE ÁGUAS E SANEAMENTO (CASAN). **Estação de tratamento de esgotos sanitários.** Acesso em: 06 de abril de 2017. Disponível em:

<http://www.casan.com.br/menu-conteudo/index/url/ete-estacao-de-tratamento-de-esgotos-sanitarios#0>.

COMPANHIA ESPÍRITO SANTENSE DE SANEAMENTO (CESAN). **Apostila: Tratamento de Esgoto.** 2013. Acesso em: 06 de abril de 2017. Disponível em: <http://www.cesan.com.br/wp-content/uploads/2013/08/APOSTILA_TRATAMENTO_ESGOTO.pdf.>.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE (CONAMA). Resolução 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**. Acesso em: 06 de abril de 2017.

CONTE, D.; PALMEIRO, J. K.; NOGUEIRA, K. S.; LIMA, T. M. R.; CARDOSO, M. A.; PONTAROLO, R.; PONTES, F. L. D.; DALLA-COSTA, L. M. Characterization of CTX-M enzymes, quinolone resitance determinants, and antimicrobial residues from hospital sewage, wastewater treatment plant, and river water. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 136, p. 62-69, 2017.

COX, G.; WRIGHT, G. D. Intrinsic antibiotic resistance: mechanisms, origins, challenges and solutions. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 303, n. 7, p. 287-292, 2013.

DAOUD, Z.; FARAH, J.; SALEM, E. S.; KFOURY, K. E.; DAHDOUH, E.; MASRI, K.; AFIF, C.; ABDEL-MASSIH, R. M.; MATAR, G. M. Multidrug-resistant *Enterobacteriaceae* in Lebanese hospital wastewater: implication in the one health concept. **Microbial Drug Resistance**, p. 1-10, 2017.

DATTA, N.; KONTOMICHALOU, P. Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in *Enterobacteriaceae*. **Nature**, v. 208, n. 5007, p. 239-241, 1965.

DOMÉNECH-SÁNCHEZ, A.; HERNÁNDEZ-ALLÉS, S.; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L.; BENEDÍ, V. J.; ALBERTÍ, S. Identification and characterization of a new porin gene of Klebsiella pneumoniae: its role in beta-lactam antibiotic resistance. **Journal of Bacteriology**, v. 181, n. 9, p. 2726-2732, 1999.

DÖRR, T.; ALVAREZ, L.; DELGADO, F.; DAVIS, B. M.; CAVA, F.; WALDOR, M. K. A cell wall damage response mediated by a sensor kinase/response regulator pair enables beta-lactam tolerance. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, n. 2, 2016.

DORTET, L.; OUESLATI, S.; JEANNOT, K.; TANDÉ, D.; NAAS, T.; NORDMANN, P. Genetic and biochemical charachterization of OXA-405, an OXA-48-type extended-spectrum β-lactamase without significant carbapenemase activity. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 7, 3823-3828, 2015.

DRIEUX, L.; BROSSIER, F.; SOUGAKOFF, W.; JARLIER, V. Phenotypic detection of extended-spectrum beta-lactamase production in *Enterobacteriaceae*: review and bench guide. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14, n. 1, p. 90-103, 2008.

EL-GAMAL, M. I.; BRAHIM, I.; HISHAM, N.; ALADDIN, R.; MOHAMMED, H.; BAHAAELDIN, A. Recent updates of carbapenem antibiotics. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 131, p. 185-195, 2017.

EMMANUEL, E.; PERRODIN, Y., KECK, G.; BLANCHARD, J. M.; VERMANDE, P. Ecotoxicological risk assessment of hospital wastewater: a proposed framework for raw effluents discharging into urban sewer network. **Journal of Hazardous Materials**, v. 117, n. 1, p. 1-11, 2005.

EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING (EUCAST). **EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistance of clinical and/or epidemiological importance.** Version 2.0. 2017.

EVANS, B. A.; AMYES, S. G. B. OXA β-lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, n. 2, p. 241-263, 2014.

FERREIRA, C.; BOGAS, D.; BIKAROLLA, S. K.; VARELA, A. R.; FRYKHOLM, K.; LINHEIRO, R.; NUNES, O. C.; WESTERLUND, F.; MANAIA, C. M. Genetic variation in the conjugative plasmidome of a hospital effluent multidrug resistant *Escherichia coli* strain. Chemosphere, v. 220, p. 748-759, 2019.

FOURNIER, B.; ARLET, G.; LAGRANGE, P. H.; PHILIPPON, A. *Klebsiella oxytoca*: resistance to aztreonam by overproduction of the chromosomally encoded beta-lactamase. **FEMS Microbiology Letters**, v. 116, n. 1, p. 31-36, 1994.

FREGONESI, B. M. **Pesquisa de bioagentes na água do Rio Pardo, Brasil, e estimativa de risco de infecção e doença por *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp.** 140f. Tese (Doutorado em Ciências), Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2017.

FRIERI, M.; KUMAR, K.; BOUTIN, A. Antibiotic resistance. **Journal of Infection and Public Health**, v. 10, n. 4, p. 369-378, 2017.

GARAU, G.; GARCÍA-SÁEZ, I.; BEBRONE, C.; ANNE, C.; MERCURI, P.; GALLENI, FRÈRE, J. M.; DIDEBERG, O. Update of the standard numbering scheme for Class B β-lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 7, p. 2347-2349, 2004.

GE, C.; WEI, Z.; JIANG, Y.; SHEN, P.; YU, Y.; LI, L. Identification of KPC-2-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in China. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n. 5, p. 1164-1186, 2011.

GIEBUŁTOWICZ, J.; TYSKI, S.; WOLINOWSKA, R.; GRZYBOWSKA, W.; ZAREBA, T.; DROBNIEWSKA, A.; WROCZYNSKI, P.; NALECZ-JAWECKI, G. Occurrence of antimicrobial agents, drug-resistant bacteria, and genes in the sewage-impacted Vistula River (Poland). **Environmental Science and Pollution Research**, p. 1-20, dezembro, 2017.

GONZÁLEZ-LÓPEZ, J. J.; COELHO, A.; LARROSA, M. N.; LAVILLA, S.; BARTOLOMÉ, R.; PRATS, G. First detection of plasmid-encoded bla_{OXY} beta-lactamase. Antimicrobial Agents Chemotherapy, v. 53, n. 7, p. 3143-3146, 2009.

HALLER, L.; CHEN, H.; NG, C.; LE, T. H.; KOH, T. H.; BARKHAM, T.; SOBSEY, M.; GIN, K. Y. H. Occurrence and characteristics of extended-spectrum β-lactamase- and carbapenemase- producing bacteria from hospital effluents in Singapore. **Science of the Total Environment**, v. 615, p. 1119-1125, 2018.

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. Relatório de Atividades 2017. Disponível em: < https://site.hcrp.usp.br/wp-content/uploads/2017/09/RelatoriodeAtividades_HCRP-2017.pdf>. Acesso em: 27 de dezembro de 2018.

HEDGES, R. W.; DATTA, N.; KONTOMICHALOU, P.; SMITH, J. T. Molecular specificities of R fator-determined beta-lactamases: correlation with plasmid compatibility. **Journal of Bacteriology**, v. 117, n. 1, p. 56-62, 1974.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE), 2018. Disponível em: < https://cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?lang=&codmun=354340&search=||infogr%E1ficos:-informa%E7%F5es-completas>. Acesso em: 27 de dezembro de 2018.

IOVLEVA, A.; DOI, Y. Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae*. **Clinics in Laboratoty Medicine**, v. 37, n. 2, p. 303-315, 2017.

IREDELL, J.; BROWN, J.; TAGG, K. Antibiotic resistance in *Enterobacteriaceae*: mechanisms and clinical implications. **BMJ**, v, 352, h6420, 2016.

JACOBY, G. A. AmpC β-lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, n. 1, p. 161-182, 2009.

JACOBY, G. A. β-lactamase nomenclature. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy,** v. 50, n. 4, p. 1123-1129, 2006.

JÁCOME, P. R.; ALVES, L. R.; CABRAL, A. B.; LOPES, A. C.; MACIEL, M. A. First report of KPC-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Brazil. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 56, n. 9, p. 4990, 2012.

JASPER, R. T.; COYLE, J. R.; KATC, D. E.; MARCHAIM, D. The complex epidemiology of extended-spectrum β-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*. **Future Microbiology**, v. 10, n. 5, p. 819-839, 2015.

JOBAYER, M.; AFROZ, Z.; NAHAR, S. S.; BEGUM, A.; BEGUM, S. A.; SHAMSUZZAMAN, S. M. Antimicrobial susceptibility pattern of extended-spectrum beta-lactamase producing organisms isolated in a tertiary care hospital, Bangladesh. **International Journal of Applied and Basic Medical Research**, v. 7, p. 189-192, 2017.

KARKMAN, A.; DO, T. T.; WALSH, F.; VIRTA, M. P. J. Antibiotic-resistance gene in waste water. **Trends in Microbiology**, v. 26, n. 3, p. 220-228, 2018.

KORZENIEWSKA, E.; HARNISZ, M. Beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in hospital effluents. **Journal of Environmental Management**, v. 123, p. 1-7, 2013.

KRÁLIKOVÁ, K.; KRCMÉRY, V.; KRCMÉRY, V. J. Transferable resistance to gentamicin and other antibiotics in *Enterobacteriaceae* isolates from municipal wastewater. **Journal of Hygiene, Epidemiology, Microbiology, and Immunology**, v. 28, n. 2, p. 161-166, 1984.

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

LAHEY HOSPITAL & MEDICAL CENTER. OXA-type β-lactamases. Disponível em: < https://www.lahey.org/Studies/other.asp>. Acesso em: 19 de dezembro de 2017.

LAHLAOUI, H.; KHALIFA, A. B. H.; MOUSSA, M. B. Epidemiology of Enterobacteriaceae producing CTX-M type extended spectrum β-lactamase (ESBL). **Médicine et Maladies Infectieuses**, v. 44, p. 400-404, 2014.

LAMBA, M.; AHAMMAD, S. Z.; Sewage treatment effluents in Delhi: A key contributor of β-lactam resistant bacteria and genes to the environment. **Chemosphere**, v. 188, p. 249-256, 2017.

LANGERGRABER, G. Are constructed treatment wetlands sustainable sanitation solutions? **Water Science Thecnology**, v. 67, n. 10, p. 2133-2140, 2013.

LI, N.; SHENG, G. P.; LU, Y. Z.; ZENG, R. J.; YU, H. Q. Removal of antibiotic resistance genes from wastewater treatment plant effluent by coagulation. **Water Research**, v. 111, p. 204-212, 2017.

LIU, X.; LIU, Y. Detection of plasmid-mediated AmpC β-lactamase in *Escherichia coli*. **Biomedical Reports**, v. 4, p. 687-690, 2016.

LÜ, Y.; LIU, W.; ZHAO, S.; ZHANG, W.; LIU, J.; JIN, C.; HU, H. NDM-1 encoded by a pNDM-HN380-like plasmid pNDM-BJ03 in clinical *Enterobacter cloacae*. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 17, p. 1-3, 2017.

MAGIORAKOS, A. P.; SRINIVASAN, A.; CAREY, R.B.; CARMELI, Y.; FALAGAS, M. E.; GISKE, C. G.; et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical Microbiology Infection**, v. 18, p. 268-281, 2012.

MAHMOUDI, S.; MAHZARI, M.; BANAR, M.; POURAKBARI, B.; ASHTIANI, M. T. H.; MOHAMMADI, M.; VALIAN, S. K.; MAMISHI, S. Antimicrobial resistance patterns of Gram-negative bacteria isolated from bloodstream infections in an Iranian referral paediatric hospital: a 5.5-year study. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 11, p. 17-22, 2017.

MARTI, E.; HUERTA, B.; RODRÍGUEZ-MOZAZ, S.; BARCELÓ, D.; MARCÉ, R.; BALCÁZAR, J. L. Abundance of antibiotic resistance genes and bacterial community composition in wild freshwater fish species. **Chemosphere**, v. 196, p. 115-119, 2018.

MARTINS, E. V.; ESTOFOLETE, C. F.; ZEQUINI, A. B.; CERDEIRA, L.; GARCIA, D. O.; BUENO, M. F. C.; FRANCISCO, G. R.; ANDRADE, L. N.; DARINI, A. L. C.; TOLENTINO, F. M.; CASELLA, T.; LINCOPAN, N.; NOGUEIRA, M. C. L. Transfer of KPC-2 carbapenemase from *Klebsiella pneumoniae* to *Enterobacter cloacae* in a patient receiving

meropenem therapy. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 88, n. 3, p. 287-289, 2017.

MIMICA, M. J. Ceftobiprole: uma nova cefalosporina com ação contra Staphylococcus aureus resistentes à oxacilina. **Arquivos Médicos do Hospital da Faculdade de Ciências Médicas Santa Casa de São Paulo**, v. 56, n. 2, p. 107-111, 2011.

MOJICA, M. F.; BONOMO, R. A.; FAST, W. B1-Metallo-beta-lactamases: where do we stand? **Current Drug Targets**, v. 17, n. 9, p. 1029-1050, 2016.

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

MONTEZZI, L. F.; CAMPANA, E. H.; CORRÊA, L. L.; JUSTO, L. H.; PASCHOAL, R. P.; SILVA, I. L. V. D.; SOUZA, M. C. M.; DROLSHAGEN, M.; PICÃO, R. C. Occurrence of carbapenemase-producing bacteria in coastal recreational waters. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 45, n. 2, p. 174-177, 2015.

MORAIS, V. P.; DAPORTA, M. T.; BAO, A.F.; CAMPELLO, M. G. Enteric fever-like syndrome Caused by *Raoultella ornithinolytica* (*Klebsiella ornithinolytica*). **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 3, p. 868-869, 2009.

MOURA, A.; PEREIRA, C.; HENRIQUES, I.; CORREIA, A. Novel gene cassettes and integrons in antibiotic-resistant bacteria isolated from urban wastewaters. **Research in Microbiology**, v. 163, n. 2, p. 92-100, 2012.

MOXON, C. A.; PAULUS, S. Beta-lactamases in *Enterobacteriaceae* infections in children. **Journal of Infection**, v. 72, p. 41-49, 2016.

MUNOZ-PRICE, L. S.; POIREL, L.; BONOMO, R. A.; SCHWABER, M. J.; DAIKOS, G. L.; CORMICAN, M.; et al. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 13, n. 9, p. 785-796, 2013.

NAQUIN, A.; SHRESTHA, A.; SHERPA, M.; NATHANIEL, R.; BOOPATHY, R. Presence of antibiotic resistance genes in a sewage treatment plant in Thibodaux, Louisiana, USA. **Bioresource Thechnology**, v. 188, p. 79-63, 2015.

NAAS, T.; DORTET, L.; IORGA, B. Structural and functional aspects of Class A carbapenemases. **Current Drug Targets**, v. 17, n. 9, p. 1006-1028, 2016.

NAKASONE, E. S.; KANESHIRO, R.; MIN, K.; TOKESHI, J. Emergence of *Raoultella ornithinolytica* an O'ahu: A case of community-acquired *R. ornithinolytica* urinary tract infection. **Hawai'I Journal of Medicine & Public Health**, v. 74, n. 5, p. 174-175, 2015.

NAVARRO, A. O.; URIBE, N.; SIERRA, P.; JAIMES, F.; GONZÁLEZ, J. M. Bacteriemia por enterobactérias resistentes a carbapenems. Un estudio transversal. **Infectio**, v. 19, n. 2, p. 60-66, 2015.

NORDMANN, P.; NAAS, T.; POIREL, L. Global spread of carbapenemase-produncing *Enterobacteriaceae*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 10, p. 1791-1798, 2011.

OJER-USOZ, E.; GONZÁLEZ, D.; GARCÍA-JALÓN, I.; VITAS, A. I. High dissemination of extended-spectrum β-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in effluents from wastewater treatment plants. **Water Research**, v. 56, p. 37-47, 2014.

OKAMOTO, K.; GOTOH, N.; NISHINO, T. *Pseudomonas aeruginosa* reveals high intrinsic resistance to penem antibiotics: penem resistance mechanisms and their interplay. **Antimicrobial Agents and Chemoterapy**, v. 45, n. 7, p. 1964-1971, 2001.

OTEO, J.; HERNÁNDEZ, J. M.; ESPASA, M.; FLEITES, A.; SÁEZ, D.; BAUTISTA, V.; PÉREZ-VÁZQUEZ, M.; FERNÁNDEZ-GARCÍA, M. D.; DELGADO-IRIBARREN, A.; SÁNCHEZ-ROMERO, I.; GARCÍA-PICAZO, L.; MIGUEL, M. D.; SOLÍS, S.; AZNAR, E.; TRUJILLO, G.; MEDIAVILLA, C.; FONTANALS, D.; ROJO, S.; VINDEL, A.; CAMPOS, J. Emergence of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* and the novel carbapenemases OXA-244 and OXA-245 in Spain. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 2, p. 317-321, 2013.

PAECH, F.; MESSNER, S.; SPICKERMANN, J.; WIND, M.; SCHMITT-HOFFMANN, A. H.; WITSCHI, A. T.; HOWELL B. A.; CHURCH, R. J.; WOODHEAD, J.; ENGELHARDT, M.; KRÄHENBÜHL, S.; MAURER, M. Mechanisms of hepatotoxicity associated with the monocyclic β-lactam antibiotic BAL30072. **Archives of Toxicology**, p. 1-16, 2017.

PARVEZ, S.; KHAN, A. U. Hospital sewage water: a reservoir for variants of New Delhi metallo-β-lactamase (NDM)- and extended-spectrum β-lactamase (ESBL)-producing *Enterobacteriaceae*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 51, p. 82-88, 2018.

PATERSON, D. L.; KO, W. C.; GOTTBERG, A. V.; MOHAPATRA, S.; CASELLAS, J. M.; GOOSSENS, H.; MULAZIMOGLU, L.; TRENHOLME, G.; KLUGMAN, K. P.; BONOMO, R. A.; RICE, L. B.; WAGENER, M. M.; MCCORMACK, J. G.; YU, V. L. Antibiotic Therapy for *Klebsiella pneumoniae* Bacteremia: Implications of Production of Extended-Sprectrum β-Lactamase. **Clinical Infectious Diseases**, v. 39, p. 31-37, 2004.

PAVEZ, M.; NEVES, P.; DROPA, M.; MATTÉ, M. H.; GRINBAUM, R. S.; ARAÚJO, M. R. E.; MAMIZUKA, E. M.; LINCOPAN, N. Emergence of carbapenem-resistant *Escherichia coli* producing CMY-2-type AmpC β-lactamase in Brazil. **Journal of Medical Microbiology**, v. 57, n. 12, p. 1590-1592, 2008.

PAWLOWSKI, A. C.; JOHNSON, J. W.; WRIGHT, G. D. Evolving medicinal chemistry strategies in antibiotic Discovery. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 42, p. 108-117, 2016.

PIRES, J.; NOVAIS, A.; PEIXE, L. Blue-Carba, an easy biochemical test for detection of diverse carbapenemase producers directly from bacterial cultures. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 12, p. 4281-4283, 2013.

POIREL, L.; FERNÁNDEZ, J.; NORDMANN, P. Comparison of three biochemical tests for rapid detection of extended-spectrum-β-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 54, n. 2, p. 423-427, 2016.

POIREL, L.; HÉRITIER, C.; TOLÜN, V.; NORDMANN, P. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 1, p. 15-22, 2004.

POIREL, L.; NAAS, T.; NORDMANN, P. Diversity, epidemiology, and genetics of Class D β-lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 1, p. 24-38, 2010.

POIREL, L.; NORDMANN, P.; LAGRUTTA, E.; CLEARY, T.; MUNOZ-PRICE, L. S. Emergence of KPC-producing *Pseudomonas aeruginosa* in the United States. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 54, n. 7, p. 3072, 2010.

POTTER, R. F.; D'SOUZA, A. W.; DANTAS, G. The rapid spread of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. **Drug Resistance Updates**, v. 29, p. 30-46, 2016.

POURMAND, A.; MAZER-AMIRSHASHI, M.; JASANI, G.; MAY, L. Emerging trends in antibiotic resistance: implications for emergency medicine. **American Journal of Emergency Medicine**, v. 35, n. 8, p. 1172-1176, 2017.

PRADO, T.; PEREIRA, W. C.; SILVA, D. M.; SEKI, L. M.; CARVALHO, A. P. D. A.; ASENSI, M. D. Detection of extended-spectrum β-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in effluents and sludge of a hospital sewage treatment plant. **Letters in Applied Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 136-141, 2008.

PROIA, L.; ANZIL, A.; SUBIRATS, J.; BORREGO, C.; FARRÈ, M.; LLORCA, M.; BALCÁZAR, J. L.; SERVAIS, P. Antibiotic resistance in urban and hospital wastewaters and their impact on a receiving freshwater ecosystem. Chemosphere, v. 206, p. 70-82, 2018.

QUADRI, F.; MAZER-AMIRSHAHI, M.; FOX, E. R.; HAWLEY, K. L.; PINES, J. M.; ZOCCHI, M. S.; MAY, L. Antibacterial drug shortages from 2001 to 2013: implications for clinical pratice. **Clinical Infectious Diseases**, v. 60, n. 12, p. 1737-1742, 2015.

RABBANI, M. A. G.; HOWLADER, Z. H.; KABIR, Y. Detection of multidrug resistant (MDR) bacteria in untreated waste water disposals of hospitals in Dhaka City, Bangladesh. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 10, p. 120-125, 2017.

RAHMAN, M.; PRASAD, K. N.; GRUPTA, S.; SINGH, S.; SINGH, A.; PATHAK, A.; GUPTA, K. K.; AHMAD, S.; ZORN, B. G. Prevalence and molecular characterization of New Delhi Metallo-β-lactamases in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* from India. **Microbial Drug Resistance**, p. 1-7, 2017.

RAHMAN, T.; YARNALL, B.; DOYLE, D. A. Efflux drug transportes at the forefront of antimicrobial resistance. **European Biophysics Journal**, v. 46, p. 647-653, 2017.

RICHMOND, M. H. Purification and properties of the exopenicillinase from *Staphylococcus aureus*. **The Biochemical Journal**, v. 88, p. 452-459, 1963.

RIZZO, L.; MANAIA, C.; MERLIN, C.; SCHWARTZ, T.; DAGOT, C.; PLOY, M. C.; MICHAEL, I.; FATTA-KASSINOS, D. Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: A review. **Science of the Total Environment**, v. 447, p. 345-360, 2013.

ROCHA, D. A. C.; CAMPOS, J. C.; PASSADORE, L. F.; SAMPAIO, S. C. F.; NICODEMO, A. C.; SAMPAIO, J. L. M. Frequency of plasmid-mediated AmpC β-lactamases in *Escherichia coli* isolates from urine samples in São Paulo, Brazil. **Microbial Drug Resistance**, v. 22, n. 4, p. 321-327, 2016.

ROCHA, F. R. R.; PINTO, V. P. T.; BARBOSA, F. C. B. The spread of CTX-M-type extended-spectrum β-lactamase in Brazil: a systematic review. **Microbial Drug Resistance**, v. 22, n. 4, p. 301-311, 2016.

RÖDEROVÁ, M.; SEDLÁKOVÁ, M. H.; PUDOVÁ, V.; HRICOVÁ, K.; SILOVÁ, R.; IMWENSI, P. E. O.; BARDOŇ, J.; KOLÁŘ, M. Occurrence of bacteria producing broad-spectrum beta-lactamases and *qnr* genes in hospital and urban wastewater samples. **New Microbiologica**, v. 39, n. 2, p. 124-133, 2016.

RODRÍGUEZ-BAÑO, J.; GUTIÉRREZ-GUTIÉRREZ, B.; MACHUCA, I.; PASCUAL, A. Treatment of infections caused by extended-spectrum-beta-lactamase-, AmpC-, and Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 31, n. 2, p. 1-42, 2018.

RODRIGUEZ-MOZAZ, S.; CHAMORRO, S.; MARTI, E.; HUERTA, B.; GROS, M.; SÀNCHEZ-MELSIÓ, A.; BORREGO, B.; BARCELÓ, D.; BALCÁZAR, J. L. Occurence of antibiotics and antibiotic resistance genes in hospital and urban wastewaters and their impact on the receiving river. **Water Research**, v. 69, p. 234-242, 2015.

ROTONDO, C. M.; WRIGHT, G. D. Inhibitors of metallo-β-lactamases. **Current Opinion in Microbiology**, v. 39, p. 96-105, 2017.

SAMPAIO, J. L. M.; GALES, A. C. Antimicrobial resistance in *Enterobacteriaceae* in Brazil: focus on β-lactams and polymyxins. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 31-37, 2016.

SAMPAIO, J. L. M.; RIBEIRO, V. B.; CAMPOS, J. C.; ROZALES, F. P.; MAGAGNIN, C. M.; FALCI, D. R.; SILVA, R. C. F.; DALAROSA, M. G.; LUZ, D. I.; VIEIRA, F. J.; ANTOCHEVIS, L. C.; BARTH, A. L.; ZAVASCKI, A. P. Detection of OXA-370, an OXA-48-related Class D β-lactamase, in *Enterobacter hormaechei* from Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 6, p. 3566-3567, 2014.

SANCHEZ- D. G.; MELO, F. M.; SAVAZZI, E. A.; STEHLING, E. G. Detection of different β-lactamases encoding genes, including bla_{NDM}, and plasmid-mediated quinolone resistance genes in different water sources from Brazil. **Environmental Monitoring Assessment**, v.190, n. 7, p. 1-8, 2018.

SCHAAR, V.; UDDBÄCK, I.; NORDSTRÖM, T.; RIESBECK, K. Group A streptococci are protected from amoxicillin-mediated killing by vesicles containing β-lactamases derived from *Haemophilus influenzae*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, p. 117-120, 2014.

SENG, P.; THERON, F.; HONNORAT, E.; PROST, D.; FOURNIER, P. E.; STEIN, A. *Raoultella ornithinolytica*: An unusual pathogen for prosthetic joint infection. **IDCases**, v. 5, p.46-48, 2016.

SHAIKH, S.; FATIMA, J.; SHAKIL, S.; RIZVI, S. M. D.; KAMAL, M. A. Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: types, epidemiology and treatment. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 22, n. 1 p. 90-101, 2015.
SHARMA, V. K.; JOHNSON, N.; CIZMAS, L.; MCDONALD, T. J.; KIM, H. A review of the influence of treatment strategies on antibiotic resistant bacteria and antibiotic resistance genes. **Chemosphere**, v. 150, p. 702-714, 2016.

SISTEMA INTEGRADO DE GERENCIAMENTO DE RECURSOS HÍDRICOS DO ESTADO DE SÃO PAULO (SIGRH). Disponível em: http://www.sigrh.sp.gov.br/cbhpardo/apresentacao. Acesso em: 03 de janeiro de 2018.

SPANU, T.; LUZZARO, F.; PERILLI, M.; AMICOSANTE, G.; TONIOLO, A.; FADDA, G. Occurrence of extended-spectrum β-lactamases in members of the family Enterobacteriaceae in Italy: implications for resistance to β-lactams and other antimicrobial drugs. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 1, p. 196-202, 2002.

SPRATT, B. G. Penicillin-binding Proteins and the future of β-Lactam Antibiotics. **Journal of General Microbiology**, v. 129, p. 1247-1260, 1983.

SPRATT, B. G. Properties of the Penicillin-Binding Proteins of *Escherichia coli* K12. **European Journal of Biochemistry**, v. 72, p. 341-352, 1977.

SYKES, R. B.; BONNER, D. P.; BUSH, K.; GEORGOPAPADAKOY, N. H. Azthreonam (SQ 26,776), a synthetic monobactam specifically active against aerobic Gram-negative bacteria. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 21, n. 1, p. 85-92, 1982.

SZEKERES, E.; BARICZ, A.; CHIRIAC, C. M.; FARKAS, A.; OPRIS, O.; SORAN, M. L.; ANDREI, A. S.; RUDI, K.; BALCÁZAR, J. L.; DRAGOS, N.; COMAN, C. Abundance of antibiotics, antibiotic resistance genes and bacterial community composition in wastewater effluents from different Romanian hospitals. **Environmental Pollution**, v. 225, p. 304-315, 2017.

TACÃO, M.; MOURA, A.; CORREIA, A.; HENRIQUES, I. Co-resistance to different classes of antibiotics among ESBL-producers from aquatic systems. **Water Research**, v. 48, p. 100-107, 2014.

TAVARES, C. P.; PEREIRA, P. S.; MARQUES, E. D. E. A.; FARIA, C. J. R.; DE SOUZA, M. D. A. P.; DE ALMEIDA, R.; ALVES, C. D. E. F.; ASENSI, M. D.; CARVALHO-ASSEF, A. P. Molecular epidemiology of KPC-2-producing *Enterobacteriaceae* (non-*Klebsiella pneumoniae*) isolated from Brazil. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, v. 82, n. 4, p. 326-330, 2015.

TONANI, K. A.; JULIÃO, F. C.; TREVILATO, T. M.; TAKAYANAGUI, A. M.; BOCIO, A.; DOMINGO, J. L.; SEGURA-MUÑOZ, S. I. Behavior of metals, pathogen parasites, and indicator bacteria in sewage effluents during biological treatment by activated sludge. **Biological Trace Element Research**, v. 143, n. 2, p. 1193-201, 2011.

TONANI, K. A.; PADULA, J. A.; JULIÃO, F. C.; FREGONESI, B. M.; ALVES, R. I. SAMPAIO, C. F.; BEDA, C. F.; HACHICH, E. M.; SEGURA-MUÑOZ, S. I. Persistence of

Giardia, *Cryptosporidium*, Rotavirus, and Adenovirus in treated sewage in São Paulo state, Brazil. **Journal of Parasitology**, v. 99, n. 6, p. 1144-1147, 2013.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia.** Porto Alegre: Artmed. 12 ed. 2016. 964f.

VAIDYA, V. Horizontal transfer of antimicrobial resistance by extended-spectrum β lactamase-producing *Enterobacteriaceae*. **Journal of Laboratory Physicians**, v. 3, n. 1, p. 37-42, 2011.

VAZ-MOREIRA, I.; VARELA, A. R.; PEREIRA, T. V.; FOCHAT, R. C.; MANAIA, C. M. Multidrug resistance in quinolone-resistant Gram-negative bacteria isolated from hospital effluent and the municipal wastewater treatment plant. **Microbial Drug Resistance**, v. 22, n. 2, p. 155-153, 2016.

VINHAS, S. A.; ALMEIDA, D. F. Plasmid-mediated antibiotic resistance and colicinogeny among *Salmonellae* in Rio de Janeiro, Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 56, n. 3, p. 319-322, 1984.

VON SPERLING, M. **Introdução a qualidade das águas e ao tratamento de esgotos**. 3 ed. Belo Horizonte: UFMG, 2005. 452p.

WANG, Q.; WANG, P.; YANG, Q. Occurrence and diversity of antibiotic resistance in untreated hospital wastewater. **Science of the Total Environment**, v. 621, p. 990-999, 2018.

WANG, X.; ZHANG, F.; ZHAO, C.; WANG, Z.; NICHOLS, W. W.; TESTA, R.; LI, H.; CHEN, H.; HE, W.; WANG, Q.; WANG, H. *In vitro* activities of ceftazidime-avibactam and aztreonam-avibactam against 372 Gram-negative bacilli collected in 2011 and 2012 from 11 teaching hospital in China. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 3, p. 1774-1778, 2014.

WATKINS, R. R.; BONOMO, R. A. Overview: global and local impact of antibiotic resistance. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 30, n. 2, p. 313-322, 2016.

WIEGAND, I.; GEISS, H. K.; MACK D.; STÜRENBURG, E.; SEIFERT, H. Detection of extended-spectrum beta-lactamases among *Enterobacteriaceae* by use of semiautomated microbiology systems and manual detection procedures. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 4, p. 1167-1174, 2007.

WILLEMS, E.; VERHAEGEN, J.; MAGERMAN, K.; NYS, S.; CARTUYVELS, R. Towards a phenotypic screening strategy for emerging β-lactamases in Gram-negative bacilli. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 41, n. 2, p. 99-109, 2013.

WOODFORD, N.; FAGAN, E. J.; ELLINGTON, M. J. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding CTX-M extended-spectrum β-lactamases. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 57, p. 154-155, 2006.

World Health Organization. **WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed**. Disponível em: <

http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/en/>. Acesso em: 24 de outubro de 2017.

YAMAKAWA, K.; YAMAGISHI, Y.; MIYATA, K.; SHIMOMURA, Y.; IWATA, A.; HORI, T.; MIKAMO, H.; OKUMURA, A. Bacteremia caused by *Raoultella ornithinolytica* in two children. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 35, n. 4, p. 452-453, 2016.

YIGIT, H.; QUEENAN, A. M.; ANDERSON, G. J.; DOMENCH-SANCHEZ, A.; BIDDLE, J. W.; STEWARD, C. D.; ALBERTI, S.; BUSH, K.; TENOVER, F. C. Novel carbapenem-hydrolyzing β-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy,** v. 45, n. 4, p. 1151-1161, 2001.

YONG, D.; TOLEMAN, M. A.; GISKE, C. G.; CHO, H. S.; SUNDMAN, K.; LEE, K.; WALSH, T. R. Characterization of a new metallo-β-lactamase gene, $bla_{\text{NDM-1}}$, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 12, p. 5046-5054, 2009.

ZHENG, B.; ZHANG, J.; JI, J.; FANG, Y.; SHEN, P.; YING, C.; LV, J.; XIAO, Y.; LI, L. Emergence of *Raoultella ornithinolytica* coproducing IMP-4 and KPC-2 carbapenemases in China. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 11, p. 7086-7089, 2015.