

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENFERMAGEM DE RIBEIRÃO PRETO

GUILHERME SGOBBI ZAGUI

**Antibióticos e bactérias multirresistentes em esgoto e águas superficiais receptoras:
riscos da propagação de genes codificadores de ESBL, de carbapenemases e de
tolerância aos metais no contexto da Saúde Única**

RIBEIRÃO PRETO

2022

GUILHERME SGOBBI ZAGUI

**Antibióticos e bactérias multirresistentes em esgoto e águas superficiais receptoras:
riscos da propagação de genes codificadores de ESBL, de carbapenemases e de
tolerância aos metais no contexto da Saúde Única**

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

Linha de pesquisa: Saúde Ambiental e Vigilância
em Saúde

Orientador: Susana Inés Segura-Muñoz

Coorientador: Leonardo Neves Andrade

Ribeirão Preto

2022

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

Antibióticos e bactérias multirresistentes em esgoto e águas superficiais receptoras: riscos da propagação de genes codificadores de ESBL, de carbapenemases e de tolerância aos metais no contexto da Saúde Única Ribeirão Preto, 2022.

113 p. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto/USP.
Área de concentração: Enfermagem em Saúde Pública.

Orientador: Susana Inés Segura-Muñoz

Coorientador: Leonardo Neves Andrade

1. Antibióticos. 2. Metais. 3. Bactérias resistentes. 4. Matrizes aquáticas. 5. Saúde Única

ZAGUI, Guilherme Sgobbi

Antibióticos e bactérias multirresistentes em esgoto e águas superficiais receptoras: riscos da propagação de genes codificadores de ESBL, de carbapenemases e de tolerância aos metais no contexto da Saúde Única

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

Aprovado em / /

Presidente

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Comissão Julgadora

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!

Agradecimento especial

À minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Susana Inés Segura-Muñoz, que durante todo o período que estivemos juntos confiou em mim. Agradeço pela excelente orientação desde a Iniciação Científica e que se conclui hoje, com o Doutorado. Agradeço por conceder-me um dos bens mais preciosos que existe, o conhecimento! Agradeço não somente por ser orientadora, mas também por todos esses anos de cumplicidade e amizade que me ofereceu. Se há um profissional em que tenho como referência, esse profissional é você, um exemplo de professora, orientadora, pesquisadora, de ser humano.

Você é incrível!

Obrigado por tudo!

Agradecimentos

*Ao meu companheiro da vida **Guilherme Luís Silva** por me manter firme e fazer eu acreditar que conseguiria concluir com êxito mais essa etapa de minha vida, de nossas vidas. Obrigado por nunca ter soltado minha mão, por sempre ter mostrado os caminhos, mesmo quando tudo estava obscuro. Obrigado do fundo do meu coração pelo apoio incrível que me levaram a ter forças para concluir o Doutorado. Agradeço por todo o amor, carinho e cumplicidade. Você é parte disso! Muito obrigado!*

*Aos meus pais, **Elaine e Valdir**, e à minha irmã, **Natália**, por todo o incentivo, fazendo-me buscar todos os dias conhecimento e crescimento pessoal e acadêmico. Muito obrigado!*

*Ao meu co-orientador **Prof. Dr. Leonardo Neves de Andrade** por todos os ensinamentos sobre resistência bacteriana e direcionamentos do estudo. Espero ter alcançado às expectativas e agradeço por toda disponibilidade, confiança e por estender a mão sempre que precisei. Muito obrigado!!*

*Aos meus amigos do Laboratório de Ecotoxicologia e Parasitologia Ambiental, **Brisa, Thaís, Carol, Sabrina, Gabriel e Guilherme Gomes** pelas inúmeras conversas, apoio e companheirismo. Vocês tornaram os dias de trabalho mais descontraídos. Ao **Guilherme C. Della Torre** pela ajuda ímpar durante as coletas e processamentos das amostras. Muito obrigado!*

*Ao **Danilo Vitorino dos Santos** por toda amizade ao longo de minha vida acadêmica, por me incentivar, por sempre ter estendido as mãos em momentos de necessidade e pela inestimável ajuda nas análises cromatográficas para determinação de antibióticos. Você é parte desse trabalho! Muito obrigado!*

*À **Natália Columbaro Moreira** por toda cumplicidade, irmandade, pelos momentos de desabafo, mas também pelos momentos de alegrias que foram muitos. Serei eternamente grato pelo auxílio na investigação dos genes de resistência. Sem você, esse trabalho não estaria completo. Muito obrigado!!!!*

À Prof.^a Dr.^a Ana Lúcia Costa Darini, por abrir as portas de seu laboratório para realização das análises moleculares. É sempre um aprendizado estar com a senhora! Que tenhamos essa parceria muitos anos! Muito obrigado por tudo!

À Prof.^a Dr.^a Priscyla Daniely Marcato Gaspari por abrir as portas de seu laboratório e permitir que as análises para determinação de antibióticos fossem realizadas. À Tais Nader Chrysostomo Massaro pela valiosa contribuição durante todo o estudo de antibióticos, pelos dias dedicados em frente ao cromatógrafo para me ajudar. Muito obrigado!!!

Ao Paulo Sérgio por todo o auxílio durante as coletas de amostras de esgoto hospitalar. 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 Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da Bolsa de Doutorado (Processo: 2019/05938-3) e Auxílio Regular (Processo: 2019/18663-2), que proporcionaram a realização desse estudo. Muito obrigado!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

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

À Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, pela oportunidade!

Meus sinceros agradecimentos!

RESUMO

ZAGUI, Guilherme Sgobbi. **Antibióticos e bactérias multirresistentes em esgoto e águas superficiais receptoras: riscos da propagação de genes codificadores de ESBL, de carbapenemases e de tolerância aos metais no contexto da Saúde Única.** 2022. 113f. Tese (Doutorado em Enfermagem em Saúde Pública) – Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

Os antibióticos estão compreendidos entre as classes de medicamentos de maior sucesso na medicina, pelo tratamento de infecções bacterianas e consequentemente aumento na expectativa de vida da população. No entanto, seu uso exacerbado desde a sua descoberta promoveram a inserção de antibióticos no ambiente, bem como dispersão global de bactérias resistentes. Como medida à escassez de novos antibióticos, os metais têm sido considerados como potenciais agentes antimicrobianos, no entanto mecanismos de tolerância vêm sendo relatados, mas com distribuição epidemiológica desconhecida. Nesse sentido, os objetivos do presente trabalho foi de avaliar a ocorrência de antibióticos, de bactérias resistentes e de determinantes de resistência aos antibióticos e de tolerância à metais em amostras de esgoto hospitalar, sanitário e água superficial, no contexto da Saúde Única. No total, 10 antibióticos de diferentes classes foram avaliados em sistema de cromatografia líquida de ultra performance acoplado à espectrometria de massas (UPLC-MS) e bactérias resistentes foram isoladas e quantificadas a partir de meios cromogênicos seletivos para bactérias produtoras de ESBL e de carbapenemases. Os isolados obtidos foram submetidos ao teste de susceptibilidade aos antibióticos, bem como à detecção de genes de resistência aos antibióticos e de tolerância à metais, por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Os antibióticos amoxicilina e ampicilina foram encontrados em altas concentrações, variando entre 131,5 e 1896,29 ng L⁻¹ e entre 366,35 e 1113,07 ng L⁻¹, respectivamente. Os antibióticos ciprofloxacina, sulfametoxazol e tetraciclina também foram detectados. O percentual de remoção dos antibióticos no efluente tratado consiste de 53,43% para amoxicilina, 16,88% para ampicilina, 95,6% para sulfametoxazol e de 65,5% para tetraciclina. O perfil das concentrações de bactérias fenotipicamente produtoras de ESBL e de carbapenemases foram semelhantes, sendo de maior ocorrência no esgoto hospitalar. Deve-se destacar que o sistema municipal de tratamento de esgoto não apresentou eficiência na remoção dessas bactérias e altas concentrações foram detectadas no efluente tratado (ESBL: 3.80E+08, KPC: 6.17E+08 UFC/100mL). Foi possível verificar que as concentrações de bactérias resistentes à jusante da ETE foram maiores em relação às concentrações de bactérias à montante, evidenciando um possível impacto do lançamento do efluente tratado no corpo hídrico. Com relação ao fenótipo de resistência, os isolados apresentaram resistência majoritariamente aos antibióticos β-lactâmicos, seguido por antibióticos da classe das quinolonas. Foi calculado o índice de resistência à múltiplos antibióticos (MAR Index), onde verificou-se que todos os pontos de amostragem configuraram como fontes de alto risco para resistência bacteriana. Quanto à detecção molecular de genes de resistência aos antibióticos, verificou-se que 51% dos isolados ($n = 55/108$) carregavam o gene codificador de carbapenemase *bla*_{KPC} e 33% dos isolados ($n = 36/108$) abrigavam o gene codificador de ESBL *bla*_{CTX-M} dos grupos 1 ou 8. Em menores porcentagens foram detectados os genes *bla*_{GES} (2,8%), *bla*_{NDM} (1,9%) e *bla*_{VIM} (0,9%), sendo esses dois últimos genes codificadores de carbapenemases do tipo metallo-β-lactamase que são considerados pouco frequentes. Com relação aos genes de tolerância à metais, genes que conferem tolerância à prata, ao cobre e ao mercúrio foram detectados respectivamente em 52%, 50% e 28% dos isolados. Uma correlação forte foi verificada na coexistência entre os genes de tolerância à prata (*silA*) e de tolerância ao cobre (*pcoD*) ($r = 0,85$). Os resultados apontam para a disseminação de bactérias resistentes aos antibióticos nas matrizes avaliadas, com predominância de genes codificadores de

carbapenemases. Em termos de saúde pública, os dados levantados apontam para uma emergência sanitária, em que medidas de mitigação precisam ser urgentemente aderidas. Nesse sentido, e em consonância com a abordagem de Saúde Única, propõe-se a necessidade de tratamento do efluente hospitalar, bem como adição de tratamento terciário na ETE. A colaboração integrada entre os setores da saúde pública, veterinária e ambiental são fundamentais para frear essa “pandemia silenciosa”.

Palavras-chave: antibióticos, metais, bactérias resistentes, matrizes aquáticas, Saúde Única.

ABSTRACT

ZAGUI, Guilherme Sgobbi. **Antibiotics and multidrug-resistant bacteria in sewage and receiving surface waters: risks of spreading genes encoding ESBL, carbapenemases and metal tolerance in the context of One Health.** 2022. 113f. Thesis (PhD in Public Health Nursing) – Ribeirão Preto College of Nursing, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

Antibiotics are among the most successful classes of drugs in medicine, by treating bacterial infections and consequently increasing the life expectancy of the population. However, their exacerbated use since their discovery has promoted the insertion of antibiotics into the environment, as well as global dispersion of resistant bacteria. As a measure to the scarcity of new antibiotics, metals have been considered as potential antimicrobial agents, however, tolerance mechanisms have been reported, but with unknown epidemiological distribution. In this sense, the objectives of the present work were to evaluate the occurrence of antibiotics, resistant bacteria, and determinants of antibiotic resistance and metal tolerance in samples of hospital wastewater, urban wastewater, and surface water, in the context of One Health. In total, 10 antibiotics of different classes were evaluated in ultra-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry (UPLC-MS) and resistant bacteria were quantified and isolated from chromogenic media selective for bacteria producing ESBL and carbapenemases. The isolates obtained were subjected to antibiotic susceptibility testing, as well as detection of antibiotic resistance and metal tolerance genes by Polymerase Chain Reaction (PCR). The antibiotics amoxicillin and ampicillin were found in high concentrations, ranging between 131.5 and 1896.29 ng L⁻¹ and between 366.35 and 1113.07 ng L⁻¹, respectively. The antibiotics ciprofloxacin, sulfamethoxazole, and tetracycline were also detected. The removal percentage of the antibiotics in the treated effluent consists of 53.43% for amoxicillin, 16.88% for ampicillin, 95.6% for sulfamethoxazole, and 65.5% for tetracycline. The concentration profiles of phenotypically ESBL- and carbapenemase-producing bacteria were similar, with higher occurrence in hospital wastewater. It should be noted that the municipal sewage treatment system did not show efficiency in removing these bacteria and high concentrations were detected in the treated effluent (ESBL: 3.80E+08, KPC: 6.17E+08 CFU/100mL). It was possible to verify that the concentrations of resistant bacteria downstream of the WWTP were higher in relation to the concentrations of bacteria upstream, showing a possible impact of the discharge of the treated effluent into the water body. Regarding the resistance phenotype, the isolates showed resistance mostly to β -lactam antibiotics, followed by quinolone class antibiotics. The multiple antibiotic resistance index (MAR Index) was calculated, where it was verified that all sampling points configured as high-risk sources for bacterial resistance. Regarding the molecular detection of antibiotic resistance genes, it was found that 51% of isolates (n = 55/108) carried the carbapenemase encoding gene *bla*_{KPC} and 33% of isolates (n = 36/108) harbored the ESBL encoding gene *bla*_{CTX-M} from groups 1 or 8. In smaller percentages, *bla*_{GES} (2.8%), *bla*_{NDM} (1.9%) and *bla*_{VIM} (0.9%) genes were detected, these last two genes encoding carbapenemases of the metallo- β -lactamase type that are considered infrequent. Regarding metal tolerance genes, genes conferring tolerance to silver, copper and mercury were detected in 52%, 50% and 28% of isolates, respectively. A strong correlation was verified in the coexistence between silver tolerance (*silA*) and copper tolerance (*pcoD*) genes (r = 0.85). The results point to the spread of antibiotic-resistant bacteria in the evaluated matrices, with a predominance of genes encoding carbapenemases. In terms of public health, the data raised point to a health emergency, in which mitigation measures need to be urgently adhered to. In this sense, and in line with the One Health approach, the need for treatment of the hospital effluent is proposed, as well as the addition of tertiary treatment in the WWTP. The integrated

collaboration between the public health, veterinary, and environmental sectors are fundamental to curb this "silent pandemic".

Keywords: antibiotic, metals, resistant bacteria, aquatic matrices, One Health.

RESUMEN

ZAGUI, Guilherme Sgobbi. **Antibióticos y bacterias multirresistentes en aguas residuales y aguas superficiales receptoras: riesgos de la propagación de genes que codifican ESBL, carbapenemasas y tolerancia a los metales en el contexto de "Una Salud"**. 2022. 113f. Tesis (Doctorado en Enfermería de Salud Pública) - Escuela de Enfermería de Ribeirão Preto, Universidad de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

Los antibióticos se encuentran entre las clases de fármacos de mayor éxito en medicina, para tratar infecciones bacterianas y, en consecuencia, aumentar la esperanza de vida de la población. Sin embargo, su uso exacerbado desde su descubrimiento promovió la inserción de antibióticos en el medio ambiente, así como la dispersión global de bacterias resistentes. Como medida a la escasez de nuevos antibióticos, los metales han sido considerados como potenciales agentes antimicrobianos, sin embargo, se han reportado mecanismos de tolerancia, pero con una distribución epidemiológica desconocida. En este sentido, los objetivos de este trabajo fueron evaluar la presencia de antibióticos, bacterias resistentes y determinantes de la resistencia a los antibióticos y la tolerancia a los metales en muestras de aguas residuales hospitalarias, aguas residuales urbanas y aguas superficiales, en el contexto de Una Salud. En total, se evaluaron 10 antibióticos de distintas clases en un sistema de cromatografía líquida de ultra rendimiento acoplado a espectrometría de masas (UPLC-MS) y se cuantificaron y aislaron bacterias resistentes a partir de medios cromogénicos selectivos para bacterias productoras de BLEE y carbapenemasas. Los aislados obtenidos se sometieron a pruebas de susceptibilidad a los antibióticos, así como a la detección de genes de resistencia a los antibióticos y de tolerancia a los metales, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los antibióticos amoxicilina y ampicilina se encontraron en concentraciones elevadas, entre 131,5 y 1896,29 ng L⁻¹ y entre 366,35 y 1113,07 ng L⁻¹, respectivamente. También se detectaron los antibióticos ciprofloxacina, sulfametoxazol y tetraciclina. El porcentaje de eliminación de antibióticos en el efluente tratado es del 53,43% para la amoxicilina, del 16,88% para la ampicilina, del 95,6% para el sulfametoxazol y del 65,5% para la tetraciclina. Los perfiles de concentración de bacterias fenotípicamente productoras de BLEE y carbapenemasas fueron similares, con una mayor presencia en las aguas residuales hospitalarias. Cabe señalar que el sistema municipal de tratamiento de aguas residuales no mostró eficacia en la eliminación de estas bacterias y se detectaron altas concentraciones en el efluente tratado (ESBL: 3,80E+08, KPC: 6,17E+08 UFC/100mL). Se pudo comprobar que las concentraciones de bacterias resistentes aguas abajo de la EDAR eran superiores a las concentraciones de bacterias aguas arriba, lo que demuestra un posible impacto del vertido del efluente tratado en la masa de agua. En cuanto al fenotipo de resistencia, los aislados mostraron resistencia sobre todo a los antibióticos β-lactámicos, seguidos de los antibióticos de clase quinolona. Se calculó el índice de resistencia a múltiples antibióticos (índice MAR) y se comprobó que todos los puntos de muestreo eran fuentes de alto riesgo de resistencia bacteriana. En cuanto a la detección molecular de genes de resistencia a antibióticos, el 51% de los aislados (n = 55/108) portaban el gen codificador de carbapenemasas blaKPC y el 33% de los aislados (n = 36/108) albergaban el gen codificador de ESBL blaCTX-M de los grupos 1 u 8. En porcentajes menores, se detectaron los genes blaGES (2,8%), blaNDM (1,9%) y blaVIM (0,9%), estos dos últimos genes codifican carbapenemasas del tipo metalo-β-lactamasa que se consideran infrecuentes. En cuanto a los genes de tolerancia a los metales, los genes que confieren tolerancia a la plata, el cobre y el mercurio se detectaron respectivamente en el 52%, el 50% y el 28% de los aislados. Se verificó una fuerte correlación en la coexistencia entre los genes de tolerancia a la plata (silA) y de tolerancia al cobre (pcoD) (r = 0,85). Los resultados apuntan a la diseminación de bacterias resistentes a los antibióticos en las matrices evaluadas, con predominio de genes que codifican carbapenemasas. Desde el

punto de vista de la salud pública, los datos recogidos apuntan a una emergencia sanitaria, en la que urge adoptar medidas paliativas. En este sentido, y en consonancia con el enfoque "Una Salud", se propone la necesidad de tratamiento de los efluentes hospitalarios, así como la adición de tratamiento terciario en la EDAR. La colaboración integrada entre los sectores de la salud pública, la veterinaria y el medio ambiente son fundamentales para frenar esta "pandemia silenciosa".

Palabras-claves: antibióticos, metales, bacterias resistentes, matrices acuáticas, Una Salud.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Classificação dos antibióticos de acordo com seu mecanismo de ação sobre alvos bacterianos.....	21
Figura 2.	Consumo de antibióticos (DDD/1000 habitantes/dia) na Região das Américas, de acordo com o grupo farmacológico.....	22
Figura 3.	Estrutura química dos antibióticos β -lactâmicos.....	23
Figura 4.	Fontes de antibióticos e metais em ambientes aquáticos.....	45
Figura 5.	Rotas de transmissão da resistência antimicrobiana entre humanos, animais e ambiente.....	53
Figura 6.	Pontos de coletas de amostras de esgoto hospitalar e sanitário e de água superficial em Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil.....	59
Figura 7.	Membranas de ésteres de celulose dispostas em meios de cultura cromogênico para isolamento e quantificação (UFC/100mL) de bacilos gram-negativos produtores de ESBL e carbapenemases em amostras de esgoto hospitalar, esgoto sanitário e água superficial. (Esquerda: Meio cromogênico seletivo para bactérias produtoras de ESBL. Direita: Meio cromogênico seletivo para bactérias produtoras de carbapenemases)	63
Figura 8.	Porcentagem de isolados resistentes aos antibióticos, obtidos a partir de esgoto hospitalar, esgoto sanitário e água superficial.....	78
Figura 9.	Perfil de resistência aos antibióticos, MAR Index e genes de resistência aos antibióticos e de tolerância aos metais dos isolados.....	80
Figura 10.	Perfil de resistência aos antibióticos, MAR Index e genes de resistência aos antibióticos e de tolerância aos metais dos isolados do esgoto bruto e tratado.....	81
Figura 11.	Perfil de resistência aos antibióticos, MAR Index e genes de resistência aos antibióticos e de tolerância aos metais dos isolados do Córrego Ribeirão Preto.....	82
Figura 12.	Valores mínimos, máximos e média do MAR Index obtidos a partir do perfil fenotípico de resistência aos antibióticos dos isolados de esgoto hospitalar, sanitário e água superficial.....	84
Figura 13.	Matriz de correlação entre os genes de resistência aos antibióticos e de tolerância aos antibióticos, detectados nos isolados de esgoto hospitalar, sanitário e água superficial.....	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Classificação molecular e funcional das enzimas β -lactamases, com seus respectivos exemplares, substratos e perfis de inibições.....	38
Tabela 2.	Parâmetros analíticos do método multirresíduo para quantificação de antibióticos em matrizes aquáticas.....	60
Tabela 3.	<i>Primers</i> utilizados para amplificação de genes codificadores de ESBL, carbapenemases e de tolerância aos metais.....	66
Tabela 4.	Reagentes utilizados para detecção e amplificação dos genes de resistência aos antibióticos e de tolerância aos metais.....	67
Tabela 5.	Concentrações (ng L^{-1}) de antibióticos em amostras de esgoto hospitalar, sanitário e água superficial.....	69
Tabela 6.	Número Mais Provável (NMP/100mL) de coliformes totais em amostras de esgoto hospitalar, sanitário e água superficial.....	72
Tabela 7.	Número Mais Provável (NMP/100mL) de <i>Escherichia coli</i> em amostras de esgoto hospitalar, sanitário e água superficial.....	72
Tabela 8.	Concentração (UFC/100mL) de bactérias fenotipicamente produtoras (BFP) de ESBL (resistentes às cefalosporinas de amplo espectro) em amostras de esgoto hospitalar, sanitário e água superficial.....	74
Tabela 9.	Concentração (UFC/100mL) de bactérias fenotipicamente produtoras (BFP) de carbapenemases (resistentes aos carbapenêmicos) em amostras de esgoto hospitalar, sanitário e água superficial.....	74

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	18
2.	REVISÃO DE LITERATURA.....	22
2.1.	Compostos com atividade antimicrobiana: antibióticos e metais.....	23
2.1.1.	Antibióticos.....	23
2.1.1.1.	Antibióticos β -lactâmicos.....	25
2.1.1.1.1.	Penicilinas.....	26
2.1.1.1.2.	Cefalosporinas.....	27
2.1.1.1.3.	Carbapenêmicos.....	29
2.1.1.1.4.	Monobactâmicos.....	30
2.1.2.	Metais.....	31
2.1.2.1.	Cobre.....	33
2.1.2.2.	Mercúrio.....	34
2.1.2.3.	Prata.....	35
2.2.	Resistência antimicrobiana: um problema de saúde pública mundial.....	36
2.2.1.	Resistência bacteriana aos antibióticos	37
2.2.1.1.	β -Lactamases.....	40
2.2.2.	Tolerância bacteriana aos metais.....	45
2.2.2.1.	Cobre.....	45
2.2.2.2.	Mercúrio.....	46
2.2.2.3.	Prata.....	47
2.3.	Antibióticos e bactérias resistentes no ambiente: esgoto e água superficial.....	47
2.3.1.	Esgoto hospitalar e sanitário (ETE).....	48
2.3.2.	Água superficial.....	52
2.4.	Saúde Única.....	55
3.	OBJETIVOS.....	58
4.	MATERIAL E MÉTODOS.....	60
4.1.	Local do estudo e amostragem.....	61
4.2.	Análise de antibióticos.....	62
4.3.	Análises microbiológicas.....	64
4.3.1.	Determinação de coliformes totais e <i>Escherichia coli</i>	64
4.3.2.	Determinação de bactérias fenotipicamente produtoras de ESBL e carbapenemases.....	65
4.3.2.1.	Isolamento e identificação bacteriana.....	67
4.3.2.2.	Teste de susceptibilidade aos antibióticos.....	67
4.3.2.3.	Investigação molecular de genes de resistência aos antibióticos e de tolerância aos metais.....	68
4.4.	Análise de dados.....	70
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	71
5.1.	Análise de antibióticos.....	72
5.2.	Análises microbiológicas.....	74
5.2.1.	Ocorrência de coliformes totais e <i>Escherichia coli</i>	74
5.2.2.	Ocorrência de bactérias fenotipicamente produtoras de ESBL e carbapenemases... ..	77
5.2.2.1.	Isolamento e identificação bacteriana.....	79
5.2.2.2.	Susceptibilidade aos antibióticos e presença de genes de resistência aos antibióticos e de tolerância aos metais.....	80
5.3.	Desafios da propagação de antibióticos e bactéria multirresistentes no contexto da Saúde Única.....	92
6.	CONCLUSÕES.....	95
	REFERÊNCIAS.....	98

1. INTRODUÇÃO

A descoberta dos antibióticos representa um dos mais significativos avanços na medicina, por permitir o controle de doenças infecciosas e conseqüentemente aumentar a expectativa de vida da população. Desde sua introdução, os antibióticos são amplamente prescritos na medicina humana e veterinária, inclusive na pecuária como promotor de crescimento e como medida profilática, elevando assim a produção de carne para consumo (FELIS et al., 2020). O uso excessivo e inapropriado dessa classe de medicamento em diferentes setores propicia a emergência de bactérias resistentes, considerando a pressão seletiva que é exercida sob essas bactérias, facilitando a transferência de genes de resistência inter e intra-espécies (MCEWEN; COLLIGNON, 2018). Atualmente, a resistência bacteriana é um problema de saúde pública mundial e, na perspectiva de Saúde Única (*One Health perspective*), é necessário controlar o desenvolvimento e disseminação da resistência bacteriana em diversas esferas, como na saúde humana, na veterinária e no ambiente (MCEWEN; COLLIGNON, 2018).

Embora o uso de antibióticos seja amplamente difundido na comunidade para tratamento de infecções comunitárias, seu uso expressivo em hospitais faz com que resíduos de antibióticos sejam detectados no esgoto hospitalar (FELIS et al., 2020; NGIGI et al., 2020), além de outros fármacos, desinfetantes e metais, oriundos das diversas atividades realizadas nos estabelecimentos assistenciais de saúde (CARRARO et al., 2016). A presença de substâncias com potencial antimicrobiano (ex.: antibióticos e metais) no esgoto hospitalar e sanitário exerce pressão seletiva, que favorece a seleção de bactérias multirresistentes e sua disseminação aquática (HOCQUET; MULLER; BERTRAND, 2016). Nesse sentido, estudos que avaliaram esgoto hospitalar e sanitário de ETEs, em diversos países, mostram a ocorrência de bactérias resistentes carreando genes específicos que conferem resistência as distintas classes de antibióticos, mas especialmente aos antibióticos β -lactâmicos, que são amplamente

utilizados em todo o mundo (BUSH; BRADFORD, 2016; HASSOUN-KHEIR et al., 2020; ORY et al., 2019; RIZZO et al., 2013; ZAGUI et al., 2020).

O amplo uso de antimicrobianos reflete em suas concentrações nos diferentes compartimentos ambientais, como em matrizes aquáticas (FELIS et al., 2020). As estações de tratamento de esgotos (ETEs) são consideradas como a principal fonte de antibióticos em ambientes aquáticos (MANAIA et al., 2018; RIZZO et al., 2013). *A priori*, as ETEs têm o papel essencial de proteção do ambiente, onde a combinação de processos físicos, químicos e biológicos são utilizados para o tratamento do esgoto sanitário com finalidade de remover matéria orgânica, poluentes químicos e microbiológicos (MANAIA et al., 2018; TONANI et al., 2013). Atualmente, a tecnologia mais empregada para o tratamento de esgotos é a tecnologia de lodos ativados e, embora haja alta performance na remoção de matéria orgânica, estudos mostram a persistência de alguns metais, parasitas, antibióticos e bactérias após o tratamento (NGIGI et al., 2020; RODRIGUEZ-MOZAZ et al., 2020; TONANI et al., 2013; TONANI et al., 2011).

Devido a uma carga microbiana abundante em esgotos, as tecnologias empregadas para tratamento não garantem a remoção de microrganismos em sua totalidade (MANAIA et al., 2018). Assim, bactérias resistentes, antibióticos, metais e outros poluentes podem atingir os recursos hídricos, causando diversos impactos na fauna e flora residente. Além de proporcionar a seleção de bactérias resistentes, o lançamento de antibióticos e metais nos recursos hídricos receptores pode afetar a fauna aquática em diferentes níveis tróficos (algas, crustáceos e peixes) devido ao seu potencial de ação biológica, podendo causar efeitos imediatos e a longo prazo (toxicidade aguda e crônica) (FELIS et al., 2020; KOVALAKOVA et al., 2020). Ambientes aquáticos, em geral, permitem o contato célula-a-célula o que facilita a transferência de elementos genéticos móveis (plasmídeos, transposons, integrons) com genes de resistência a antibióticos, inclusive para o microbioma ambiental (KARKMAN et al., 2018).

Além dos riscos associados ao potencial toxicológico aos organismos aquáticos e ao favorecimento da resistência em bactérias, outro ponto que merece destaque é o risco à população que usufrui das águas superficiais possivelmente contaminadas por antimicrobianos e bactérias resistentes, seja através do consumo de peixes, atividades recreativas, ingestão e para produção de hortaliças em áreas ribeirinhas (MCEWEN; COLLIGNON, 2018). Considerando os múltiplos riscos à saúde humana e ambiental é essencial a avaliação desses contaminantes emergentes em esgotos e o impacto causado nos recursos hídricos para propor medidas de contenção e assegurar a qualidade dos rios e minimizar os riscos dos expostos, principalmente em países em desenvolvimento, como o Brasil, onde deficiências sanitárias são comumente observadas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Compostos com atividade antimicrobiana: antibióticos e metais

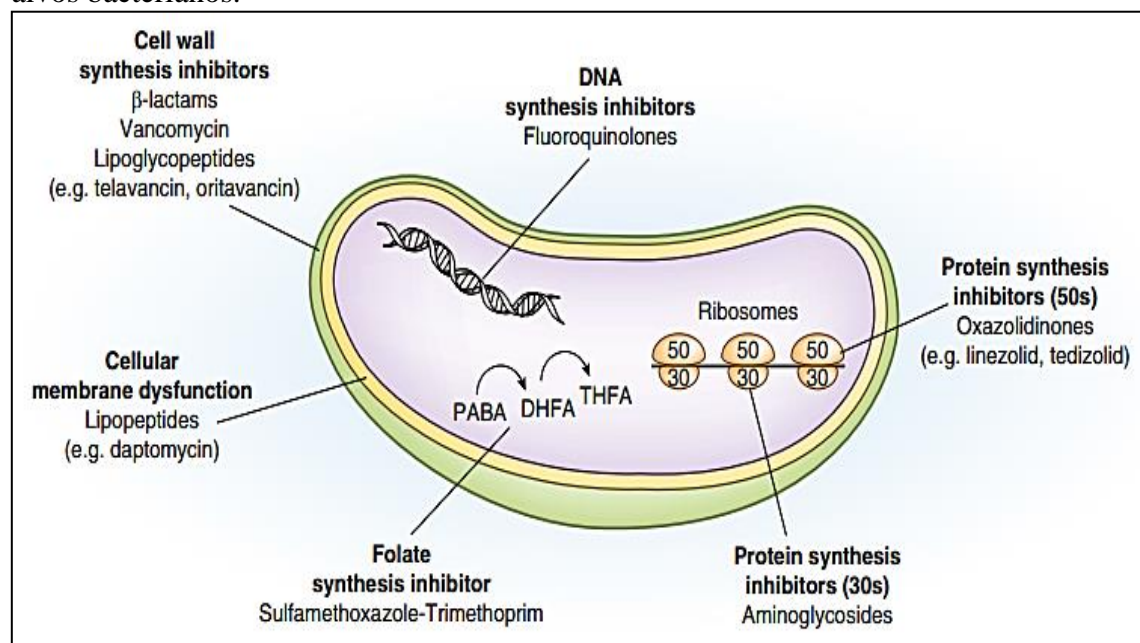
2.1.1. Antibióticos

De acordo com Singh, Young e Silver (2017), um antibiótico ideal é aquele com atividade bactericida ou bacteriostática contra todas as bactérias patogênicas em um hospedeiro, que independe do sítio de infecção, mas que não causa toxicidade e não afeta a microbiota intestinal. Embora não esteja disponível o “antibiótico ideal”, o que existe são antibacterianos com atividade sobre bactérias Gram-positivas e/ou Gram-negativas, mas com sua eficácia comprometida considerando a resistência bacteriana aos antibióticos (SINGH; YOUNG; SILVER, 2017). Os antibióticos são compostos naturais ou de origem (semi)sintética, que exercem atividade sobre bactérias inibindo seu crescimento (bacteriostático) ou a matando (bactericida), e compreendem umas das classes medicamentosas de maior sucesso, sendo utilizados para o tratamento de infecções em humanos e animais, o que permitiu também avanços na área de transplantes, cirurgias, sobrevivência de prematuros e imunodeprimidos, entre outras utilizações (ALÓS, 2015; LIMA et al., 2020).

Antes mesmo de sua ampla utilização na medicina moderna, os antibióticos eram utilizados para tratamento de feridas e queimaduras desde o antigo Egito (DURAND; RAOULT; DUBOURG, 2019). Anteriormente a descoberta e purificação da penicilina por Alexander Fleming em 1928, Joseph Lister, em 1871, curou o ferimento de uma enfermeira com um extrato oriundo de *Penicillium glaucum*, descobrindo, portanto, os efeitos inibitórios desse fungo (DURAND; RAOULT; DUBOURG, 2019). Desde seu advento, muitos antibióticos foram identificados e introduzidos na clínica (era do ouro), com seu pico de descoberta na década de 1950, onde destacam-se as cefalosporinas, quinolonas, glicopeptídeos, polimixinas e macrolídeos (HUTCHINGS; TRUMAN; WILKINSON, 2019).

Além de sua classificação de acordo com a estrutura química, atualmente a classificação mais utilizada dos antibióticos está relacionada com o mecanismo de ação. Os antibióticos podem atuar sobre diferentes sítios na bactéria e possuem espectro de ação distintos, o que reflete diretamente em sua utilização na prática clínica. Os principais efeitos dos antibióticos sobre os alvos vitais bacterianos são: a) inibição da síntese da parede celular (β -lactâmicos), b) disfunção da membrana celular (lipopeptídeos), c) inibição da síntese de folato (sulfonamidas), d) inibição da síntese proteica nas subunidades 30S (aminoglicosídeo) e 50S (oxazolidinonas), e) inibição da síntese do DNA (fluoroquinolonas) (Figura 1) (EYLER; SHVETS, 2019).

Figura 1. Classificação dos antibióticos de acordo com seu mecanismo de ação sobre alvos bacterianos.

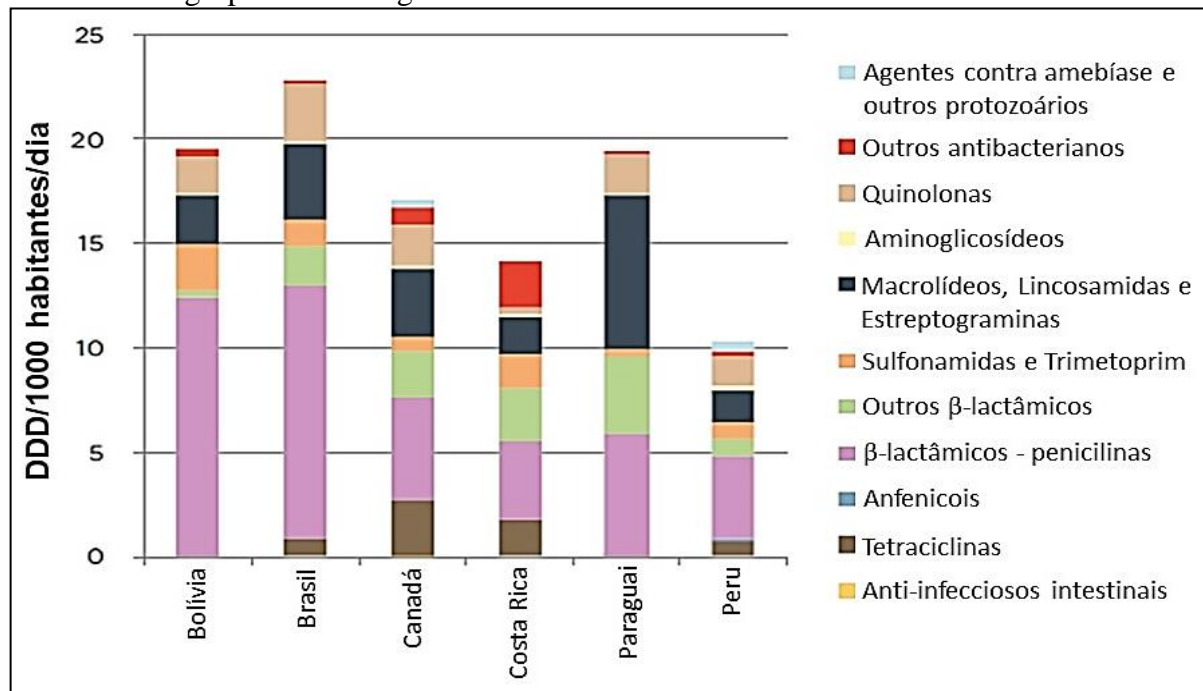


Fonte: EYLER; SHVETS, 2019.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) emitiu o relatório “*WHO Report on Surveillance of Antibiotic Consumption*”, em 2019, que avaliou o consumo de antibióticos em 65 países durante os anos de 2016 a 2018. Neste relatório, Bolívia, Brasil, Canadá, Costa Rica, Paraguai e Peru são os países representantes da Região das Américas e consta que o Brasil é o maior consumidor de antibióticos entre esses países, com uma dose diária definida (DDD/1000

habitantes/dia) de 22,75 (Figura 2), o que representa um consumo de 2.225,47 toneladas (OMS, 2019). Ainda, de acordo com o relatório, a classe de antimicrobianos mais consumida entre os brasileiros são os antibióticos β -lactâmicos, cenário compartilhado por diversos países no continente americano, bem como em outras regiões do mundo (OMS, 2019). Nos Estados Unidos, estima-se que o uso de antibióticos β -lactâmicos seja de 65%, sendo que as cefalosporinas compreendem quase a metade das prescrições, seguida das penicilinas de amplo espectro (BUSH; BRADFORD, 2016).

Figura 2. Consumo de antibióticos (DDD/1000 habitantes/dia) na Região das Américas, de acordo com o grupo farmacológico.



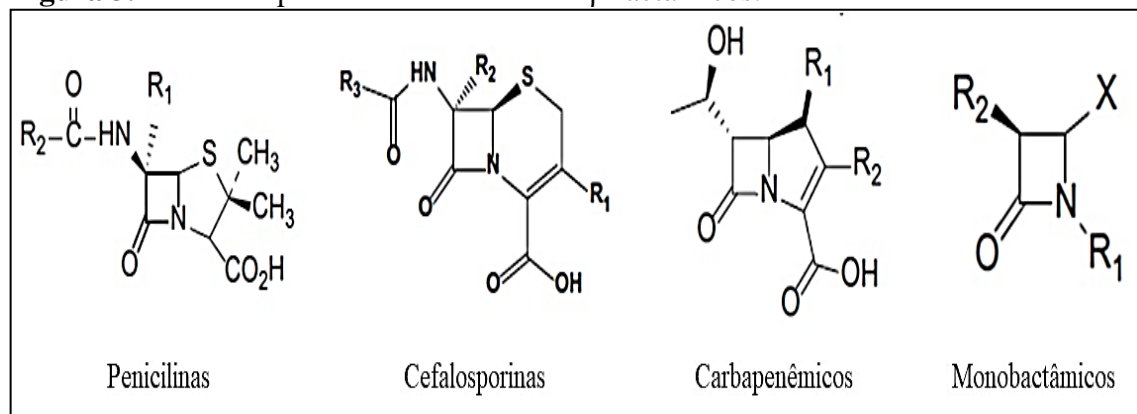
Fonte: Adaptado de “*WHO Report on Surveillance of Antibiotic Consumption*” (OMS, 2019).

2.1.1.1. Antibióticos β -lactâmicos

Como dito anteriormente, os antibióticos β -lactâmicos são os mais prescritos na medicina humana, devido à algumas características como atividade bactericida, amplo espectro de ação e baixa toxicidade relacionada (BUSH; BRADFORD, 2016). Os antibióticos β -lactâmicos inibem o crescimento bacteriano (bactericida) devido à inibição da síntese da parede

celular por meio da ligação com proteínas de ligação à penicilina (PBP, do inglês *penicillin-binding proteins*), que são responsáveis pela sintetização e remodelamento do peptidoglicano (SINGH; YOUNG; SILVER, 2017). Em bactérias gram-negativas, o efeito bactericida dos antibióticos β -lactâmicos pode resultar da inibição de uma ou mais PBPs: PBPs 1a e 1b que estão relacionadas com a lise celular; PBP 2, que, quando inibida, impede a divisão celular, com a consequente formação de células esféricas; e PBP 3, que impede a divisão celular e formação de filamentos, quando inibida (SAUVAGE; TERRAK, 2016; SPRATT, 1977; SPRATT, 1983). Esses antibióticos podem ser divididos em quatro classes – penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e monobactâmicos – que possuem em comum um anel β -lactâmico em sua estrutura química (Figura 3) (BUSH; BRADFORD, 2020).

Figura 3. Estrutura química dos antibióticos β -lactâmicos.



Fonte: Adaptado de BUSH; BRADFORD, 2016.

2.1.1.1.1. Penicilinas

A penicilina foi descoberta acidentalmente por Alexander Fleming no fim da década de 1920, por meio de experimentos com *Staphylococcus aureus*, onde observou crescimento do fungo *Penicillium chrysogenum* e ausência da bactéria ao redor da colônia fúngica (FLEMING, 1929). Devido às dificuldades de purificação e produção, a penicilina somente foi utilizada para tratamento de infecções em 1941, quando Howard e Florey, e demais pesquisadores na Inglaterra, conseguiram quantidades necessárias para iniciar ensaios clínicos (WRIGHT, 1999).

A benzilpenicilina (penicilina G) foi o primeiro antibiótico β -lactâmico a ser utilizado na clínica, que apresentava alto potencial principalmente para tratar infecções causadas por *Streptococcus* spp. (RAMMELKAMP; KEEFER, 1943). No entanto, as penicilinas produzidas por *Streptococcus* spp. comprometeram o uso das penicilinas G e V, fazendo com que se inicia-se buscas por derivados mais estáveis às ações das β -lactamases, como por exemplo a oxacilina e metilicilina, ativas também contra *Staphylococcus aureus*, até a emergência de cepas resistentes à metilicilina (MRSA, do inglês *methicillin-resistant Staphylococcus aureus*) (BUSH; BRADFORD, 2016).

Contra bactérias gram-negativas, as penicilinas também exercem efeito, onde destacam-se a ampicilina e amoxicilina que foram introduzidas na década de 1970, para tratamento de infecções causadas por *Enterobacterales*. Esses antibióticos, no entanto, não exercem efeito sobre *Pseudomonas aeruginosa*, até a introdução da carbenicilina, primeira penicilina antipseudomonas, mas menos estável que a piperacilina e ticarcilina (BUSH; BRADFORD, 2016). A piperacilina e ticarcilina, e também suas combinações com inibidores de β -lactamases, são potentes antibióticos de amplo espectro, utilizadas para tratamento de infecções causadas por bactérias anaeróbias, *Staphylococcus* spp., enterobactérias e *P. aeruginosa* (BUSH; BRADFORD, 2016).

2.1.1.1.2. Cefalosporinas

A primeira cefalosporina (cefalosporina C) foi isolada da cultura fúngica de *Cephalosporium acremonium* a partir de seu isolamento proveniente da rede de esgoto em Sardenha (Itália), em 1948, por Giuseppe Brotzu. No estudo, foi observado que na cultura do fungo havia inibição da *Salmonella typhi*, agente etiológico da febre tifoide (LIMA et al., 2020). Assim, a descoberta da cefalosporina C culminou no desenvolvimento de diversas cefalosporinas a partir da década de 1950, permitindo o tratamento de infecções causadas por patógenos produtores de penicilinas (BUSH; BRADFORD, 2016). Essa classe de antibióticos

sofreu estudos intensos para desenvolvimento de novos antibióticos devido à diversificação química realizada em três locais estruturais da molécula (região R) (SINGH; YOUNG; SILVER, 2017). Atualmente, as cefalosporinas são classificadas em gerações (1ª a 5ª geração), de acordo com sua respectiva substituição da região R, espectro de ação e perfil de resistência (LIMA et al., 2020; SINGH; YOUNG; SILVER, 2017).

As cefalosporinas de primeira geração, em geral, são mais eficazes contra bactérias gram-positivas, mas atuam também sobre algumas espécies de bactérias gram-negativas, como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Proteus mirabilis* (LIMA et al., 2020). Alguns exemplares dessa geração são cefalotina, cefalexina e cefazolina. Já as cefalosporinas de segunda geração, como cefaclor e cefuroxima, têm um espectro maior de ação sobre bactérias gram-negativas devido à sua maior polaridade e conseqüentemente maior hidrofiliçidade (LIMA et al., 2020). A terceira geração das cefalosporinas (ex.: cefotaxima e ceftriaxona) compreende de drogas parenterais com alta estabilidade frente às β -lactamases em comparação com os antibióticos das gerações anteriores (BUSH; BRADFORD, 2016). São denominadas de cefalosporinas de espectro estendido por serem ativas contra diversos bacilos gram-negativos e atividade moderada a boa contra *P. aeruginosa*, devido seu maior grau de polaridade que as fazem se difundirem mais facilmente pela parede celular de gram-negativas através das porinas (LIMA et al., 2020). As cefalosporinas de quarta geração são representadas pelos semissintéticos cefepime e ceftiroma, que apresentam o mesmo espectro de atividade sobre bactérias gram-negativas e alta atividade antimicrobiana sobre gram-positivos com relação às cefalosporinas de terceira geração (EYLER; SHVETS, 2019; LIMA et al., 2020). Quimicamente, são menos suscetíveis à ação das β -lactamases e a presença do quaternário de amônia faz com que haja aumento na polaridade, permitindo rápida difusão através da membrana externa de bactérias gram-negativas (LIMA et al., 2020). Os antibióticos ceftarolina e ceftobiprole, e em suas formas pró-droga ceftarolina fosamil e ceftobiprole fosamil,

representam a quinta geração das cefalosporinas, mas também são conhecidos como cefalosporinas anti-MRSA, atuando sobre os cocos gram-positivos (MRSA, MSSA e *Streptococcus* spp.) e bacilos entéricos gram-negativos, com exceção das bactérias *Acinetobacter baumannii* e *Stenotrophomonas maltophilia* produtoras de β -lactamases de espectro estendido (ESBL) (LIMA et al., 2020; SADER; CARVALHAES; MENDES, 2021; WELTE et al., 2019).

2.1.1.1.3. Carbapenêmicos

Os carbapenêmicos são considerados como a classe mais importante dentre os antibióticos β -lactâmicos por serem relativamente resistentes à hidrólise da maioria das β -lactamases e apresentarem amplo espectro de ação, tanto em bactérias gram-positivas quanto em gram-negativas (EL-GAMAL et al., 2017; PAPP-WALLACE et al., 2011). A tienamicina foi o primeiro carbapenêmico identificado durante a década de 1970, no entanto, devido sua instabilidade química, não houve investimento para seu desenvolvimento como agente terapêutico, o que tempos depois, a adição química do grupo N-formimidoil tornou a molécula mais estável, resultando no antibiótico hoje conhecido como imipenem (BUSH; BRADFORD, 2016).

O imipenem foi o primeiro carbapenêmico a ser aprovado para uso clínico, em 1985, sendo administrado juntamente com a cilastatina, um bloqueador da enzima renal desidropeptidase (DHP) que evita a inativação do antibiótico (PAPP-WALLACE et al., 2011). O imipenem é amplamente utilizado no tratamento de infecções causadas por bactérias gram-negativas, gram-positivas, anaeróbias e não fermentadoras. Atualmente, a associação com o relebactam configura como uma alternativa promissora para o tratamento de infecções causadas por bactérias multirresistentes, principalmente quando outros antibióticos não são viáveis (CAMPANELLA; GALLAGHER, 2020; YAHAV et al., 2021; YANG et al., 2020).

Depois da introdução do imipenem, a cilastatina não foi administrada em associação com os futuros carbapenêmicos desenvolvidos, pois estes contêm o grupo 1 β -metil que confere maior estabilidade química frente à ação da DHP humana (BLUMER, 1997). Nesse sentido, o meropenem foi o primeiro carbapenêmico desenvolvido estável à hidrólise pela DHP, com aprovação para uso em 1996 (BUSH; BRADFORD, 2016). Em termos comparativos a respeito de sua atividade bactericida com imipenem, já foi verificado que o meropenem é mais potente contra bactérias entérica, com atividade semelhante contra *P. aeruginosa*, mesmo em casos de perda da porina OprD, em que o imipenem exerce pouca atividade antibacteriana (JORGENSEN; MAHER; HOWELL, 1991; RIERA et al., 2011). A recente associação do meropenem-vaborbactam foi desenvolvida para combater principalmente bactérias gram-negativas produtoras de ESBL e carbapenemases, com aprovação para uso clínico em pacientes adultos desde 2017 (YAHAV et al., 2021). Outro antibiótico da classe dos carbapenêmicos que é amplamente utilizado é o ertapenem que foi aprovado para uso clínico em 2001, cuja estrutura química também possui o grupo 1 β -metil, sendo mais estável contra a inativação pela DHP que o imipenem, não sendo necessário, portanto, a coadministração da cilastatina. O seu espectro de atividade antibacteriana contra enterobactérias é semelhante aos outros carbapenêmicos, no entanto, não apresenta atividade sobre *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp., *Enterococcus* spp. e MRSA devido a resistência intrínseca dessas espécies (EL-GAMAL et al., 2017).

2.1.1.1.4. Monobactâmicos

A sulfazina foi o primeiro antibiótico monobactâmico descrito no final da década de 1970, a partir de uma triagem para identificação de antibióticos de bactérias do solo, como *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Chromobacterium* (IMADA et al., 1981). Embora os antibióticos monobactâmicos sejam encontrados na natureza, o primeiro a ser utilizado na clínica foi o sintético aztreonam, com aprovação para uso em 1986 (BUSH; BRADFORD, 2016). Em geral,

os monobactâmicos naturais apresentam baixa atividade antibacteriana que, com modificações estruturais nesses compostos, foi possível a descoberta do aztreonam (LIMA et al., 2020).

O aztreonam é o único antibiótico monobactâmico com aprovação para uso terapêutico contra infecções causadas por bacilos gram-negativos, mas não apresentam atividade contra bactérias gram-positivas e anaeróbicas (RAMSEY; MACGOWAN, 2016). Como mecanismo de ação, o aztreonam liga-se fortemente à PBP3, o que leva à formação de filamentos e posterior lise celular (BUSH; BRADFORD, 2016). Por um tempo, o aztreonam foi utilizado também para o tratamento de diversas infecções causadas por bactérias produtoras de β -lactamases de espectro restrito, no entanto, a emergência das ESBL e serinas carbapenemases tornou-o menos eficaz para antibióticoterapia, mas ainda sim necessário para tratamento de bactérias produtoras de metallo- β -lactamases, considerando que não são capazes de hidrolisá-lo (BUSH; BRADFORD, 2016). Em recentes estudos *in vitro*, a combinação do aztreonam-avibactam tem se mostrado ativa contra *Enterobacterales* produtoras de diversas β -lactamases, incluindo serinas β -lactamases (YAHAV et al., 2021).

2.1.2. Metais

Há décadas, os metais são utilizados na agricultura e na medicina como biocidas e antimicrobianos, respectivamente. Mesmo por apresentarem diferentes níveis de toxicidade e questionamentos quanto sua eficácia, os metais mais utilizados nessas atividades são o cobre (Cu), mercúrio (Hg) e prata (Ag) (HOBMAN; CROSSMAN, 2015). O interesse sobre os metais como agentes antimicrobianos na medicina humana e veterinária está ressurgindo, posto que há limitadas opções terapêuticas disponíveis para o tratamento de bactérias multirresistentes (CHEESEMAN et al., 2020; LEMIRE; HARRISON; TURNER, 2013). Alguns mecanismos de toxicidade dos metais pesados foram descritos incluindo a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), disfunção de proteínas e perda de atividade enzimática, alteração na função

de membrana, interferência na assimilação de nutrientes essenciais e genotoxicidade (CHEESEMAN et al., 2020; LEMIRE; HARRISON; TURNER, 2013).

A toxicidade mediada por EROs pode causar diferentes danos celulares na membrana, no DNA e em proteínas, e, até o presente, três mecanismos foram propostos para explicar o aumento da concentração de EROs em bactérias expostas à níveis tóxicos de metais. O primeiro mecanismo está associado com a Reação de Fenton, onde determinados metais, como Cu, Cr, Co, V e Fe, catalisam a produção de hidróxido e radical hidroxila altamente reativo, devido a oxidação de Fe^{2+} por H_2O_2 (LEMIRE; HARRISON; TURNER, 2013; VALKO; MORRIS; CRONIN, 2005; STOHS; BAGCHI, 1995). O segundo mecanismo está relacionado com o rompimento das ligações do grupamento 4Fe-4S em proteínas, liberando o Fe ativo na Reação de Fenton, aumentando da produção de EROs (LEMIRE; HARRISON; TURNER, 2013). O terceiro mecanismo de toxicidade mediado por EROs está relacionado com a redução de alguns metais pelo tiol, um composto organossulfurado (-SH), levando à geração de EROs (LEMIRE; HARRISON; TURNER, 2013; VALKO et al., 2006; VALKO; MORRIS; CRONIN, 2005).

Em estudo com *Escherichia coli* foi verificado que alguns aminoácidos são suscetíveis à oxidação por metais. A oxidação de cadeias laterais de aminoácidos pode causar perda na atividade catalítica, levando a um processo de degradação (STADTMAN, 1993). Outro mecanismo relacionado com a disfunção de proteínas e de enzimas estão as substituições de metais por outros não catalíticos inibindo a atividade enzimática, como por exemplo a substituição do Zn por Ni na enzima frutose-1,6-bifosfato aldolase (FbaA), alterando a via glicolítica (MACOMBER; ELSEY; HAUSINGER, 2011).

Devido a sua capacidade de coordenação de metais, foi proposto que as membranas bacterianas são locais onde alguns metais exercem sua toxicidade (LEMIRE; HARRISON; TURNER, 2013). Em estudos com *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* foram constatados danos na membrana citoplasmática devido as doses tóxicas de Ag e Al (JUNG et al., 2008). As

evidências sugerem que principalmente Ag interrompe a cadeia de transporte de elétrons, causando ainda extravasamento de prótons através da membrana devido a alteração no potencial quimiosmótico da membrana (BRAGG; RAINNIE, 1974).

O mecanismo tóxico de alguns metais, como Cr, está associado com a inibição do crescimento bacteriano devido à ausência de nutrientes. Evidências mostram a capacidade do Cr de interromper a captação de sulfato competitivamente, devido as afinidades com os transportadores de sulfato (PEREIRA et al., 2008). Em *Pseudomonas aeruginosa* foi verificado a privação de Fe devido a exposição ao Ga não somente pela competitividade, mas também pela repressão do gene regulador transcricional *PvdS*, responsável pela captação de Fe (KANEKO et al., 2007).

Danos no DNA também já foram relatados como mecanismos de toxicidade de alguns metais. Mecanismos que alteram a homeostase do Fe aumentam a quantidade de Fe ativo na Reação de Fenton, levando a alta produção de EROs e consequente danos ao DNA e morte celular (KEYER; IMLAY, 1996).

2.1.2.1. Cobre

O Cu é um metal essencial para as formas de vida aeróbica, sendo utilizado como cofator enzimático e na cadeia de transporte de elétrons durante a respiração celular (VIMBELA et al., 2017). No entanto, em concentrações elevadas, este metal é tóxico para células procariotas e eucariotas (HOBMAN; CROSSMAN, 2015). O Cu é um metal frequentemente encontrado no meio ambiente, sendo um poluente de matrizes aquáticas devido a atividades antrópicas, industriais e agrícolas (MACHADO et al., 2017). Na agricultura, compostos de Cu tem sido utilizado como agente antimicrobiano, pesticidas, antifúngicos e como aditivos em rações animais. Os usos médicos do Cu consistem em antissépticos, antifúngicos, para purificação da água para consumo e em dispositivos contraceptivos intrauterino (ARENSEN et al., 2019). Mais recentemente, superfícies de Cu estão sendo instaladas em instituições assistências de

saúde para conter a transmissão microbiana de infecções hospitalares, evitando infecções cruzadas (ARENSEN et al., 2019; HOBMAN; CROSSMAN, 2015).

Mesmo apresentando funções essenciais em células de vida aeróbica, em altas concentrações o Cu é tóxico (ZAGUI et al., 2021). Tal metal é ativo na reação de Fenton, portanto, há produção de radicais de hidroxila e de peróxido de hidrogênio que podem causar dano celular (GRASS; RENSING; SOLIOZ, 2011). Uma ampla discussão envolvendo o mecanismo de toxicidade mediado por EROs tem sido levantada, posto que, em *Escherichia coli*, as EROs são produzidas no espaço periplasmático, estrutura que as bactérias gram-positivas não possuem (SOLIOZ et al., 2010; MACOMBER et al., 2007). Muitas bactérias desse grupo são tolerantes ao peróxido de hidrogênio e evidências mostram a tolerância de *Staphylococcus aureus* ao estresse oxidativo. A eficácia de superfícies de Cu como bactericida tem sido associada a altas concentrações desse metal nas superfícies que leva a lise da membrana bacteriana e à produção de EROs causando danos celulares como degradação do cromossomo e plasmídeo (GRASS; RENSING; SOLIOZ, 2011).

2.1.2.2. Mercúrio

O Hg é um metal que não há função positiva para as células, sendo considerado tóxico para as células procaríotas e eucaríotas, mas apresenta ampla utilização na agricultura e medicina. Na agricultura, o Hg foi utilizado como antifúngico e pesticida até a década de 1970. Casos de óbitos foram registrados pela ingestão de cereais tratados com metilmercúrio (antifúngico) por seres humanos na Guatemala e Iraque. Em aves foi constatado a morte e falhas reprodutivas após se alimentarem de sementes tratadas com organomercúrio, sendo este tratamento descontinuado após esses episódios (HOBMAN; CROSSMAN, 2015). Na medicina, compostos de Hg como nitrato de mercúrio ($\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$) e óxido de mercúrio (HgO) foram usados como agentes antimicrobianos. Desde o século XV foi utilizado para o tratamento de sífilis, se consagrando após a Segunda Guerra Mundial, sendo substituído pelo medicamento

Salvarsan. Outros usos na medicina compreendem o de medicamentos diuréticos, laxantes, antidepressivos, desinfetantes e antissépticos (PAL et al., 2017; HOBMAN; CROSSMAN, 2015).

O Hg é o metal mais tóxico para *Escherichia coli* e sua toxicidade é atribuída pela inativação enzimática e interferência nas funções de proteínas, devido à forte ligação aos grupos tiol e nitrogênio e ao deslocamento de cofatores enzimáticos. Ademais, os íons de Hg são lipossolúveis e, como tal, passam rapidamente pelas membranas biológicas, ligando-se também aos nucleotídeos e lipídios, comprometendo a função do DNA e contribuindo para a peroxidação lipídica (HOBMAN; CROSSMAN, 2015).

2.1.2.3. Prata

A Ag é um metal não essencial, sem papel benéfico para o metabolismo e altamente tóxico para bactérias. O primeiro uso desse metal como agente antimicrobiano data de 2.000 anos atrás com uso em água estocada em contêiner (HOBMAN; CROSSMAN, 2015). Materiais com os mais diversos compostos de prata estão sendo utilizados no tratamento de feridas e queimaduras (MIJNENDONCKX et al., 2013; STERLING, 2014). Mais recentemente compostos de pratas estão sendo empregados em sistemas domésticos de purificação e água, teclados de computadores, na indústria têxtil e em dispositivos médicos com finalidade de evitar a colonização por bactérias (HOBMAN; CROSSMAN, 2015; MIJNENDONCKX et al., 2013; PAL et al., 2017).

A Ag é o segundo metal mais tóxico para *Escherichia coli*. Como mecanismo de toxicidade, os íons de Ag interferem na cadeia respiratória, causam perda de integridade da membrana e danos no DNA. Outras evidências sugerem também que a Ag pode gerar EROs e causar danos no DNA, bem como alterar a permeabilidade da membrana celular e aumentar a sensibilidade aos antibióticos (HOBMAN; CROSSMAN, 2015; MORONES-RAMIREZ et al., 2013).

2.2. Resistência antimicrobiana: um problema de saúde pública mundial

A resistência antimicrobiana (AMR, do inglês *antimicrobial resistance*) observada em bactérias, parasitas, vírus e fungos, contra medicamentos usualmente utilizados para os tratamentos de infecções, é caracterizada como um dos principais problemas de saúde pública do Século XXI, em que ações mitigadoras são necessárias para evitar o desenvolvimento de uma crise global (NADEEM et al., 2020; PRESTINACI; PEZZOTTI; PANTOSTI, 2015). Em 2015, ocorreu a 68ª Assembleia Mundial da Saúde, promovida pela OMS, em que foi lançado o “*Global Action Plan on Antimicrobial Resistance*” que objetiva garantir o prosseguimento das medidas de prevenção e tratamento de doenças infecciosas com medicamentos seguros, eficazes e de qualidade, sendo utilizados de forma correta e com acessibilidade a quem necessitar (OMS, 2015). Para alcançar esse objetivo geral, o plano de ação global elenca cinco metas: a) melhorar a consciência e compreensão da AMR por meio da comunicação, educação e treinamentos; b) fortalecer o conhecimento por meio de vigilância e pesquisa; c) reduzir a incidência de infecções por meio de melhorias no saneamento, higiene e medidas profiláticas; d) otimizar o uso de agentes antimicrobianos em humanos e animais; e e) desenvolver a justificativa econômica que considere as necessidades de todos os países, aumentando investimentos em novos medicamentos, ferramentas de diagnósticos, vacinas e outras intervenções (OMS, 2015).

As medidas propostas no Plano de Ação Global da OMS são necessárias considerando que a AMR eleva consideravelmente o número de óbitos anualmente, o qual é estimado que aproximadamente 10 milhões de pessoas irão morrer todos anos a partir de 2050, superando as mortes atribuídas por câncer, acidentes de trânsito, diabetes, entre outros (O’NEILL, 2016). Além dos óbitos, sabe-se que a AMR causa elevados custos para os países em todo o mundo e, nesse sentido, o Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos (CDC, do inglês *Center for Disease Control and Prevention*) estima que, a cada ano, os custos devido a

AMR são de aproximadamente 55 bilhões de dólares, dos quais 20 bilhões são para os cuidados de saúde e 35 bilhões para perda de produtividade (DADGOSTAR, 2019). O problema mundial da AMR refere-se principalmente a resistência aos antibióticos em bactérias que, ao longo dos anos, diversas espécies desenvolveram resistência a cada novo antibiótico introduzido na prática clínica e, portanto, ações voltadas para o controle da resistência bacteriana pelo mundo são necessárias e urgentes (PRESTINACI; PEZZOTTI; PANTOSTI, 2015).

2.2.1. Resistência bacteriana aos antibióticos

A resistência bacteriana aos antibióticos é um fenômeno natural que ocorre quando tais microrganismos são expostos a estes medicamentos, onde bactérias suscetíveis são mortas ou inibidas, enquanto bactérias que são intrinsecamente resistentes, ou que adquiriram algum elemento genético móvel de resistência, tem maiores chances de sobreviver e, portanto, se multiplicar (NADEEM et al., 2020; PRESTINACI; PEZZOTTI; PANTOSTI, 2015). Além da referida pressão seletiva, outros fatores como o uso excessivo (na medicina humana, animal e na agricultura) e impróprio (escolhas e dosagem errada e não cumprimento do protocolo terapêutico) são também responsáveis pelo aumento e disseminação de bactérias resistentes aos antibióticos (DADGOSTAR, 2019).

A resistência bacteriana aos antibióticos, no entanto, tem sua origem ancestral que precede o início do uso de antibióticos na medicina humana (PERRY; WAGLECHNER; WRIGHT, 2016). Uma recente revisão de literatura compilou evidências a respeito da detecção de bactérias resistentes, assim como de genes de resistência aos antibióticos (ARGs, do inglês *antibiotic-resistance genes*), em diversos ecossistemas da criosfera, e foi verificado que esses compartimentos ambientais agem como preservadores desses microrganismos, que permanecem viáveis por milhões de anos, o que viabiliza a construção de árvores filogenéticas para compreender a ancestralidade da resistência aos antibióticos (SAJJAD et al., 2020). Nesse sentido, amostras de *permafrost* de Dawson, Yukon, Canadá, datadas de 30.000 anos, foram

submetidas as análises metagenômicas onde identificou-se uma coleção altamente diversa de genes de resistência a antibióticos β -lactâmicos, glicopeptídeos e tetraciclina, além da detecção do gene *vanA*, de resistência à vancomicina, que, através de estudos estruturais e funcionais, confirmaram sua semelhança com as variantes modernas (D’COSTA et al., 2011).

Do ponto de vista genético, os mecanismos de resistência aos antibióticos podem ser um atributo inerente as bactérias (resistência intrínseca), que as fazem naturalmente resistente, ou pode ser adquirida por meio de dois mecanismos, como a mutação em seu material genético ou aquisição de DNA externo, conferindo resistência (NADEEM et al., 2020). A resistência intrínseca pode ser definida como uma característica compartilhada por todas as bactérias de uma mesma espécie, independentemente de sua exposição prévia a antibióticos (COX; WRIGHT, 2013). Um exemplo é a bactéria *Mycoplasma pneumoniae* que são intrinsecamente resistentes à antibióticos que atuam sobre a parede celular (ex.: β -lactâmicos), por não possuírem tal estrutura celular (ZHAO et al., 2019). A resistência adquirida, seja por mutação espontânea ou aquisição de material genético de fonte externa, foi desenvolvida por diversas espécies bacterianas para sobreviver as ações dos antibióticos (NADEEM et al., 2020). As mutações espontâneas são raras e ocorrem aleatoriamente no genoma bacteriano, estando associadas aos erros durante a replicação do DNA que, se apresentarem vantagens evolutivas, são transferidas para as células filhas por meio da transferência vertical (MARTINEZ; BAQUERO, 2000). Um exemplo são as mutações espontâneas do 23S rRNA e dos genes *gyrA* e *rpoB* que são responsáveis por conferir resistência a claritromicina, ciprofloxacina e rifampicina, respectivamente, em *Helicobacter pylori* (ALBA; BLANCO; ALARCÓN, 2017). A aquisição de materiais genéticos externos é um importante mecanismo de desenvolvimento de resistência aos antibióticos, mediada pela transferência horizontal de genes (transformação, transdução e conjugação), sendo que a conjugação exerce um papel essencial na disseminação de elementos genéticos móveis (BLAIR et al., 2015).

Em 1946, Joshua Lederberg e Edward Tatum, descobriram o mecanismo de conjugação a partir de experimentos com *Escherichia coli*, o qual permitia que as bactérias trocassem informações genéticas através da transferência unidirecional de DNA (LEDERBERG; TATUM, 1946). A conjugação ocorre quando há contato próximo das células bacterianas, célula-célula, seguida da formação de uma ponte que permite a transferência do elemento genético móvel (ex.: plasmídeo) de uma célula doadora à uma receptora (NADEEM et al., 2020), sendo considerado como um mecanismo de transferência de DNA em bactérias gram-negativas e gram-positivas, conservado ao longo dos anos (KOHLENER; KELLER; GROHMANN, 2019; VIROLLE et al., 2020). Os plasmídeos conjugativos carregam genes necessários para sua manutenção durante a transferência horizontal de genes, de células doadoras para células recipientes, e também para sua transferência vertical, de célula mãe para célula filha (VIROLLE et al., 2020). Além dos genes responsáveis por sua manutenção durante os processos de transferência, plasmídeos conjugativos frequentemente carregam genes que conferem diversas funções biológicas e vantajosas, como os de virulência, de formação de biofilme, de tolerância aos metais tóxicos e de resistência aos antibióticos (VIROLLE et al., 2020).

Em uma abordagem biológica, a resistência aos antibióticos ocorre se o gene transferido, ou o que sofreu alguma mutação, for expresso, produzindo um efeito biológico (mecanismo de resistência) que resulta na perda de atividade do antibiótico (ALANIS, 2005). Esses mecanismos de resistência são diversos e, dentre eles, destacam-se a diminuição da permeabilidade da membrana, a alteração no sítio alvo, a extrusão por bombas de efluxo e a inibição enzimática do antibiótico, sendo este último considerado o mecanismo de resistência de maior relevância clínica (NADEEM et al., 2020). A inibição enzimática dos antibióticos ocorre pela produção bacteriana de enzimas hidrolisantes, como por exemplo as enzimas β -lactamases, que altera sua estrutura irreversivelmente, inativando-o, e são codificadas

principalmente por elementos genéticos móveis, o que proporciona sua fácil disseminação (BUSH; BRADFORD, 2020).

2.2.1.1. β -Lactamases

As β -lactamases são enzimas que inibem a atividade bactericida dos antibióticos β -lactâmicos devido à quebra do anel presente em sua estrutura química, adicionando uma molécula de água (BUSH; BRADFORD, 2020). Esse mecanismo de resistência aos antibióticos β -lactâmicos é o mais comum em bactérias gram-negativas, embora também esteja presente em bactérias gram-positivas (BUSH; BRADFORD, 2020). Em 1940, Abraham e Chain reportaram a identificação da primeira β -lactamase em *Escherichia coli* (*Bacillus coli*), como “uma enzima bacteriana capaz de destruir a penicilina” (ABRAHAM; CHAIN, 1940). Após sua descoberta, e com a introdução sucessiva de antibióticos β -lactâmicos exercendo pressão seletiva, foi observada resistência à cada novo antibiótico devido às β -lactamases com potencial de hidrólise ampliado, em comparação com as enzimas antecedentes (BONOMO, 2016).

No começo, as β -lactamases recebiam nomes das cepas ou dos plasmídeos que, respectivamente, as produziam ou codificavam, como por exemplo PC1 e P99 (JACOBY, 2006). Posteriormente, propriedades bioquímicas, substratos, local onde a enzima foi isolada, nome de paciente, entre outros, também foram e são utilizados para a determinar nomenclatura das β -lactamases (JACOBY, 2006). Nesse sentido, a enzima CTX-M recebeu essa denominação por exercer atividade hidrolítica contra o antibiótico cefotaxima, detectada pela primeira vez em Munich, na Alemanha (BAUERNFEIND; GRIMM; SCHWEIGHART, 1990). Já a enzima KPC recebeu essa denominação por ter sido detectada em um isolado de *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase – enzima que hidrolisa antibióticos carbapenêmicos (YIGIT et al., 2001).

Atualmente, mais de 2.700 enzimas β -lactamases foram descritas desde sua descoberta, com sequências de nucleotídeos, substratos hidrolíticos e perfis inibitórios específicos (BUSH,

2018). Essas enzimas podem ser classificadas de acordo com sua estrutura molecular, sendo divididas em quatro classes (A, B, C e D), conhecidas como Classe molecular de Ambler (AMBLER, 1980). As enzimas das classes A, C e D são denominadas de serina- β -lactamases, devido a presença do aminoácido serina no centro ativo da enzima. Já as enzimas pertencentes à classe B são conhecidas como metallo- β -lactamases, por serem dependentes de um cofator metálico (ex.: Zn^{2+}) para exercer a atividade hidrolítica no antibiótico (AMBLER, 1980). Outra classificação comumente utilizada, a de Bush-Jacoby-Medeiros, separa as enzimas em três grupos funcionais (1, 2 e 3), considerando o substrato enzimático e perfil de inibição pelos inibidores de β -lactamases (ácido clavulânico, avibactam, EDTA, entre outros) (BUSH; JACOBY; MEDEIROS 1995; BUSH; JACOBY, 2010). Na Tabela 1 é apresentada resumidamente a classificação das β -lactamases.

Tabela 1. Classificação molecular e funcional das enzimas β -lactamases, com seus respectivos exemplares, substratos e perfis de inibições.

Classificação		Exemplos de Enzimas	Substratos *	Perfil de inibição [#]
Molecular	Funcional			
A	2a	PC1	P	AC, AV
	2b	TEM-1, SHV-1	P, C 1 ^a -2 ^a	AC, AV
	2be	CTX-M, TEM-3, SHV-2	P, C 1 ^a -4 ^a , M	AC, AV
	2br	SHV-10	P	AV
	2c	CARB-1	P	AC, AV
	2f	KPC-2	P, C 1 ^a -4 ^a , M, Cb	AC, AV
B	3a	IMP-1, VIM-1, NDM-1	P, C 1 ^a -4 ^a , Cb	EDTA
	3b	CphA	Cb	EDTA
C	1	CMY-2	C 1 ^a -2 ^a	AV
	1e	CMY-37	C 1 ^a -4 ^a	AV
D	2d	OXA-1, OXA-10	P	AC, AV
	2de	OXA-11, OXA-15	P, C 1 ^a -4 ^a , M	AC, AV
	2df	OXA-23, OXA-48	P, Cb	AV

*P, penicilinas; C, cefalosporinas de 1^a, 2^a, 3^a e 4^a gerações; M, monobactâmico; Cb, carbapenêmicos.

[#]AC, ácido clavulânico; AV, avibactam.

Fonte: Adaptado de Bush (2018).

As β -lactamases de Classe A compreendem o grupo com maior quantidade de enzimas, sendo amplamente distribuídas pelo mundo e intensamente estudadas devido seus impactos significativos na eficácia da antibióticoterapia (TOOKE et al., 2019). Essas enzimas frequentemente são produzidas por genes presentes em plasmídeos, o que contribui para sua dispersão, mas também podem estar locados no cromossomo bacteriano, como por exemplo o gene *bla_{SHV-1}* em *K. pneumoniae* (BONOMO, 2016). Em especial, nessa classe constam β -lactamases clinicamente importantes, como o grupo de enzimas ESBLs, as quais são capazes de hidrolisar potentes antibióticos β -lactâmicos, como as cefalosporinas de amplo espectro de terceira e quarta geração, e as serinas-carbapenemases, como a KPC, capaz de hidrolisar todos os antibióticos β -lactâmicos (BUSH, 2018).

A princípio, as enzimas TEM e SHV possuem espectro restrito frente aos antibióticos β -lactâmicos, apresentando atividade hidrolítica apenas sobre penicilinas e cefalosporinas de primeira e segunda geração. No entanto, substituições de aminoácidos fizeram com que ambas enzimas (TEM e SHV variantes) apresentassem atividade frente às cefalosporinas de amplo espectro (terceira e quarta geração), sendo denominadas, portanto, de β -lactamases de espectro estendido – ESBLs (BUSH; BRADFORD, 2020). Na década de 1980, foram descritas as primeiras enzimas ESBLs, TEM-3 e SHV-2, a partir de isolados de *K. pneumoniae* e *K. ozaenae*, respectivamente, com sucessivas descobertas nas décadas seguintes, somando no presente mais de 600 enzimas do grupo ESBL (BUSH, 2018). As variantes ESBLs das enzimas TEM e SHV são comumente codificadas por genes presentes em plasmídeos conjugativos, encontrados em *E. coli* e *K. pneumoniae* e outras espécies de bactérias gram-negativas, com distribuição em muitos países (DOI; IOVLEVA; BONOMO, 2017). Essas enzimas foram amplamente relatadas até a emergência e disseminação da CTX-M, considerada atualmente como a ESBL mais frequentemente notificada (DOI; IOVLEVA; BONOMO, 2017).

A enzima CTX-M foi reportada pela primeira vez no início da década de 1990, a partir do isolamento da bactéria *E. coli* de exsudado da orelha de um recém-nascido, na Alemanha, e desde os anos 2000 estão disseminadas por todo o mundo (BAUERNFEIND; GRIMM; SCHWEIGHART, 1990; BEVAN; JONES; HAWKEY, 2017). Em geral, as enzimas CTX-M apresentam maior atividade hidrolítica frente à cefotaxima do que à ceftazidima, ambas cefalosporinas de terceira geração, e são divididas filogeneticamente em cinco grupos por apresentarem >94% de similaridade na sequência de aminoácidos, os quais são CTX-M-1, -2, -8, -9 e -25 (BONNET, 2004; BUSH; BRADFORD, 2020). Quanto ao ambiente genético, plasmídeos e elementos genéticos conjugativos, como integrons de classe 1, *ISCR1* e *ISEcp-1*, abrigam os genes *bla*_{CTX-M} que contribuem para sua mobilização, sendo encontrados em diversas espécies da família *Enterobacteriaceae*, incluindo *E. coli*, *Klebsiella* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Citrobacter freundii*, *Enterobacter* spp., e *Serratia marcescens*, bem como em bactérias não fermentadoras da glicose (CANTÓN; GONZÁLEZ-ALBA; GALÁN, 2012; POIREL; BONNIN; NORDMANN, 2012). A rápida disseminação dos genes *bla*_{CTX-M} pelo mundo é um dos fenômenos mais importantes no âmbito da resistência aos antibióticos e é particularmente preocupante, considerando que são identificados em patógenos causadores de infecções hospitalares e nas comunidades, além de serem endêmicos em muitos países, como na Índia, em que altas porcentagens de detecção em isolados de *E. coli* (60-80%) são identificadas (POIREL; BONNIN; NORDMANN, 2012).

Ainda pertencente a Classe A, encontram-se as serinas-carbapenemases que podem ser codificadas por genes presentes no cromossomo bacteriano (ex.: SME, NmcA), em plasmídeos (ex.: KPC, GES) ou em ambos materiais genéticos (ex.: IMI) (NAAS; DORTET; IORGA, 2016). Entre as β -lactamases citadas, as enzimas do tipo KPC destacam-se por apresentar um amplo potencial de hidrólise de todos os antibióticos β -lactâmicos e, desde sua emergência nos Estados Unidos, tornou-se a carbapenemase mais frequentemente detectada pelo mundo

(BUSH; BRADFORD, 2020; YIGIT et al., 2001). Não obstante, as bactérias produtoras de enzimas do tipo KPC normalmente apresentam um fenótipo de multidroga resistente, posto que é comum carregarem outros genes de resistência aos antibióticos, os quais são considerados de primeira linha para terapia (MUNOZ-PRICE et al., 2013). A disseminação bem-sucedida das carbapenemases do tipo KPC deve-se principalmente a disseminação da bactéria *K. pneumoniae* pertencente ao complexo clonal 258 (CC258) e, molecularmente, pela localização do gene *bla_{KPC}* no transposon *Tn4401*, da família *Tn3*, que possui alta capacidade de mobilização (CUZON; NAAS; NORDMANN, 2011). Os genes codificadores das enzimas KPC foram identificados em diversas espécies pertencentes a família *Enterobacteriaceae*, bem como em *Pseudomonas aeruginosa* (KAZMIERCZAK et al., 2016).

Entre as outras classes moleculares que classificam as β -lactamases, destacam-se a Classe B e D devido seus impactos significativos no tratamento de infecções causadas por bactérias resistentes, as quais suas representantes são as enzimas metallo- β -lactamases e do grupo OXA, respectivamente. As metallo- β -lactamases possuem estrutura e mecanismo de ação diferente das serina- β -lactamases e são divididas em três subclasses – B1, B2 e B3 – a depender da sequência de aminoácidos, arquitetura, substratos e quantidade de moléculas de zinco, necessárias para atividade hidrolítica (BOYD et al., 2020). Dentre elas, as enzimas IMP, NDM e VIM, pertencentes a subclasse B1, são as de maiores relevância clínica e epidemiológica e apresentam perfil de hidrólise de todos os antibióticos β -lactâmicos, excetuando o aztreonam, e molecularmente os genes codificadores podem estar presentes em genes cassetes dentro de integrons de Classe 1 ou Classe 3 (IMP e VIM) ou em plasmídeos (NDM), como *IncF*, *IncA*, *IncC*, entre outros, sem associação à integrons, sendo encontradas em diversas espécies de bactérias gram-negativas pelo mundo (BOYD et al., 2020). As oxacilinas, também conhecidas como OXA, receberam esse nome pela primeira enzima OXA descrita possuir atividade contra oxacilina (penicilina), no entanto, com o passar dos anos foram identificadas

enzimas capazes de hidrolisar cefalosporinas de amplo espectro, e até mesmo carbapenêmicos, em diversas espécies bacterianas, incluindo membros da família *Enterobacteriaceae* e não fermentadores (*P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp.) (ANTUNES; FISHER, 2014). Os genes codificadores das enzimas OXA podem estar presentes em diversos elementos genéticos que os permitem serem transferidos entre espécies e, nesse sentido, a migração de enzimas OXA com potencial de carbapenemase entre espécies da família *Enterobacteriaceae* e *Acinetobacter baumannii* representam um grande problema, considerando seu oportunismo em infecções relacionadas à assistência à saúde e infecções na comunidade (ANTUNES; FISHER, 2014; EVANS; AMYES, 2014).

2.2.2. Tolerância bacteriana aos metais

A exposição das bactérias aos metais essenciais e tóxicos foi fundamental para a evolução de mecanismos capazes de controlar os níveis celulares dos íons metálicos biodisponíveis. Assim como os antibióticos, os metais antimicrobianos possuem diversos sítios de ação para exercer a atividade antimicrobiana, no entanto, há limitadas opções disponíveis para as bactérias amenizarem ou até mesmo anularem os efeitos tóxicos dos metais, como por exemplo sequestro intracelular ou extracelular, redução da permeabilidade de membrana, alteração do sítio alvo, desintoxicação enzimática e bomba de efluxo, sendo estes dois últimos os mais bem caracterizados a nível genético (HOBMAN; CROSSMAN, 2015). A seguir estão descritos os mecanismos de resistência bacteriana ao cobre, mercúrio e prata, os principais metais utilizados como agentes antimicrobianos.

2.2.2.1. Cobre

O cobre é um metal essencial para as bactérias, no entanto em altas concentrações intracelulares torna-se tóxico o que levou ao desenvolvimento de mecanismos para o controle homeostático e de tolerância (VIMBELA et al., 2017; HOBMAN; CROSSMAN, 2015). Dois

modelos de tolerância ao cobre foram amplamente descritos e estudados, o modelo de tolerância cromossomal (sistemas *cue* e *cus*) e o plasmidial (*pco*). O mecanismo plasmidial *pco* foi descoberto em 1983, em *Escherichia coli*, e confere tolerância adicional ao cobre, pode ser transferido entre espécies bacterianas e a expressão gênica dos genes *pcoABCDE* presente no operon *pco* é regulado pelo sistema PcoRS (HOBMAN; CROSSMAN, 2015; TETAZ; LUKE, 1983). Assim que o cobre entra no periplasma, o sistema PcoRS começa a regular a expressão gênica do operon *pco*. Como primeira resposta defensiva ao cobre, a proteína codificada *pcoE* sequestra o cobre enquanto os outros genes *pco* são expressos. *pcoA* é uma oxidase capaz de oxidar o cobre para um íon menos tóxico, ligada a *pcoC* no periplasma. A *pcoD* é uma proteína na membrana interna que carrega o cobre para o citoplasma onde ocorrerá a ligação com a *pcoA* citoplasmática e posterior efluxo por meio da *pcoB*, presente na membrana externa que interage também com a *pcoA* e *pcoC* periplasmática. As proteínas *pcoC* e *pcoD* são necessárias para a tolerância total aos íons de cobre (HOBMAN; CROSSMAN, 2015; LADOMERSKY; PETRIS, 2015).

2.2.2.2. Mercúrio

Acredita-se que a tolerância aos íons de mercúrio seja um mecanismo antigo encontrado em bactérias e arqueas, evoluindo desde que a biosfera foi amplamente oxigenada, sendo identificado primeiramente em *Staphylococcus aureus* de amostras clínicas (BARKAY et al., 2010; MOORE, 1960). O mecanismo de resistência ao mercúrio é determinado pelo operon *mer*, do transposon Tn501, que codifica proteínas carreadoras e redutase. Íons mercuriais divalentes (Hg^{2+}) entram no periplasma por meio das porinas na membrana externa ligando-se à cisteína presente em *merP*. Esses íons são transportados para o citoplasma através de proteínas de membrana (*merT* e *merC*) para serem reduzidos pela redutase mercúrica *merA* e geração de mercúrio metálico (Hg^0). Este, é volátil em temperatura e pressão ambiente, deixando a célula

bacteriana por difusão passiva (HOBMAN; CROSSMAN, 2015; MATHEMA; THAKURI; SILLANPÄÄ, 2011).

2.2.2.3. Prata

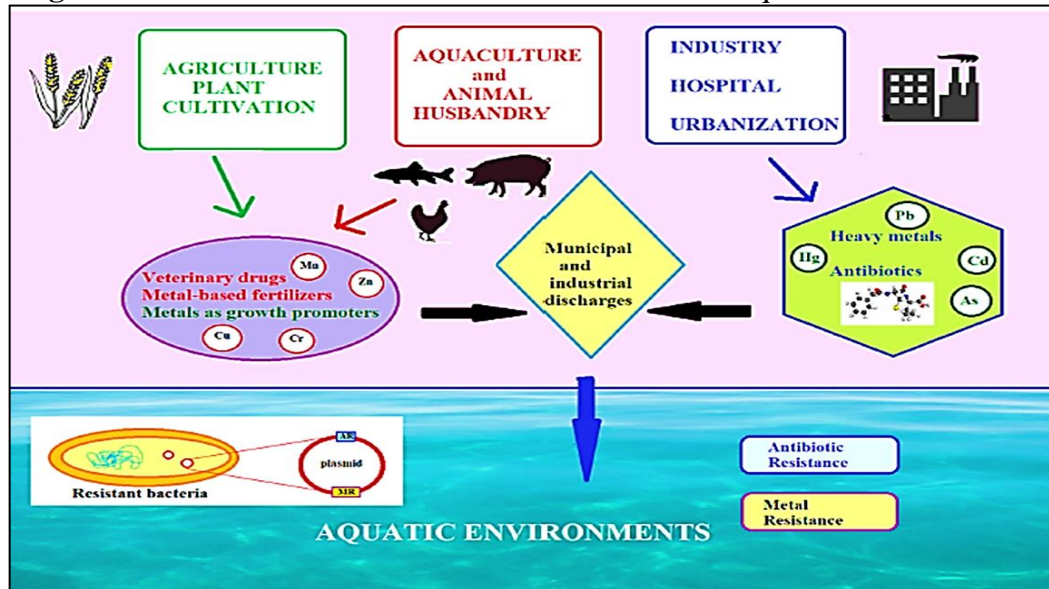
Em 1973, isolados de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium de pacientes da ala de queimados foram identificados com a presença do plasmídeo pMG10, de 182 kb, que conferia tolerância aos metais (prata, mercúrio e telúrio) e resistência aos antibióticos (ampicilina, tetraciclina, cloranfenicol, estreptomicina), sendo este o primeiro e o mais estudado mecanismo de tolerância a prata (MIJNENDONCKX et al., 2013; McHUGH et al., 1975). A região responsável pela tolerância à prata é o operon *sil*, composto de diversos genes, que codificam proteínas capazes de carrear e expulsar os íons de prata através de uma bomba de efluxo (ANDRADE et al., 2018; MIJNENDONCKX et al., 2013). *silP* é uma proteína de membrana interna que transporta íons de prata do citoplasma ao espaço periplasmático da bactéria; *silE* e *silF* são proteínas periplasmáticas transportadoras que carregam os íons de prata para o complexo *silCBA*. Este complexo inclui a bomba de efluxo (*silA*), uma porina na membrana externa (*silC*) e uma proteína ligante (*silB*), expulsando então os íons de prata para fora da bactéria (ANDRADE et al., 2018; HOBMAN; CROSSMAN, 2015; RANDALL et al., 2015; MIJNENDONCKX et al., 2013).

2.3. Antibióticos e bactérias resistentes no ambiente: esgoto e água superficial

Ambientes aquáticos, tais como esgotos e águas superficiais, podem ser considerados como reservatórios de poluentes químicos e microbiológicos, como compostos com atividade antimicrobiana e microrganismos resistentes (FELIS et al., 2020; ZAGUI et al., 2020). A intensa industrialização e urbanização, além da agricultura e criação de animais, impactam diretamente na composição dos esgotos, onde antibióticos e metais são lançados no sistema de coleta, alcançando as estações de tratamento de esgoto e águas superficiais, favorecendo a co-

seleção de bactérias resistentes aos antibióticos e tolerante aos metais (Figura 4) (SQUADRONE, 2020).

Figura 4. Fontes de antibióticos e metais em ambientes aquáticos.



Fonte: SQUADRONE (2020).

2.3.1. Esgoto hospitalar e sanitário (ETE)

O esgoto hospitalar é gerado a partir de todas as atividades assistenciais e não assistenciais realizada no hospital, como em procedimentos, análises laboratoriais, radiologia, banheiros, cozinhas, lavanderia, entre outros, e, portanto, suas características dependem do tamanho do hospital, número de leitos e pacientes internados, tipos de enfermarias e de serviços prestados (CARRARO et al., 2016). O referido esgoto pode apresentar alguns riscos à saúde humana e ambiental considerando a presença de detergentes, radioisótopos, metais, fármacos e bactérias multirresistentes, que são provenientes das atividades oferecidas e/ou eliminados por pacientes internados através de excretas biológicas (CARRARO et al., 2016). Uma recente e crescente atenção tem sido dada para a ocorrência de bactérias e genes de resistência aos antibióticos em esgoto hospitalar, visto que nesses locais a utilização de antibióticos é mais intensa em relação aos seus usos na comunidade e, portanto, a pressão seletiva sobre bactérias

nesse tipo de esgoto é conseqüentemente mais expressiva em comparação com as outras matrizes aquáticas (CARRARO et al., 2016; VERLICCHI, 2021).

Nesse sentido, existem diversos estudos recentes na literatura que fornecem evidências principalmente relacionadas as concentrações de antibióticos e ocorrência de bactérias e genes de resistência em esgoto hospitalar (AYDIN et al., 2019; CONTE et al., 2020; NGIGI; MAGU; MUENDO, 2020; ORY et al., 2019). Aydin et al. (2019) avaliaram amostras de esgoto de 16 hospitais na Turquia e verificaram altas concentrações de antibióticos, com médias de 630 ng/L no verão e 42014 ng/L no inverno, em que os antibióticos azitromicina, claritromicina e ciprofloxacina foram detectados em maiores concentrações, apresentando, inclusive, alto riscos ecotoxicológicos para peixes e algas. No Quênia, foram avaliadas as concentrações de 17 antibióticos em esgoto de um hospital referência no país e constataram que as concentrações de resíduos de antibióticos no esgoto hospitalar é de 3 a 10 vezes maiores que em esgoto sanitário ou água superficial, concluindo que o monitoramento contínuo é importante devido aos efeitos adversos à saúde humana e ambiental, caso haja destinação incorreta (NGIGI; MAGU; MUENDO, 2020).

Na França, Ory et al. (2019) coletaram amostras de esgoto de um hospital universitário e avaliaram a presença de bactérias resistentes aos carbapenêmicos em biofilmes formados nas tubulações em que o esgoto é transportado. No referido estudo, *Aeromonas* spp. e *Pseudomonas* spp. foram as bactérias mais frequentes, observando alta resistência aos carbapenêmicos e presença de genes codificadores de carbapenemases em 40% dos isolados, sendo os genes *bla_{VIM}*, *bla_{NDM}* e *bla_{OXA-48}* de maiores prevalências. Os autores destacam a necessidade de realizar o monitoramento constante do esgoto hospitalar por ser um reservatório de bactérias carreando genes de resistência e pela capacidade de transferência de genes entre as bactérias, o que representa um potencial perigo que não deve ser negligenciado (ORY et al., 2019). Na China, foi verificada ampla diversidade de bactérias gram-negativas exibindo fenótipo

multidroga resistente, carreando genes clinicamente importantes como os genes *bla*_{CTX-M}, *bla*_{KPC} e *bla*_{NDM} (ZHANG et al., 2020). Recentemente no Brasil, espécies de *Aeromonas*, conhecidas por ser um patógeno oportunista veiculado por água e alimentos, foram reportadas em esgoto hospitalar em Curitiba, no Paraná, apresentando perfil de resistência as cefalosporinas de amplo espectro e diversidade de genes de resistência aos antibióticos β -lactâmicos (*bla*_{TEM}, *CTX-M*, *GES*), aminoglicosídeos (*aac(6')-Ib-cr*) e quinolonas (*qnrS*) (CONTE et al., 2020).

Quanto ao marco legal, o esgoto hospitalar é considerado como esgoto doméstico em muitos países, incluindo o Brasil, e, portanto, pode ser destinado para a rede coletora de esgoto do município sem qualquer tratamento prévio, desde que haja ETE na cidade (BRASIL, 2002; CARRARO et al., 2016). Nas ETEs, as combinações de processos físicos, biológicos e químicos atuam na remoção da matéria orgânica e demais poluentes, visando a proteção do ambiente e qualidade dos recursos hídricos (MANAIA et al., 2018). No entanto, são diversos os tipos de esgotos que chegam para tratamento nas estações e estudos vêm mostrando que as ETEs podem funcionar também como um grande reservatório de ARGs e bactérias resistentes (MANAIA et al., 2018; RIZZO et al., 2013). Além da grande concentração de matéria orgânica, os esgotos de ETEs também contêm antibióticos e metais que moldam a comunidade microbiana em decorrência de seus efeitos estressantes, onde irão prevalecer bactérias com diferentes graus de tolerância contra os efeitos adversos (BERENDONK et al., 2015; MANAIA et al., 2018). Não obstante, o contato célula-célula, a alta carga de nutrientes, o pH e a temperatura estáveis favorecem a transferência horizontal de elementos genéticos de resistência, levando ao aumento exponencial no número de bactérias tolerantes as condições adversas, incluindo ao potencial antimicrobiano de antibióticos e metais (KIM et al., 2014; MANAIA et al., 2018). Embora as metodologias empregadas para o tratamento exerçam alta performance na remoção de poluentes, sabe-se que há carga remanescente e, nesse sentido,

diversos estudos evidenciaram a ocorrência e persistência de antibióticos, metais, bactérias resistentes e ARGs em esgoto bruto e tratado de ETEs (MARANO et al., 2020; PALLARES-VEJA et al., 2019; RODRIGUEZ-MOZAZ et al., 2020; TONANI et al., 2011; ZAGUI et al., 2020).

Harrabi et al. (2018) coletaram amostras de esgoto bruto e tratado em uma ETE, na Tunísia, para avaliarem as concentrações de 56 antibióticos. Do total de antibióticos investigados, 13 foram encontrados e suas concentrações variaram de 23 a 690 ng/L no esgoto bruto e de 7,5 a 370 ng/L no esgoto tratado, sendo a espiramicina, enrofloxacina, sulfapiridina, ciprofloxacina e ofloxacina representando os antibióticos em maiores concentrações, nos dois tipos de amostras. Os percentuais de remoção variaram entre os diferentes antibióticos, com maior taxa de remoção para trimetoprim (88%) e menor taxa de remoção para sulfapiridina (35%). Destacaram ainda que os compostos detectados no esgoto tratado que mais apresentaram riscos ambientais foram ciprofloxacina, azitromicina, ofloxacina e sulfametoxazol. Rodriguez-Mozaz et al. (2020) avaliaram as concentrações de antibióticos em esgoto tratado em sete países europeus e observaram, dentre outros antibióticos detectados, altas concentrações de ciprofloxacina e azitromicina, os quais apresentaram riscos moderados ao ambiente, destacando que a situação pode ser agravada pelo amplo uso de antibióticos em diversos cenários.

Na Irlanda, amostras de esgoto tratado foram coletadas de duas ETEs para avaliação de coliformes fecais resistentes e foi verificado que 54% dos isolados expressavam o fenótipo de multidroga resistentes, demonstrando principalmente resistência a diversos antibióticos β -lactâmicos, a ciprofloxacina, a tetraciclina e ao trimetoprim, com alguns isolados carregando os genes *bla*_{SHV}, *TEM*_e e *CTX-M* (SMYTH et al., 2020). Ademais, resistência a colistina, antibiótico de último recurso, foi encontrada em 23% dos isolados (SMYTH et al., 2020). Não obstante, alta prevalência de cinco variantes do gene *mcr* foram detectadas na Alemanha, sugerindo alto risco de aumento de incidência de isolados resistentes à colistina, a partir da disseminação por

comunidades microbianas pelos sistemas de esgoto (KNEIS; BERENDONK; Heß, 2019). Utilizando método cultura-independente, genes de resistência a macrolídeos (*ermB*), sulfonamidas (*sul1* e *sul2*), quinolonas (*qnrS*), tetraciclina (*tetM*) e aos β -lactâmicos (*bla*_{CTX-M}) foram detectados no esgoto bruto e tratado de ETEs na Holanda, evidenciando a diversidade de genes que podem ser encontrados nessa matriz (PALLARES-VEJA et al., 2019).

A partir de uma abordagem metagenômica, o esgoto de uma ETE na Coreia do Sul foi avaliado, com fins de detecção de ARGs e genes de tolerância aos metais, e verificaram que as concentrações de genes de tolerância aos metais foram superiores às concentrações de ARGs, sendo que os genes de tolerância ao mercúrio e cobre estiveram em maiores concentrações em amostras de esgoto bruto e tratado, chamando atenção para a persistência destes após o tratamento, juntamente com a ocorrência de genes de tolerância à prata e ao ouro (GUPTA et al., 2018). Em relação aos ARGs, os genes de tolerância aos metais foram poucos estudados em amostras de esgoto, bem como em outras matrizes aquáticas, mas suas ocorrências não devem ser negligenciadas, visto que podem contribuir para co-seleção de bactérias resistentes aos antibióticos. Como evidenciado acima, as ETEs não conseguem remover, em sua totalidade, as concentrações de antimicrobianos e de bactérias resistentes e tolerantes aos antibióticos e metais, respectivamente, e representam a principal fonte de contaminação das águas superficiais receptoras de efluentes de ETEs (MANAIA et al., 2018).

2.3.2. Água superficial

O amplo consumo de antimicrobianos, em diferentes setores, refletem diretamente em suas concentrações em vários compartimentos ambientais, incluindo as matrizes aquáticas, como mencionado anteriormente. É natural que antimicrobianos podem estar presentes no ambiente (ex.: antibióticos naturais), mas as fontes de poluição antrópicas são predominantes e, nesse sentido, os efluentes das ETEs lançados nos corpos d'água são indicados como a principal fonte de antimicrobianos em águas superficiais (FELIS et al., 2020). Estudos também

mostram que os efluentes de ETEs são fontes responsáveis pela introdução de bactérias resistentes e diferentes genes em águas superficiais (CACACE et al., 2019; GIEBUŁTOWICZ et al., 2018; RAZA et al., 2021). A ocorrência de antimicrobianos em águas superficiais representa alguns riscos para os organismos que vivem nesse habitat (FELIS et al., 2020). O primeiro risco está relacionado com a toxicidade aguda e crônica, uma vez que esses antimicrobianos são desenvolvidos para exercer diferentes atividades biológicas e podem exercê-las, portanto, sobre os organismos aquáticos pertencentes à diferentes níveis tróficos, especialmente em algas, cianobactérias e plantas (KOVALAKOVA et al., 2020). Outro risco em potencial da ocorrência de antimicrobianos em água superficial, assim como em esgoto, é a atuação como agentes selecionadores de bactérias resistentes, que permite sua dispersão ambiental (FELIS et al., 2020).

No Quênia, três rios, que são impactados por efluentes de ETEs, de hospitais, de assentamentos informais e pela pecuária, foram avaliados quanto às concentrações de antibióticos e foram verificadas concentrações variando de 0,1 a 6,84µg/L. Diferentes antibióticos foram detectados, sendo a classe de sulfonamidas a de maior ocorrência, com destaque para sulfametoxazol, devido às suas características como baixa capacidade de quelação e sorção (NGIGI; MAGU; MUENDO, 2019). Na cidade de Chongqing, sudoeste da China, rios que atravessam a cidade foram avaliados quanto às concentrações de antibióticos e foi verificado maiores ocorrências de fluoroquinolonas (ofloxacina, ciprofloxacina, norfloxacina e enrofloxacina), assim como de sulfonamidas. Além disso, foi verificado que os antibióticos sulfametoxazol, ofloxacina e eritromicina apresentaram altos riscos de toxicidade para organismos aquáticos (WANG et al., 2020).

Quanto à ocorrência de ARGs em água superficial, Raza et al. (2021) analisaram o efluente de uma ETE e as águas receptoras em dois pontos, à montante e à jusante ao lançamento do efluente, e verificaram abundância de genes que codificavam resistência aos

antibióticos β -lactâmicos, aminoglicosídeos, sulfonamidas e cloranfenicol à jusante do ponto de lançamento de efluentes pela ETE, em comparação com o ponto à montante, sugerindo o potencial impacto disseminador de ARGs pelas ETEs através das águas superficiais. O lançamento de efluentes de ETEs em água superficial, bem como poluição por fontes difusas, também está associado com a ocorrência de genes de tolerância aos metais e, nesse sentido, no Rio Ganges na Índia, foi verificada abundância de genes que conferiam tolerância ao arsênio, cobre, cobalto, mercúrio, prata, zinco, dentre outros (REDDY; DUBEY, 2019).

Recentemente, no Brasil, amostras de águas superficiais foram coletadas na Bahia para avaliação da circulação de *Enterobacteriaceae* resistentes aos antibióticos, bem como de ARGs. Foi verificado alta concentração de bactérias de origem fecal apresentando resistência a pelo menos um antibiótico clinicamente importante, bem como a diversidade de ARGs como *bla*_{KPC}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{VIM-2}, *bla*_{CTX-M}, *qnrS*, *aac(6')-Ib-cr*, concluindo que a água superficial avaliada pode funcionar como reservatório ambiental de bactérias e genes de resistência e que melhorias na gestão do saneamento pode diminuir a disseminação de AMR (BARTLEY et al., 2019).

No contexto da Saúde Única, que refere-se a integração entre a saúde humana, animal e ambiental, a poluição e disseminação de bactérias resistentes através dos rios coloca em risco a saúde humana considerando que frequentemente os rios são utilizados para atividades recreativas, de irrigação de terras agrícolas e para abastecimento de água (BENGTSSON-PALME; KRISTIANSSON; LARSSON, 2018; MCEWEN; COLLIGNON, 2018). Nesse sentido, em 2018, foi reportado o caso de um adolescente francês que foi admitido no hospital após afogamento no Rio Orb, que veio apresentar bacteremia causada por *Enterobacter absuriae* produtor de IMI-2. Isolados bacterianos do paciente e do rio em que houve o acidente foram avaliados e, através da digestão do DNA genômico e análise por PFGE (do inglês, *pulsed-field gel electrophoresis*), verificaram que os isolados apresentavam perfis de restrições idênticos (LAURENS et al., 2018). Essa evidência reforça a necessidade de avaliações

constantes de águas residuais e superficiais quanto a ocorrência de bactérias resistentes, considerando que os humanos estão expostos por diferentes rotas e, portanto, traz à luz a urgência de medidas de controle da resistência bacteriana em múltiplas áreas, não sendo restritas apenas ao ambiente hospitalar (ZAGUI et al., 2020).

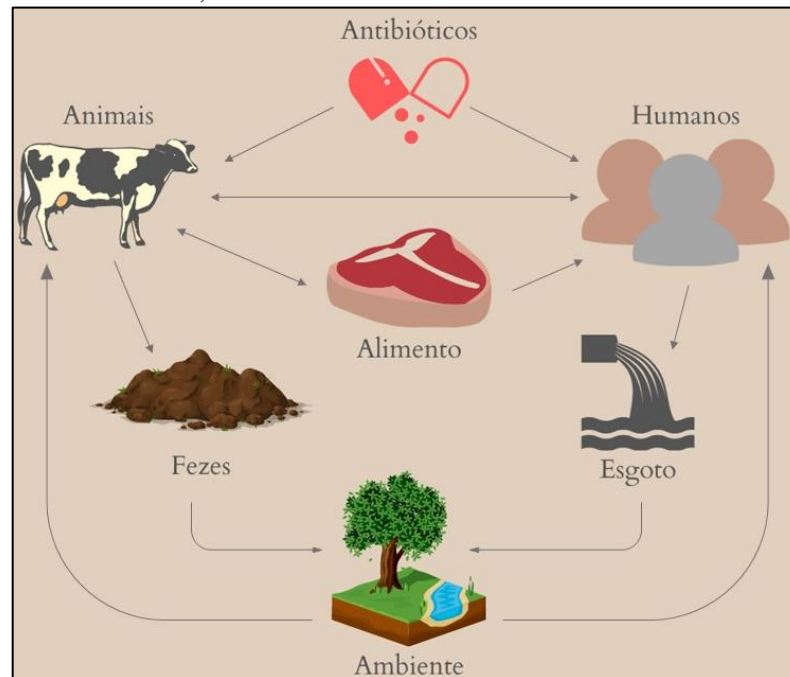
2.4. Saúde Única

O termo Saúde Única é utilizado para designar a integração entre a saúde humana, animal e ambiental e é uma abordagem de ação colaborativa entre profissionais de diferentes áreas do conhecimento que visam a integridade da saúde global (PETTAN-BREWER et al., 2021). Essa abordagem é relativamente importante para prevenir, predizer, detectar e responder às ameaças à saúde global, onde a abordagem mobiliza os setores da saúde pública, veterinária e ambiental para trabalharem em prol de novas ideias para soluções sustentáveis a longo prazo (OMS, 2017). A abordagem de Saúde Única é especialmente importante em questões de segurança hídrica e alimentar, gerenciamento de poluentes, controle de zoonoses e também combate à resistência antimicrobiana (MCEWEN; COLLIGNON, 2018; OMS, 2017).

Os antibióticos são utilizados vastamente na medicina humana e animal como medidas para tratamento de infecções, mas também uma expressiva terceira via, responsável pelo uso de mais de 70% dos antibióticos produzidos no mundo, é a pecuária que emprega os antibióticos como agentes profiláticos em grupos de animais (metafilaxia) e agentes promotores de crescimento, onde é administrado antibiótico em massa, a longo prazo e em concentrações subterapêuticas (MCEWEN; COLLIGNON, 2018). Essas condições contribuem para a seleção e disseminação de bactérias resistentes entre o grupo de animais que receberam as doses de antibióticos, mas também podem se disseminar para humanos através de alimentos e vias ambientais, além da contaminação do ambiente com antibióticos que são eliminados junto com

as excretas biológicas dos animais (Figura 5) (HERNANDO-AMADO, et al., 2020; MCEWEN; COLLIGNON, 2018).

Figura 5. Rotas de transmissão da resistência antimicrobiana entre humanos, animais e ambiente.



Fonte: Autoria própria.

Bactérias resistentes aos antibióticos são uma ameaça à saúde global e atualmente estão dispersas em diferentes compartimentos ambientais, como solo, água, esgoto e atinge animais e seres humanos. Faz parte da abordagem de Saúde Única o reconhecimento do problema e esquematizar um plano de combate. Nesse sentido, o Ministério da Saúde brasileiro, em 2018, lançou o Plano de Ação Nacional de Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos no Âmbito da Saúde Única que estabelece cinco objetivos estratégicos: 1) Melhorar a conscientização e a compreensão a respeito da AMR por meio de comunicação, educação e formação efetiva; 2) Fortalecer os conhecimentos e a base científica por meio da vigilância e pesquisa; 3) Reduzir a incidência de infecções com medidas eficazes de saneamento, higiene e prevenção de infecções; 4) Otimizar o uso de medicamentos antimicrobianos na saúde humana e animal; e 5) Preparar argumentos econômicos voltados para um investimento sustentável e aumentar os investimentos em novos medicamentos, meios diagnósticos e vacinas além de

outras intervenções (BRASIL, 2018). O Plano de Ação objetiva, portanto, a manutenção da tratabilidade e de prevenção de doenças infecciosas, assegurando o uso de antibióticos eficazes, sem riscos, de forma responsável e que seja acessível a todos. Para atingir os objetivos propostos, o Plano de Ação estimula a integração de múltiplas áreas para o controle da resistência bacteriana, considerando que esse enfrentamento não deve ser mais restrito aos ambientes assistenciais de saúde.

Objetivos

3. OBJETIVOS

Objetivo Geral

- Avaliar a presença de antibióticos e bactérias multirresistentes em esgoto hospitalar e sanitário e no córrego receptor e seu potencial impacto nos ecossistemas hídricos.

Objetivos Específicos

- Avaliar e quantificar os níveis de antibióticos (amoxicilina, ampicilina, ciprofloxacina, clindamicina, eritromicina, norfloxacina, ofloxacina, sulfametoxazol, tetraciclina e trimetropim) no esgoto de um hospital terciário e da estação de tratamento de esgotos, antes e após o tratamento, e no rio receptor.
- Avaliar a ocorrência e concentrações de coliformes totais e *Escherichia coli* no esgoto de um hospital terciário e da estação de tratamento de esgotos, antes e após o tratamento, e no rio receptor.
- Avaliar a ocorrência de bactérias multirresistentes (portadoras de genes de resistência a β -lactâmicos e de tolerância aos metais) no esgoto de um hospital terciário e da estação de tratamento de esgotos, antes e após o tratamento, e no rio receptor.
- Avaliar a eficiência do tratamento biológico por lodos ativados na remoção de antibióticos e bactérias.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Local do estudo e amostragem

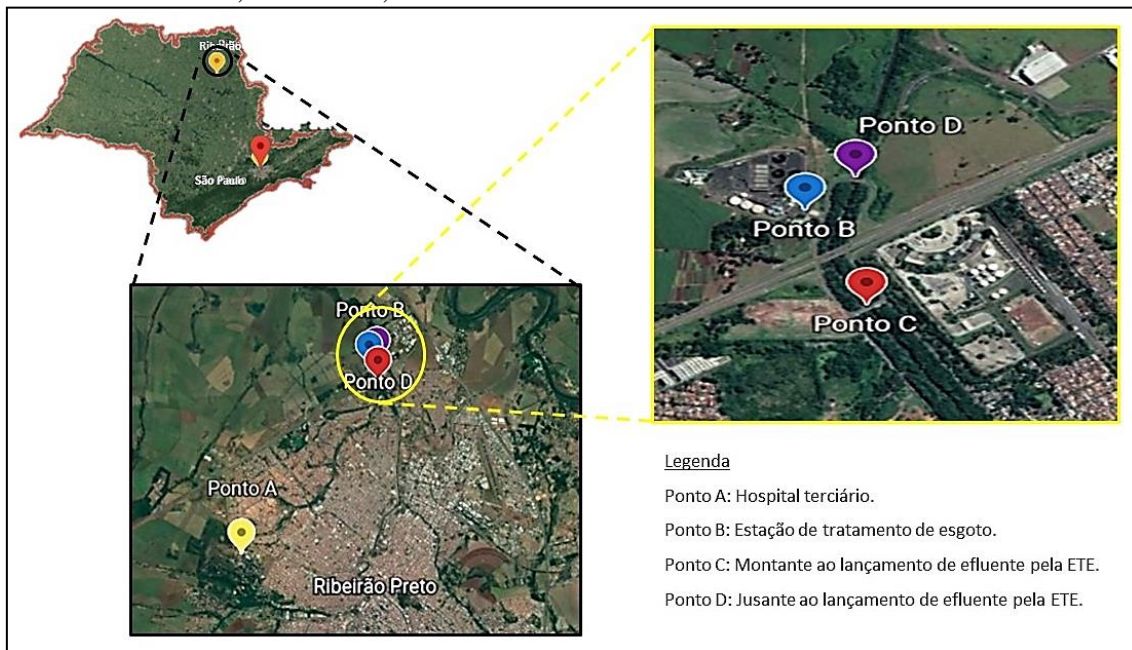
A cidade de Ribeirão Preto está localizada na região nordeste do Estado de São Paulo, com população estimada em 720.116 habitantes, distribuídos em um perímetro de 650,916 km² (IBGE, 2022). Ribeirão Preto possui um conjunto de hospitais terciários de referência na região, que prestam serviços de apoio, especializado e de diagnóstico. O presente estudo foi realizado em um dos hospitais que possui estrutura de 180.000m² de área construída, 746 leitos e alto fluxo de atendimentos (560.570 atendimentos) (HCFMRP, 2021). Seguindo normas da RDC 050/02 (BRASIL, 2002), o hospital descarta todo o esgoto gerado no sistema coletor da cidade que é levado para estação de tratamento de esgoto de Ribeirão Preto.

A empresa Ambient – Serviços Ambientais de Ribeirão Preto S. A. opera e mantém o sistema de tratamento de esgoto no município de Ribeirão Preto com duas unidades de tratamento, ETE-Caiçara e ETE-Ribeirão Preto. A ETE-Ribeirão Preto recebe os efluentes do referido hospital, bem como 84% do esgoto gerado no município, tratando-os pela tecnologia de lodos ativados. O tratamento de esgoto por esta tecnologia é amplamente utilizado no mundo e consiste em um processo estritamente biológico, no qual o esgoto é submetido a uma população de microrganismos que, na presença de oxigênio dissolvido, depuram a matéria orgânica. Após o tratamento, a disposição final do efluente tratado ocorre no Córrego Ribeirão Preto.

Assim os pontos selecionados para coleta de amostras são: Ponto A – esgoto hospitalar, coletado em três pontos que recolhem o esgoto da ala ambulatorial, da enfermaria e da junção dos efluentes; Ponto B – esgoto sanitário na ETE-Ribeirão Preto, na caixa de entrada (esgoto bruto) e na saída do decantador secundário (esgoto tratado); Ponto C – água superficial do Córrego Ribeirão Preto à montante (327m) do lançamento do efluente tratado; e Ponto D – água superficial do Córrego Ribeirão Preto à jusante (190m) do lançamento do efluente tratado

(Figura 6). Foram realizadas três campanhas de amostragens em cada ponto e as amostras foram coletadas de acordo com o *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA/AWWA/WEF, 2017), sendo mantidas sob refrigeração até o momento das análises, que não excedeu o período de 24 horas.

Figura 6. Pontos de coletas de amostras de esgoto hospitalar e sanitário e de água superficial em Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil.



4.2. Análise de antibióticos

Para o presente estudo foram selecionados antibióticos de diferentes classes baseando-se nos critérios de estabilidade, persistência e maior ocorrência ambiental. Assim, os antibióticos avaliados foram: amoxicilina, ampicilina, ciprofloxacina, clindamicina, eritromicina, norfloxacina, ofloxacina, sulfametoxazol, tetraciclina e trimetoprim. Os procedimentos de coleta e análise das amostras foram realizados segundo o método multirresíduo adaptado de Gros et al. (2013). Para análise de antibióticos foi utilizado o sistema de cromatografia líquida de ultra performance acoplado com detector de massas (UPLC-MS, WatersTM, Milford, EUA).

Inicialmente os padrões analíticos (*Toronto Research Chemicals* e *Sigma*) foram infundidos no detector de massas, bem como um mix (e soluções individuais) de todos os padrões analíticos no cromatógrafo, para determinação consensual das condições cromatográficas que resultaram em fonte de ionização positiva (ESI+), fase móvel composta por água e acetonitrila acidificadas (0,1% ácido fórmico), obedecendo um gradiente que variou de 5% de água a 100% de acetonitrila. O fluxo adotado foi de 0,4 mL.min⁻¹, temperatura do forno em 40°C, volume de injeção de 5 µL e tempo total de corrida de 12 minutos. A coluna utilizada para separação cromatográfica foi a Acquity UPLC BEH C18 (100mm x 2,1mm, 1,7µm). As condições determinadas para o detector de massas foram: temperatura da fonte de 400°C, fluxo de gás de 600 L.min⁻¹, voltagem capilar de 5000V e cone em 32V.

Assim, foi possível o estabelecimento das curvas de calibração para cada antibiótico, em que os padrões analíticos foram preparados em diferentes concentrações, resultando em duas faixas para plotagem das curvas, considerando a detectabilidade dos analitos pelo equipamento: a) amoxicilina, ampicilina, clindamicina, ofloxacina e tetraciclina na faixa de 50, 100, 250, 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000 x 10³ ng.L⁻¹; b) ciprofloxacina, eritromicina, norfloxacina, sulfametoxazol e trimetoprim na faixa de 5, 10, 20, 50, 100, 250, 500, 750, 1000 x 10³ ng.L⁻¹. Os parâmetros analíticos podem ser conferidos na Tabela 2.

Tabela 2. Parâmetros analíticos do método multirresíduo para quantificação de antibióticos em matrizes aquáticas.

Antibiótico	Tempo de Retenção	LD (ng L⁻¹)	LQ (ng L⁻¹)	Linearidade
Amoxicilina	2,78	12,46	41,53	0,9701
Ampicilina	2,38	13,20	44,01	0,9982
Ciprofloxacina	3,06	10,05	33,49	0,9982
Clindamicina	3,96	3,16	10,53	0,9900
Eritromicina	4,57	2,90	9,68	0,9989
Norfloxacina	2,32	13,74	45,79	0,9975
Ofloxacina	2,73	2,69	8,97	0,9955
Sulfametoxazol	3,52	2,87	9,56	0,9999
Tetraciclina	2,93	4,42	14,72	0,9960
Trimetoprim	2,87	32,54	108,47	0,9942

Para determinação dos analitos de interesse, amostras (1 L) de todos os pontos de amostragens foram coletadas em frascos âmbar com posterior filtração em sistema à vácuo com filtro de fibra de vidro 1,5 μm e 0,6 μm para remoção de sólidos em suspensão. Após filtração, as amostras foram novamente filtradas em sistema de seringa com filtro de nylon 0,22 μm acoplado e, ao volume de amostra, foi adicionado EDTA 0,1 M como quelante e HCl para ajuste do pH para 2,5.

Para a extração em fase sólida (SPE) utilizou-se cartuchos Oasis HLB 60mg 3 mL (WatersTM, Milford, EUA) que foram condicionados com 5 mL de metanol grau HPLC e 5 mL de água ultrapura (pH 2,5, acidificada com HCl), ambos com fluxo de 2 mL.min⁻¹. Posteriormente, a amostra foi passada no cartucho de extração, fluxo de 1 mL.min⁻¹, seguido de lavagem com 5 mL de água ultrapura, deixando o cartucho secar em temperatura ambiente por 5 minutos. Após o período de secagem foi feita a eluição com 30 mL de metanol grau HPLC (fluxo de 1 mL.min⁻¹), recolhidos em frasco *shot* de 50 mL, com posterior evaporação até atingir à *secura*, sob fluxo de gás nitrogênio. A amostra foi reconstituída em 500 μL de solução de metanol e água ultrapura (50:50, v/v) – concentração da amostra em 2.000 vezes –. Após a reconstituição houve a injeção no cromatógrafo para quantificação dos antibióticos investigados. Vale ressaltar que as concentrações dos antibióticos por litro de amostra foram obtidas a partir da razão entre as concentrações detectadas pelo UPLC-MS e fator de concentração da amostra (2.000).

4.3. Análises Microbiológicas

4.3.1. Determinação de coliformes totais e *Escherichia coli*

A determinação de bactérias indicadoras do grupo coliforme é utilizada como indicadora de contaminação fecal, pois estão presentes no trato intestinal de humanos e animais, e sua presença indica riscos da presença de organismos patogênicos e revela a eficiência na remoção de tais microrganismos por tecnologias de tratamentos de água e esgoto (CETESB, 2018). Para

a determinação de coliformes totais e termotolerantes nas amostras de esgotos foi utilizada a norma técnica de tubos múltiplos L5.202 adaptada da CETESB e, para tal, foram coletados 100 mL das amostras em frascos de vidro previamente esterilizados.

Inicialmente foi realizada uma diluição onde foi transferido 10 mL da amostra à um frasco contendo 90 ± 2 mL de água destilada estéril, representando a primeira diluição 10^{-1} . A partir da diluição 10^{-1} , 10 mL foram transferidos para outro frasco contendo 90 ± 2 mL de água destilada estéril, representando a segunda diluição 10^{-2} . Esse processo foi repetido até diluição 10^{-7} . Com uma pipeta, 5 mL foram coletados de cada diluição sendo distribuídos em 5 tubos (1 mL/tubo) contendo 9 mL de substrato cromogênico (Figura 1). Após incubação por 24 horas a 37°C , os tubos que apresentarem coloração amarela foram considerados positivos para coliformes totais e os tubos que apresentarem fluorescência sob luz UV considerados positivos para *Escherichia coli*. De acordo com a quantidade de tubos positivos, será formado um índice de três números que indicará um índice utilizado para cálculo do Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais e/ou *Escherichia coli* a cada 100 mL de amostra. A concentração de coliformes foi determinada a partir da seguinte equação:

$$\frac{\text{NMP}}{100\text{mL}} = \frac{\text{índice} \times 10}{\text{menor fator de diluição}}$$

4.3.2. Determinação de bactérias fenotipicamente produtoras de ESBL e carbapenemases

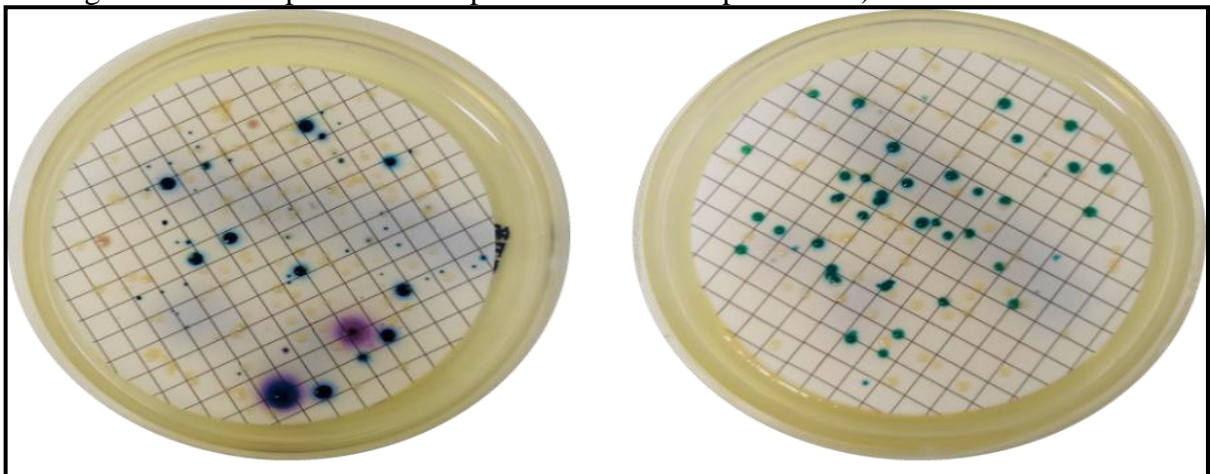
Para a quantificação de bactérias fenotipicamente produtoras (BFP) de ESBL e de carbapenemases, amostras (100 mL) foram coletadas em frascos de vidro previamente esterilizados. É conhecido que amostras de esgoto possuem elevadas cargas microbianas, assim as amostras coletadas foram diluídas na proporção de 1:9, ou seja, 10 mL da amostra de esgoto e 90 mL de água destilada estéril, configurando como a primeira diluição (10^{-1}). Dessa primeira diluição, 10 mL foram transferidos para um novo frasco contendo 90 mL de água destilada

estéril (10^{-2}). Esses procedimentos foram seguidos até alcançar a diluição 10^{-7} . Posteriormente, 1 mL de cada diluição foi transferido para um recipiente com 90 mL de água destilada estéril. Este volume de água representa apenas um veículo de transporte da amostra diluída, para que as colônias cresçam de forma uniforme pela membrana de filtração. A seguir, procedeu-se com a filtração à vácuo com membrana de ésteres de celulose.

Tomando os devidos cuidados assépticos, a membrana foi transferida para o meio de cultura cromogênico seletivos (meios: ESBL, para detecção fenotípica de bactérias produtoras de β -lactamases de espectro estendido; KPC, para detecção fenotípica de bactérias produtoras de carbapenemases - Probac[®]). As placas foram incubadas por 24 horas, a 37 °C (Figura 7), e, terminado o tempo de incubação, foi realizado a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) para cálculo da quantidade de bactérias por 100 mL de amostra de esgoto, de acordo com a seguinte equação:

$$\frac{\text{UFC}}{100\text{mL}} = \frac{\text{Número de colônias}}{\text{Fator de diluição}} \times 100$$

Figura 7. Membranas de ésteres de celulose dispostas em meios de cultura cromogênico para isolamento e quantificação (UFC/100mL) de bacilos gram-negativos produtores de ESBL e carbapenemases em amostras de esgoto hospitalar, esgoto sanitário e água superficial. (Esquerda: Meio cromogênico seletivo para bactérias produtoras de ESBL. Direita: Meio cromogênico seletivo para bactérias produtoras de carbapenemases).



4.3.2.1. Isolamento e identificação bacteriana

Colônias de diferentes colorações foram selecionadas para isolamento bacteriano em ágar MacConkey. Após a obtenção de colônias puras, estas foram preservadas em microtubo contendo meio líquido *Brain Heart Infusion* (BHI) suplementado com glicerol a 20%, com posterior congelamento a -80°C. Para a identificação dos isolados utilizou-se o protocolo desenvolvido por Carneiro et al. (2020). Para tal, os isolados foram cultivados em ágar MacConkey (37°C, 24 horas) e, após período de incubação, foi realizada uma suspensão turva da bactéria em microtubo contendo 1 mL de etanol 70% (Sigma), no qual permaneceu em repouso por 15 minutos. Findo o tempo, o tubo contendo a suspensão foi centrifugado a 13.000 rpm, por 3 minutos, com posterior descarte do sobrenadante. O microtubo foi deixado aberto para evaporação do etanol residual (5 minutos) e a biomassa sedimentada impregnada em discos de papel filtro não impregnados estéreis. Os discos foram deixados em temperatura ambiente por 24 horas para secagem e encaminhados ao Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana do Hospital das Clínicas de Porto Alegre, para identificação por MALDI-TOF MS.

4.3.2.2. Teste de susceptibilidade aos antibióticos

O teste de susceptibilidade aos antibióticos (AST) foi realizado pelo método de disco-difusão em ágar, de acordo com o *Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (BrCAST, 2022). Desse modo, foi realizada uma suspensão da bactéria teste em solução de NaCl 0,9%, com turvação semelhante a 0,5 da escala de McFarland. Um swab estéril foi submergido e, após remoção do excesso, foi feito inóculo em ágar Mueller-Hinton em três direções distintas, percorrendo toda a superfície do meio de cultura. Em seguida, com auxílio de um dispensador, discos de antibióticos (Oxoid) foram dispostos nas placas. Os antibióticos testados foram amoxicilina-clavulanato, ampicilina-sulbactam, piperacilina-tazobactam, cefepime, cefuroxima, ceftazidima, cefotaxima, cefoxitina, aztreonam, ertapenem, imipenem,

meropenem, ciprofloxacina, levofloxacina, norfloxacina, ampicacina, gentamicina, tobramicina, sulfametoxazol-trimetoprim e cloranfenicol. As placas foram incubadas em 37°C, por 24 horas, e, após este período, foi realizada a leitura dos halos de inibição e classificação em resistente, intermediário e sensível, de acordo com os pontos de corte padronizados pelo BrCAST. A partir da classificação dos isolados como resistente, foi realizado o cálculo do Índice de Resistência à Múltiplos Antibióticos (MAR Index, do inglês *Multiple Antibiotic Resistance Index*), que permite identificar fontes de alto risco. O MAR Index foi calculado e interpretado de acordo com Krumperman (1983) e Mir et al. (2022), no qual o MAR Index é calculado pela razão entre o número de antibióticos que o isolado apresentou resistência e o número de antibióticos testados, onde valores acima de 0,2 indica fonte de alto risco.

4.3.2.3. Investigação molecular de genes de resistência aos antibióticos e de tolerância aos metais

Para a investigação dos genes de resistência aos antibióticos e de tolerância aos metais, o DNA genômico foi extraído através do protocolo de lise térmica (ZAGUI et al., 2021). Em um microtubo contendo 300 µL de água deionizada foi feita uma suspensão turva dos isolados, que foram submetidos à banho-maria (100°C) por 15 minutos. Após o período, os microtubos foram centrifugados a 14.000 rpm, por 15 minutos, e 200 µL foram recolhidos em um novo microtubo, com posterior acondicionamento em -20°C. A qualidade e a concentração (ng/µL) do DNA foram mensuradas pelo espectrofotômetro NanoDrop2000 (Thermo Scientific).

A partir do DNA extraído, foram investigados por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) genes codificadores de ESBL (*bla*_{CTX-M}-1, -2, -8, -9, -25), *bla*_{VEB}, *bla*_{PER}, *bla*_{GES}, *bla*_{BEL}), de carbapenemases (*bla*_{NDM}, *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{KPC}, *bla*_{OXA-48}) e de tolerância aos principais metais utilizados como agentes antimicrobianos: prata (*silA*), cobre (*pcoD*), mercúrio (*merA*). Os

primers utilizados, bem como tamanho dos amplicons e temperaturas de *annealing* estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. *Primers* utilizados para amplificação de genes codificadores de ESBL, carbapenemases e de tolerância aos metais.

Gene	<i>Primers</i> *	Sequência de nucleotídeos (5' – 3')	Tamanho do gene amplificado (pb)	T (°C) <i>annealing</i>	Referência
<i>bla</i> _{NDM}	<i>bla</i> _{NDM} f	ACT TGG CCT TGC TGT CCT T	603	57°C	BOGAERTS et al., 2013
	<i>bla</i> _{NDM} r	CAT TAG CCG CTG CAT TGA T			
<i>bla</i> _{VIM}	<i>bla</i> _{VIM} f	TGT CCG TGA TGG TGA TGA GT	437	57°C	BOGAERTS et al., 2013
	<i>bla</i> _{VIM} r	ATT CAG CCA GAT CGG CAT C			
<i>bla</i> _{IMP}	<i>bla</i> _{IMP} f	ACA YGG YTT RGT DGT KCT TG	387	57°C	BOGAERTS et al., 2013
	<i>bla</i> _{IMP} r	GGT TTA AYA AAR CAA CCA CC			
<i>bla</i> _{KPC}	<i>bla</i> _{KPC} f	TCG CCG TCT AGT TCT GCT GTC TTG	353	57°C	BOGAERTS et al., 2013
	<i>bla</i> _{KPC} r	ACA GCT CCG CCA CCG TCA T			
<i>bla</i> _{OXA}	<i>bla</i> _{OXA-48} f	ATG CGT GTA TTA GCC TTA TCG	265	57°C	BOGAERTS et al., 2013
	<i>bla</i> _{OXA-48} r	CAT CCT TAA CCA CGC CCA AAT C			
<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>bla</i> _{CTX-M-1} f	AAA AAT CAC TGC GCC AGT TC	415	52°C	WOODFORD; FAGAN; ELLINGTON, 2006
	<i>bla</i> _{CTX-M-1} r	AGC TTA TTC ATC GCC ACG TT			
	<i>bla</i> _{CTX-M-2} f	CGA CGC TAC CCC TGC TAT T	552	52°C	WOODFORD; FAGAN; ELLINGTON, 2006
	<i>bla</i> _{CTX-M-2} r	CCA GCG TCA GAT TTT TCA GG			
	<i>bla</i> _{CTX-M-8} f	TCG CGT TAA GCG GAT GAT GC	666	52°C	WOODFORD; FAGAN; ELLINGTON, 2006
<i>bla</i> _{CTX-M-8} r	AAC CCA CGA TGT GGG TAG C				
<i>bla</i> _{CTX-M-9} f	CAA AGA GAG TGC AAC GGA TG	205	52°C	WOODFORD; FAGAN; ELLINGTON, 2006	
<i>bla</i> _{CTX-M-9} r	ATT GGA AAG CGT TCA TCA CC				
<i>bla</i> _{CTX-M-25}	<i>bla</i> _{CTX-M-25} f	GCA CGA TGA CAT TCG GG	327	52°C	WOODFORD; FAGAN; ELLINGTON, 2006
	<i>bla</i> _{CTX-M-25} r	AAC CCA CGA TGT GGG TAG C			
<i>bla</i> _{VEB}	<i>bla</i> _{VEB} f	CGA CTT CCA TTT CCC GAT GC	376	57°C	BOGAERTS et al., 2013
	<i>bla</i> _{VEB} r	TGT TGG GGT TGC CCA ATT TT			
<i>bla</i> _{PER}	<i>bla</i> _{PER} f	AGT GTG GGG GCC TGA CGA T	725	57°C	BOGAERTS et al., 2013
	<i>bla</i> _{PER} r	GCA ACC TGC GCA ATR ATA GCT T			
<i>bla</i> _{GES}	<i>bla</i> _{GES} f	CTG GCA GGG ATC GCT CAC TC	600	57°C	BOGAERTS et al., 2013
	<i>bla</i> _{GES} r	TTC CGA TCA GCC ACC TCT CA			
<i>bla</i> _{BEL}	<i>bla</i> _{BEL} f	CGA CAA TGC CGC AGC TAA CC	448	57°C	BOGAERTS et al., 2013
	<i>bla</i> _{BEL} r	CAG AAG CAA TTA ATA ACG CCC			
<i>silA</i>	<i>silA</i> f	GCA AGA CCG GTA AAG CAG AG	936	59°C	MOURÃO et al., (2015)
	<i>silA</i> r	CCT GCC AGT ACA GGA ACC AT			
<i>pcoD</i>	<i>pcoD</i> f	CTG GCC ACA CTT GCC TGG GG	500	55°C	MOURÃO et al., (2015)
	<i>pcoD</i> r	CAC GCT ACG GCG CCC AGA AT			
<i>merA</i>	<i>merA</i> f	ACC ATC GGC GGC ACC TGC GT	1238	67°C	MOURÃO et al., (2015)
	<i>merA</i> r	ACC ATC GTC AGG TAG GGG AAC			

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

Para amplificação dos genes foi utilizado o termociclador Mastercycler ® ep (Eppendorf), em que as condições estabelecidas foram de desnaturação inicial a 95°C, por 5

minutos, 30 ciclos compostos de desnaturação do DNA (95°C, 1 minuto), *annealing* dos *primers* (1 minuto) e extensão (72°C, 1 minuto). Após os 30 ciclos, o material foi submetido a extensão final por 10 minutos a 72°C. Os volumes utilizados de cada componente para reação de PCR estão apresentados na Tabela 4. Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose (1,5%) com corante SYBR *Safe* (Invitrogen) e visualizados no fotodocumentador AlphaImager (Alpha Innotech), sob luz UV.

Tabela 4. Reagentes utilizados para detecção e amplificação dos genes de resistência aos antibióticos e de tolerância aos metais.

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
<i>Primer</i> forward (16 pmol/µL)	1,5 µL	24 pmol
<i>Primer</i> reverse (16 pmol/µL)	1,5 µL	24 pmol
GoTaq [®] DNA Polymerase (5 U/µL)	0,125 µL	0,625 U/µL

4.4. Análise estatística

Os dados foram plotados em planilhas e transferidos para o programa GraphPad Prism v. 8, para a realização dos testes estatísticos e gráficos. Para os dados de quantificação de bactérias indicadoras, de BFP-ESBL e BFP-C, e análise do MAR Index, foi utilizado a estatística descritiva para obtenção dos valores de tendência central e de dispersão, bem como aplicado o teste Kruskal-Wallis, considerando $p < 0,05$ como diferença estatisticamente significantes. Para verificação da coexistência de genes foi utilizado a Correlação Linear de Pearson, 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.

Resultados e Discussão

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Análise de antibióticos

Os antibióticos são amplamente utilizados na sociedade atual, seja para tratamento de infecções em humanos e animais, bem como agentes promotores de crescimento em animais de produção. O uso inadequado desses compostos os faz atingir diferentes compartimentos ambientais, como esgoto e água superficial. Na Tabela 5 estão apresentadas as concentrações (ng L^{-1}) de antibióticos detectadas em amostras de esgoto hospitalar, sanitário e água superficial.

Tabela 5. Concentrações (ng L^{-1}) de antibióticos em amostras de esgoto hospitalar, sanitário e água superficial.

Ponto de Amostragem	Concentração de Antibióticos (ng L^{-1}) ⁴									
	AMX	AMP	CIP	CLI	ERI	NOR	OFL	STX	TET	TRI
Ambulatório ¹	1063,94	800,31	<LD	3,39	<LD	<LD	<LD	<LQ	41,02	<LD
Enfermaria ¹	452,20	689,70	35,80	<LD	<LD	<LQ	<LD	112,56	29,13	<LD
Junção ¹	1896,29	1113,07	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	12,09	<LD	<LD
ETE-Bruto ²	966,44	767,58	55,63	<LD	<LD	<LD	<LD	680,51	115,52	<LD
ETE-Tratado ²	450,10	637,96	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	28,26	39,79	<LD
Montante ³	402,46	629,09	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	10,22	43,66	<LD
Jusante ³	177,87	538,91	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	28,09	40,43	<LD

¹Concentrações obtidas a partir de uma campanha de amostragem.

²Concentrações médias a partir de três campanhas de amostragem.

³Concentrações médias a partir de duas campanhas de amostragem.

⁴AMX, amoxicilina, AMP, ampicilina, CIP, ciprofloxacina, CLI, clindamicina, ERI, eritromicina, NOR, norfloxacina, OFL, ofloxacina, STX, sulfametoxazol, TET, tetraciclina, TRI, trimetoprim.

Os antibióticos β -lactâmicos são amplamente consumidos no Brasil (OMS, 2019) o que aumenta a probabilidade de detecção em amostras de esgoto. Nesse sentido, os antibióticos amoxicilina e ampicilina foram encontradas em altas concentrações no efluente hospitalar, bem como no efluente sanitário, sendo superior ao verificado por Harrabi et al. (2018), que detectou $75,4 \text{ ng L}^{-1}$ de ampicilina no efluente de uma ETE em uma cidade altamente industrializada na Tunísia. Os antibióticos ampicilina e amoxicilina são amplamente utilizados para tratamento de infecções comunitárias que os fazem ser administrados para tratamento fora do contexto hospitalar (CONSTANTINO et al., 2020). Assim, embora estejam em concentrações inferiores às encontradas no hospital, verifica-se concentrações significantes desses antibióticos no

efluente sanitário e água superficial superiores às encontradas na literatura (ROYA et al., 2018; SHUAA et al., 2019), sugerindo sua ampla dispersão em matrizes aquáticas.

Os antibióticos da classe das quinolonas (ciprofloxacina, norfloxacina e ofloxacina) são amplamente utilizados, mas não exclusivamente, para tratamento de infecções urinárias, principalmente nas residências dos pacientes (BUSH et al., 2020). A ciprofloxacina foi detectada no esgoto hospitalar da ala da enfermaria ($35,80 \text{ ng L}^{-1}$) e no esgoto sanitário bruto ($55,63 \text{ ng L}^{-1}$) em concentrações semelhantes às encontradas na Croácia (SENTA; TERZIC; AHEL, 2013). Por outro lado, as concentrações encontradas são inferiores às detectadas na Espanha, o que pode sugerir protocolos diferentes de antibióticoterapia, que refletem diretamente na composição dos antibióticos no esgoto (RODRIGUEZ-MOZAZ et al., 2015).

Os antibióticos da classe das sulfonamidas compreendem os mais investigados e detectados em amostras aquáticas, especialmente o sulfametoxazol (OMUFEREN; MASEKO; OLOWOYO, 2022). No presente estudo, sulfametoxazol foi detectado em todos os pontos de amostragem, com exceção do esgoto ambulatorial, em concentrações variando de $12,09 \text{ ng L}^{-1}$ a $1981,25 \text{ ng L}^{-1}$. As concentrações no esgoto hospitalar e efluente sanitário assemelham-se ao verificado por Verlicchi et al. (2012) e Guerra et al. (2014), respectivamente, enquanto as concentrações em água superficial apresentam-se superiores às observadas por López-Serna, Mira e Damià (2012). Destaca-se que o sulfametoxazol é um antibiótico que apresenta tempo de meia-vida em água superficial de 20 dias, o que pode implicar em sua dispersão ao longo do recurso hídrico, levando a toxicidade aguda e crônica aos microrganismos aquáticos (algas, crustáceos, ciliados), bem como pressão seletiva em bactérias (FELIS et al., 2020; LAM et al., 2004).

A tetraciclina é um antibiótico de amplo espectro, sendo utilizado para tratamento de diferentes infecções bacterianas, mas também têm seu uso em animais de produção como promotores de crescimento, que a faz ser detectado amplamente em matrizes aquáticas, como

verificado pela recente revisão de literatura conduzida por Omufere, Maseko, Olowoyo (2022). No presente estudo, concentrações de tetraciclina variam de 29,13 ng L⁻¹ a 342,15 ng L⁻¹. As concentrações no esgoto hospitalar e água superficial corroboram com as detectadas por Verlicchi et al. (2012), divergindo das concentrações encontradas por Tahrani et al. (2017), onde as concentrações do presente estudo foram inferiores ao estudo realizado na Tunísia. Um fato interessante, de acordo com Felis et al. (2020), é que as concentrações de tetraciclina em água superficial são em média 40 ng L⁻¹, corroborando com o presente, devido às suas propriedades quelantes que propiciam a formação de complexos com íons metálicos (cálcio, alumínio, magnésio, ferro) e maior afinidade com solos/sedimentos, em relação à coluna de água nos recursos hídricos. Os antibióticos são considerados uma das classes de medicamentos de maior sucesso na história da medicina, no entanto, o uso equivocado desses fármacos levam às sérias consequências, como a disseminação global de bactérias resistentes e os riscos de toxicidade em ambientes aquáticos. Esse cenário é ainda mais preocupante quando levamos em consideração o descarte incorreto desses fármacos, principalmente em domicílio. Os antibióticos frequentemente são administrados para uso em domicílio e, com a cultura de “farmácias caseiras” com a sobra dos medicamentos, a automedicação e o descarte através da rede de esgoto são problemas ainda enfrentados no Brasil (CONSTATINO et al., 2020). Reitera-se a necessidade de educação em saúde da população e projetos de logística reversa para recolhimento desses medicamentos como estratégias para mitigação da resistência bacteriana e os impactos ambientais advindos do descarte inadequado dos antibióticos.

5.2. Análises Microbiológicas

5.2.1. Ocorrência de coliformes totais e *Escherichia coli*

As bactérias do grupo coliforme totais e *E. coli* são utilizadas como indicadores de poluição fecal na avaliação das condições sanitárias de matrizes aquáticas, pois fazem parte da

microbiota intestinal de mamíferos. A determinação de coliformes pode ser empregada para avaliação da condição microbiológica de água superficial para fins de balneabilidade e também para avaliar eficiência de tratabilidade de tecnologias de tratamento de água e esgoto. A seguir estão apresentadas as concentrações médias da determinação de coliformes totais (Tabela 6) e de *Escherichia coli* (Tabela 7) nas amostras do esgoto hospitalar, sanitário e água superficial.

Tabela 6. Número Mais Provável (NMP/100mL) de coliformes totais em amostras de esgoto hospitalar, sanitário e água superficial.

Ponto de Amostragem	NMP/100mL Coliformes totais					p-valor
	Mín.	Máx.	Média	DP	CV	
Ambulatório	4,60E+07	5,40E+07	5,13E+07	4,62E+06	8,998%	
Enfermaria	9,20E+06	5,40E+07	2,64E+07	2,41E+07	91,45%	
Junção	3,50E+07	1,60E+08	8,30E+07	6,74E+07	81,15%	
Bruto	1,40E+07	1,60E+08	6,97E+07	7,89E+07	113,3%	0,0627
Tratado	1,10E+06	1,60E+08	5,41E+07	9,17E+07	169,7%	
Montante	1,40E+05	9,20E+05	5,33E+05	3,90E+05	73,13%	
Jusante	3,50E+05	1,70E+07	6,09E+06	9,45E+06	155,2%	

Mín., mínimo. Máx., máximo. DP, desvio-padrão. CV, coeficiente de variação.

Tabela 7. Número Mais Provável (NMP/100mL) de *Escherichia coli* em amostras de esgoto hospitalar, sanitário e água superficial.

Ponto de Amostragem	NMP/100mL <i>Escherichia coli</i>					p-valor
	Mín.	Máx.	Média	DP	CV	
Ambulatório	7,00E+06	5,40E+07	2,57E+07	2,49E+07	97,19%	
Enfermaria	5,40E+05	5,40E+07	1,93E+07	3,00E+07	155,3%	
Junção	3,50E+05	1,60E+07	1,01E+07	8,52E+06	84,19%	
Bruto	1,60E+06	1,10E+07	7,87E+06	5,43E+06	68,99%	0,0299
Tratado	1,10E+05	5,40E+06	2,20E+06	2,81E+06	127,6%	
Montante	7,90E+03	3,50E+04	2,23E+04	1,36E+04	61,12%	
Jusante	3,50E+04	5,40E+05	2,15E+05	2,82E+05	131,2%	

Mín., mínimo. Máx., máximo. DP, desvio-padrão. CV, coeficiente de variação.

As concentrações médias de coliformes totais e de *Escherichia coli* manteve-se semelhante nos pontos de amostragem do hospital, bem como em relação ao do esgoto sanitário. Embora não tenha sido verificado diferença estatisticamente significativa, é possível verificar que houve decaimento na concentração média de ambos indicadores no esgoto tratado, após o tratamento por Lodos Ativados. Em termos legais, a legislação vigente Resolução CONAMA Nº 430, de 13 de maio de 2011, que estabelece as condições e padrões de lançamentos de efluentes, não inclui limite máximo permitido para coliformes totais e *Escherichia coli* (BRASIL, 2011).

Com relação aos pontos de amostragem à montante e à jusante do lançamento do efluente sanitário tratado pela ETE-Ribeirão Preto, no Córrego Ribeirão Preto, verifica-se um aumento nas concentrações médias de ambos indicadores, o que pode ser reflexo da persistência das bactérias do grupo coliforme no efluente sanitário tratado que é lançado no referido córrego, o que vai de acordo com o verificado por Kumar et al. (2022) e Pascual-Benito et al. (2020) que verificaram os impactos do lançamento de efluentes sanitários em água superficial e constataram aumento nas concentrações dos indicadores bacterianos em pontos de amostragem à jusante de ETEs.

A determinação de coliformes totais e *Escherichia coli* transcende a relevância em termos de eficiência de remoção índices de tratabilidade. Em termos de saúde pública, a detecção desses indicadores em amostras aquáticas, seja destinada para abastecimento público ou em água superficial, revela a possível presença de microrganismos patogênicos, como por exemplo bactérias patogênicas (ex.: *Salmonella* spp.) e parasitas (ex.: *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp.), uma vez que apresentam os mesmos mecanismos de dispersão ambiental (veiculação hídrica) e modo de infecção (oral) (GARCÍA-ALJARO et al., 2019).

5.2.2. Ocorrência de bactérias fenotipicamente produtoras de ESBL e carbapenemases

Nas Tabelas 8 e 9 estão apresentadas as concentrações médias de bactérias fenotipicamente produtoras de ESBL (BFP-ESBL) e de carbapenemases (BFP-C), respectivamente.

Tabela 8. Concentração (UFC/100mL) de bactérias fenotipicamente produtoras (BFP) de ESBL (resistentes às cefalosporinas de amplo espectro) em amostras de esgoto hospitalar, sanitário e água superficial.

Ponto de Amostragem	UFC/100mL BFP ESBL					<i>p</i> -valor
	Mín.	Máx.	Média	DP	CV	
Ambulatório	7,70E+03	5,40E+05	1,88E+05	3,05E+05	162,3%	0,1092
Enfermaria	6,80E+04	1,01E+09	3,37E+08	5,83E+08	172,8%	
Junção	2,50E+05	4,90E+09	1,63E+09	2,83E+09	173,1%	
Bruto	1,52E+06	1,40E+08	7,75E+07	7,02E+07	90,60%	
Tratado	1,42E+05	1,14E+09	3,80E+08	6,58E+08	173,0%	
Montante	6,40E+04	1,20E+05	9,97E+04	3,10E+04	31,09%	
Jusante	1,46E+05	1,05E+07	3,93E+06	5,71E+06	145,4%	

Mín., mínimo. Máx., máximo. DP, desvio-padrão. CV, coeficiente de variação.

Tabela 9. Concentração (UFC/100mL) de bactérias fenotipicamente produtoras (BFP) de carbapenemases (resistentes aos carbapenêmicos) em amostras de esgoto hospitalar, sanitário e água superficial.

Ponto de Amostragem	UFC/100mL BFP Carbapenemase					<i>p</i> -valor
	Mín.	Máx.	Média	DP	CV	
Ambulatório	2,70E+04	7,20E+06	2,43E+06	4,13E+06	170,0%	0,2127
Enfermaria	6,50E+04	1,16E+10	4,21E+09	6,42E+09	152,3%	
Junção	5,30E+05	7,60E+10	3,07E+10	4,00E+10	130,2%	
Bruto	1,78E+08	5,70E+08	3,10E+08	2,25E+08	72,81%	
Tratado	1,54E+05	1,85E+09	6,17E+08	1,07E+09	173,0%	
Montante	1,03E+05	7,00E+05	3,28E+05	3,24E+05	98,77%	
Jusante	1,90E+05	1,74E+07	6,20E+06	9,71E+06	156,5%	

Mín., mínimo. Máx., máximo. DP, desvio-padrão. CV, coeficiente de variação.

BFP-ESBL e BFP-C foram detectadas em altas concentrações, superiores às concentrações dos indicadores de poluição fecal, especialmente nas amostras de origem hospitalar, corroborando com os achados de Haller et al. (2018). Como esperado, as concentrações de ambos os grupos foram mais altas nas amostras provenientes do esgoto da enfermaria, com relação às amostras do esgoto do ambulatório. O amplo uso de antibióticos intra-hospitalar pode refletir nas concentrações dessas bactérias, considerando que os antibióticos são eliminados junto com as excretas biológicas dos pacientes alterando, assim, a composição microbiana do efluente dessa ala hospitalar (KORZENIEWSKA; HARNISZ, 2013). Já no ponto que une os efluentes do hospital (junção), a concentração foi superior em relação aos outros pontos de amostragem o que pode estar relacionada pela múltipla pressão seletiva de agentes químicos que são utilizados em diferentes setores do hospital que se unem nesse ponto, como os antibióticos, detergentes, metais e resíduos radiográficos (CARRARO et al., 2016).

Nas amostras do efluente sanitário, verificou-se também altas concentrações de BFP-ESBL e de BFP-C e persistência no efluente tratado, com aumento nas concentrações médias. É tido que as ETEs podem atuar como reservatórios de bactérias multirresistentes pelos diversos fatores que proporcionam para as bactérias, como uma fonte rica em matéria orgânica, pH, temperatura controlada, oxigenação e tempo de retenção hidráulico que, juntos, permitem a multiplicação e transferência de materiais genéticos (MANAIA et al., 2018; RIZZO et al., 2013). Ademais, a presença de compostos com atividade antimicrobiana, como os antibióticos verificados pelo presente estudo (Tabela 5), podem contribuir para a seleção de bactérias resistentes e, portanto, refletir na persistência e concentrações superiores dessas bactérias no efluente tratado, em relação ao efluente bruto.

Assim como para os coliformes, não há limite máximo permitido de bactérias resistentes no efluente, que as fazem com que não sejam controladas legalmente, assim, as ETEs

representam uma fonte de bactérias resistentes para o ambiente. Nesse sentido, verificou-se que as concentrações médias de BFP-ESBL e BFP-C foram superiores no ponto à jusante da ETE, em relação ao ponto à montante, o que pode evidenciar o impacto do lançamento do efluente tratado no Córrego Ribeirão Preto com a carga microbiana resistente aos antibióticos. Ademais, as concentrações de bactérias à montante sugere o lançamento de esgoto bruto no corpo hídrico de forma clandestina, bem como indica a ampla dispersão de bactérias multirresistentes no ambiente.

5.2.2.1. Isolamento e identificação bacteriana

A partir dos meios utilizados para quantificação de BFP-ESBL e BFP-C, colônias de diferentes colorações foram selecionadas para isolamento, identificação, antibiograma e pesquisa de genes. No total, 108 isolados foram obtidos e identificados por MALDI-TOF, dos quais 11 são provenientes do esgoto do ambulatório (7 *K. pneumoniae*, 1 *P. putida*, 1 *E. bugandensis*, 1 *E. coli*, 1 *B. cepacia*), 21 isolados do esgoto da enfermaria (15 *K. pneumoniae*, 2 *E. bugandensis*, 1 *E. coli*, 1 *K. oxytoca*, 1 *K. variicola*, 1 *P. aeruginosa*), 25 isolados da junção dos efluentes (14 *K. pneumoniae*, 5 *E. kobei*, 3 *E. bugandensis*, 1 *E. cloacae*, 1 *B. cepacia*, 1 *E. coli*), 15 isolados do esgoto bruto da ETE (9 *K. pneumoniae*, 2 *B. cepacia*, 2 *E. coli*, 1 *C. freundii*, 1 *E. bugandensis*), 15 isolados do esgoto tratado da ETE (8 *B. cepacia*, 3 *K. pneumoniae*, 2 *E. coli*, 1 *E. bugandensis*, 1 *K. variicola*), 10 isolados à montante (10 *B. cepacia*) e 11 isolados à jusante (7 *B. cepacia*, 2 *K. pneumoniae*, 1 *E. cloacae*, 1 *W. falsenii*).

Nota-se uma predominância de enterobactérias, majoritariamente *K. pneumoniae*, nas amostras de esgoto que pode estar relacionada principalmente à dois fatores: a) presença no trato gastrointestinal de mamíferos; e b) resistência ambiental, considerando a plasticidade de seu genoma que a faz possuir diferentes mecanismos de sobrevivência, seja devido à exposição aos antibióticos com ARGs, exposição aos metais e biocidas com os respectivos mecanismos

de tolerância e fatores de virulência, que permitem vantagens competitivas, captação de nutrientes, entre outros (DONG et al., 2022). Já nas amostras de água superficial houve predominância da espécie *Burkholderia cepacia*, reconhecida pela sua ampla dispersão ambiental e intrinsecamente resistentes à múltiplos antibióticos (SFEIR, 2018). Foi identificado também um isolado como *Empedobacter falsenii* (*Wautersiella falsenii*), uma bactéria de ocorrência ambiental que está emergindo como patógeno humano e que apresenta resistência intrínseca aos antibióticos carbapenêmicos pela presença do gene *bla_{EBR}* que codifica uma metallo- β -lactamase (MAAROUFI et al., 2022; OLOWO-OKERE et al., 2022).

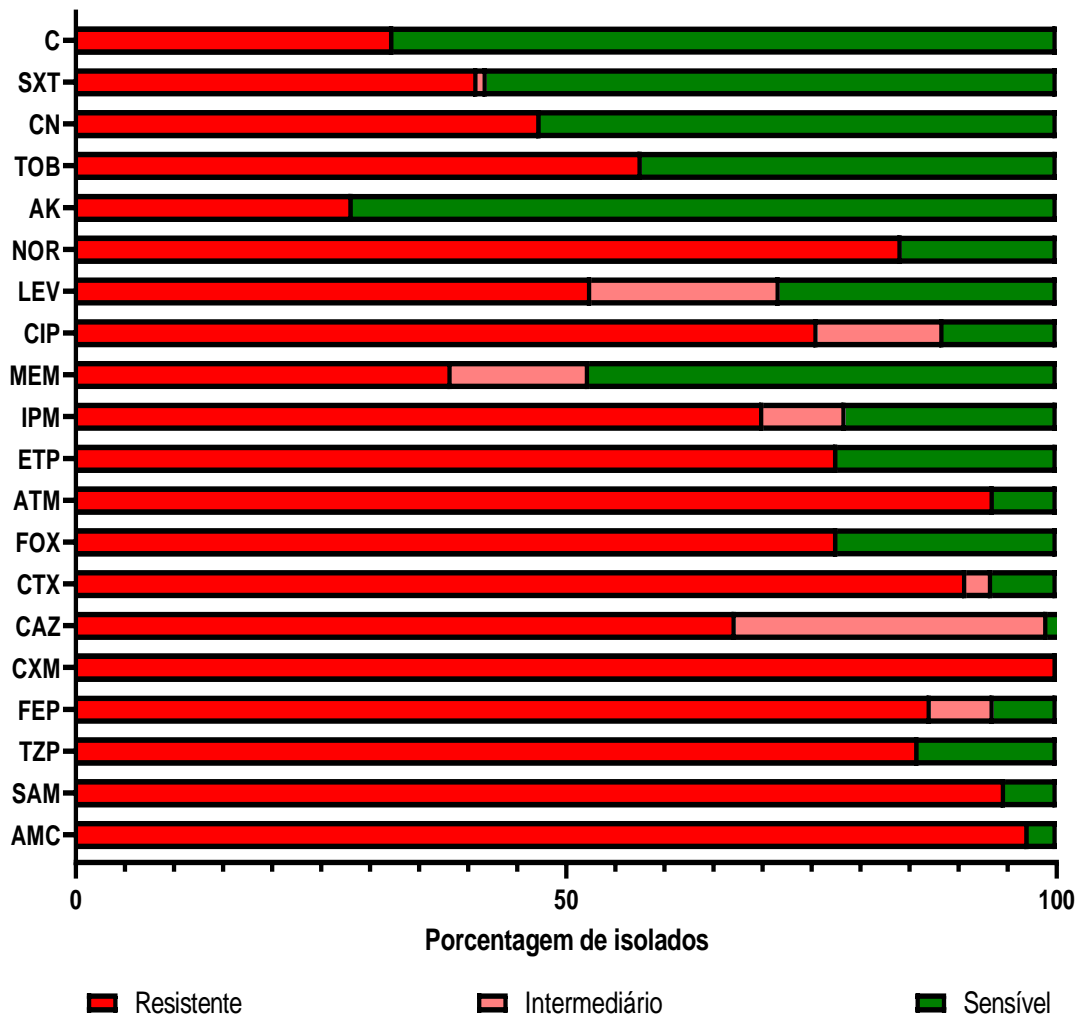
5.2.2.2. Susceptibilidade aos antibióticos e presença de genes de resistência aos antibióticos e de tolerância aos metais

Na Figura 8 estão apresentadas as porcentagens de isolados resistentes aos antibióticos. Leva-se em consideração que a resistência intrínseca de espécies como *B. cepacia* e/ou antibióticos não padronizados para testagem foram excluídos para cálculo das porcentagens, com a finalidade de obtenção de números fidedignos. Destaca-se que o termo “intermediário” é definido como “sensível, aumentando exposição”, ou seja, quando a bactéria foi designada como “intermediário” para determinado antibiótico significa que aumentando a exposição ao antibiótico, seja em concentração ou o em tempo, haverá sucesso na antibióticoterapia.

Altas porcentagens de resistência foram identificadas para os antibióticos amoxicilina-clavulanato (97%), ampicilina-sulbactam (95%) e piperacilina-tazobactam (86%). Às cefalosporinas, 87% foram resistentes ao cefepime, 100% a cefuroxima, 67% a ceftazidima, 91% a cefotaxima e 78% a cefoxitina. Ao monobactâmico aztreonam, 94% dos isolados apresentaram resistência. Aos carbapenêmicos, 78% dos isolados apresentaram resistência ao ertapenem, enquanto 70% e 38% ao imipenem e meropenem, respectivamente. Já do grupo de antibióticos não β -lactâmicos: A) Quinolonas: 76% do isolados eram resistentes a

ciprofloxacina, 53% a levofloxacina, 84% a norfloxacina; B) Aminoglicosídeos: 28% eram resistentes a amicacina, 58% a tobramicina, 47% a gentamicina; C) Inibidores de folato: 41% eram resistentes ao sulfametoxazol-trimetoprim; D) Fenicol: 33% eram resistentes ao cloranfenicol.

Figura 8. Porcentagem de isolados resistentes aos antibióticos, obtidos a partir de esgoto hospitalar, esgoto sanitário e água superficial.



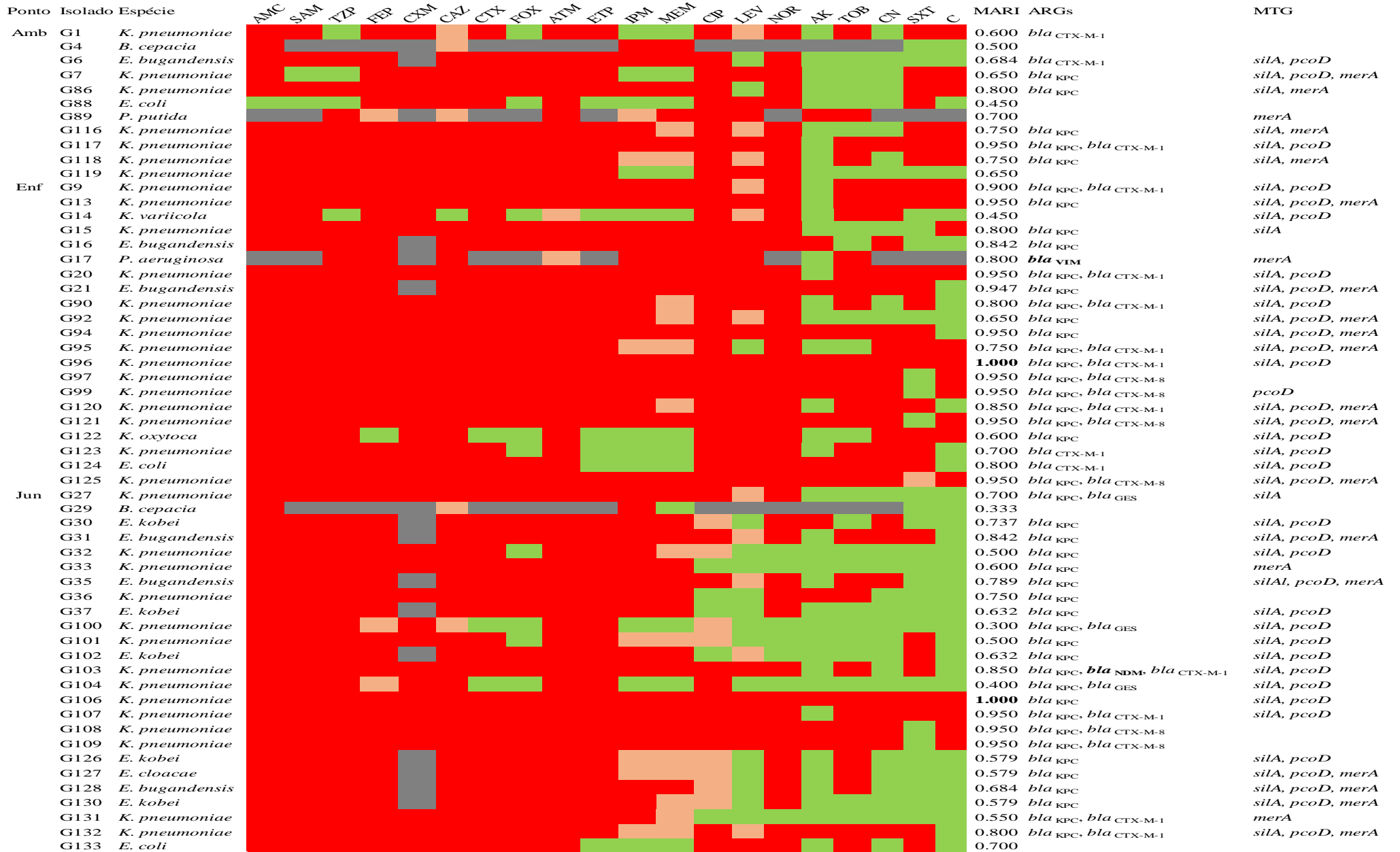
AMC, amoxicilina-clavulanato. SAM, ampicilina-sulbactam. TZP, piperacilina-tazobactam. FEP, cefepime. CXM, cefuroxima. CAZ, ceftazidima. CTX, cefotaxima. FOX, ceftoxitina. ATM, aztreonam. ETP, ertapenem. IPM, imipenem. MEM, meropenem. CIP, ciprofloxacina. LEV, levofloxacina. NOR, norfloxacina. AK, amicacina. TOB, tobramicina. CN, gentamicina. SXT, sulfametoxazol-trimetoprim. C, cloranfenicol.

De acordo com o relatório da Organização Mundial de Saúde sobre o consumo de antibióticos (*WHO Report on Surveillance of Antibiotic Consumption*), no Brasil, a

classe de antibióticos mais consumida é dos antibióticos β -lactâmicos (OMS, 2019), o que impacta diretamente na ampla disseminação da resistência a esses antibióticos, a qual pode ser verificada na Figura 8. No mesmo sentido, a classe de quinolonas também é amplamente empregada em rotina clínica o que propicia o desenvolvimento de resistência a esses antibióticos. Por outro lado, o consumo de antibióticos aminoglicosídeos é menor o que reflete em porcentagens de resistência inferiores com relação aos antibióticos β -lactâmicos e quinolonas.

Nas Figuras 9, 10 e 11 estão apresentadas, respectivamente, o perfil individual ($n = 107$) de resistência aos antibióticos, MAR Index, genes de resistência aos antibióticos (ARGs) e de tolerância aos metais (MTG) dos isolados do esgoto hospitalar, sanitário e água superficial. Destaca-se que o isolado de *Empedobacter falsenii* não foi incluído, pois não há pontos de corte padronizados para essa espécie.

Figura 9. Perfil de resistência aos antibióticos, MAR Index e genes de resistência aos antibióticos e de tolerância aos metais dos isolados hospitalar.



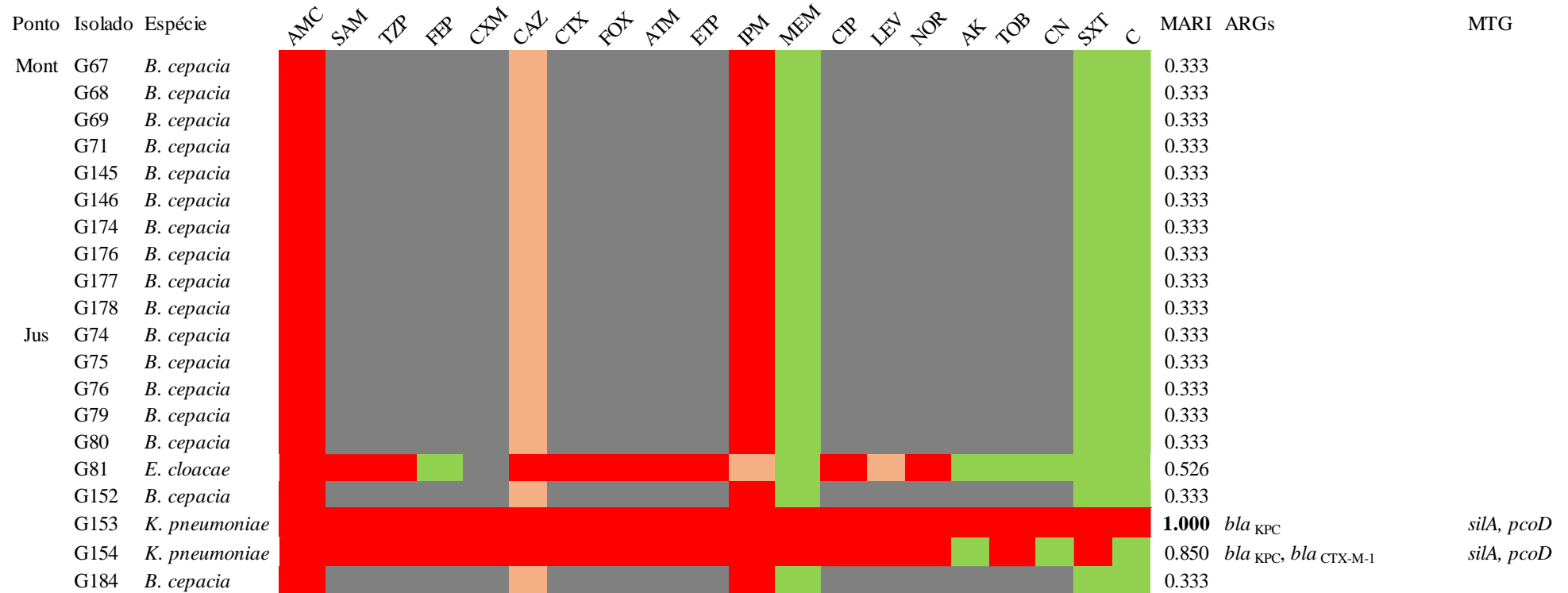
Nota: Amb, ambulatório. Enf, enfermaria. Jun, junção. Vermelho: Resistência. Rosa: Intermediário – sensível, aumentando exposição. Verde: Sensível. Cinza: Não testado.

Figura 10. Perfil de resistência aos antibióticos, MAR Index e genes de resistência aos antibióticos e de tolerância aos metais dos isolados do esgoto bruto e tratado.

Ponto	Isolado	Espécie	AMC	SAM	TZP	FEP	CXM	CAZ	CTX	FOX	ATM	ETP	IPM	MEM	CIP	LEV	NOR	AK	TOB	CN	SXT	C	MARI	ARGs	MTG	
Bruto	G42	<i>B. cepacia</i>	Red	Grey	Red	Red	Red	Rose	Red	Red	Red	Red	Red	Green	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Green	0.333			
	G44	<i>K. pneumoniae</i>	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	1.000	<i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{NDM} , <i>bla</i> _{CTX-M-1}		
	G45	<i>K. pneumoniae</i>	Red	Red	Red	Red	Red	Rose	Red	Red	Red	Red	Rose	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Green	0.600	<i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{CTX-M-8}		
	G46	<i>E. coli</i>	Green	Green	Green	Red	Red	Red	Red	Green	Red	Green	Green	Green	Green	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	0.500	<i>bla</i> _{CTX-M-1}	<i>merA</i>
	G47	<i>K. pneumoniae</i>	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Rose	Green	Rose	Green	Green	Green	Rose	Green	Green	Red	Red	Red	Red	Red	Red	0.200		<i>silA</i> , <i>pcoD</i>
	G49	<i>C. freundii</i>	Red	Red	Green	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	0.316		<i>silA</i> , <i>pcoD</i>
	G138	<i>K. pneumoniae</i>	Red	Red	Red	Rose	Red	Red	Red	Green	Rose	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Red	Red	Red	Red	Red	Red	0.300		<i>silA</i> , <i>pcoD</i>
	G139	<i>K. pneumoniae</i>	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	0.950		<i>silA</i> , <i>pcoD</i> , <i>merA</i>
	G141	<i>E. coli</i>	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Green	Red	Green	Green	Green	Green	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	0.550	<i>bla</i> _{CTX-M-1}	
	G158	<i>B. cepacia</i>	Red	Grey	Red	Red	Red	Rose	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	0.333		
	G159	<i>K. pneumoniae</i>	Red	Red	Red	Red	Red	Rose	Red	Green	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	0.350	<i>bla</i> _{KPC}	<i>merA</i>
	G160	<i>E. bugandensis</i>	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	0.684	<i>bla</i> _{CTX-M-1}	<i>silA</i> , <i>pcoD</i>
	G161	<i>K. pneumoniae</i>	Red	Red	Green	Red	Red	Red	Red	Green	Red	Rose	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	0.350		<i>silA</i> , <i>pcoD</i>
	G162	<i>K. pneumoniae</i>	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	1.000	<i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{CTX-M-8}	<i>silA</i> , <i>pcoD</i> , <i>merA</i>
G163	<i>K. pneumoniae</i>	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	0.950	<i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{CTX-M-8}	<i>pcoD</i>	
Tratado	G56	<i>B. cepacia</i>	Red	Grey	Red	Red	Red	Rose	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	0.333			
	G57	<i>B. cepacia</i>	Red	Grey	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	0.500			
	G58	<i>B. cepacia</i>	Red	Grey	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	0.333		<i>pcoD</i>	
	G62	<i>B. cepacia</i>	Red	Grey	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	0.333			
	G63	<i>B. cepacia</i>	Red	Grey	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	0.333			
	G64	<i>B. cepacia</i>	Red	Grey	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	0.333			
	G66	<i>E. bugandensis</i>	Red	Red	Green	Rose	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Rose	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	0.421		<i>silA</i> , <i>pcoD</i> , <i>merA</i>	
	G142	<i>B. cepacia</i>	Red	Grey	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	0.333			
	G143	<i>B. cepacia</i>	Red	Grey	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	0.333			
	G144	<i>E. coli</i>	Red	Red	Green	Red	Red	Red	Red	Green	Red	Green	Green	Green	Green	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	0.650	<i>bla</i> _{CTX-M-1}		
	G167	<i>K. pneumoniae</i>	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	0.800	<i>bla</i> _{CTX-M-1}	<i>silA</i> , <i>pcoD</i> , <i>merA</i>	
	G168	<i>K. variicola</i>	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Green	Red	Red	Red	Rose	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	0.800	<i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{CTX-M-1}	<i>silA</i> , <i>pcoD</i> , <i>merA</i>	
	G169	<i>K. pneumoniae</i>	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	0.850	<i>bla</i> _{KPC}	<i>silA</i> , <i>pcoD</i> , <i>merA</i>	
G170	<i>E. coli</i>	Red	Red	Green	Red	Red	Red	Red	Green	Red	Green	Green	Green	Green	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	0.600	<i>bla</i> _{CTX-M-1}	<i>silA</i> , <i>pcoD</i>		
G173	<i>K. pneumoniae</i>	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	1.000	<i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{CTX-M-8}	<i>silA</i> , <i>pcoD</i>		

Nota: Vermelho: Resistência. Rosa: Intermediário – sensível, aumentando exposição. Verde: Sensível. Cinza: Não testado.

Figura 11. Perfil de resistência aos antibióticos, MAR Index e genes de resistência aos antibióticos e de tolerância aos metais dos isolados do Córrego Ribeirão Preto.



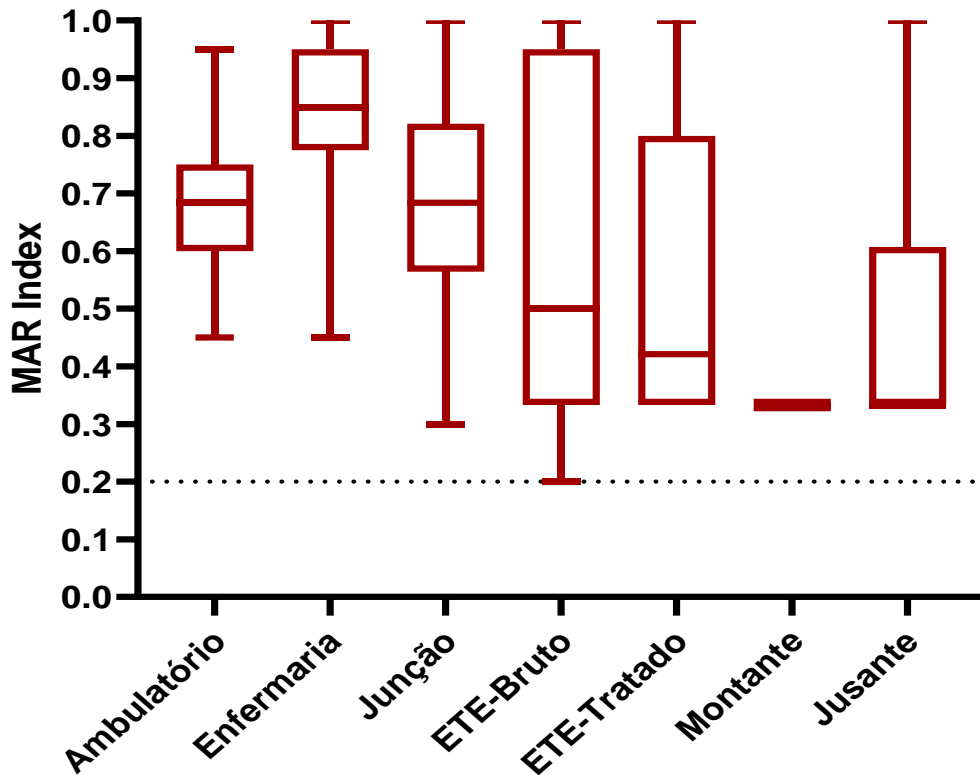
Nota: Mont, montante. Jus, jusante. Vermelho: Resistência. Rosa: Intermediário – sensível, aumentando exposição. Verde: Sensível. Cinza: Não testado.

Com relação ao perfil fenotípico de resistência dos isolados, é possível verificar através da Figura 9, que os isolados obtidos a partir das amostras do hospital são principalmente resistentes aos antibióticos β -lactâmicos, enquanto os isolados do esgoto sanitário e água superficial apresentam susceptibilidade variada aos antibióticos. Embora o fenótipo de resistência entre os isolados do esgoto sanitário e água superficial seja variado, destaca-se que alguns isolados apresentaram resistência à antibióticos de amplo espectro, como cefepime, imipenem e meropenem, que são considerados antibióticos importantes na rotina clínica para tratamento de bactérias resistentes à múltiplos antibióticos.

A presença de bactérias com esse espectro de resistência fora do âmbito hospitalar, e principalmente no esgoto tratado e água superficial, revela a necessidade de medidas de controle de bactérias multirresistentes em um contexto multidisciplinar (tecnologias adicionais de tratamento de esgoto). Em termos de saúde pública, bactérias com esse fenótipo de resistência representam riscos à saúde das pessoas que podem estar expostas à água superficial, seja através do consumo da água ou ingestão de alimentos, bem como atividade recreacional, considerando que o Córrego Ribeirão Preto é utilizado para estas finalidades inadequadamente. Em questões ambientais, essas bactérias podem disseminar seus elementos genéticos de resistência através da transferência horizontal de genes e infectar peixes e outros animais, que podem entrar em contato com seres humanos.

A partir do fenótipo de resistência, foi possível estabelecer o índice de resistência à múltiplos antibióticos (MAR Index), índice que traduz quantitativamente a resistência aos antibióticos e revela fontes de alto riscos (MIR et al., 2022; KRUMPERMAN, 1983). Os dados estão apresentados na Figura 12.

Figura 12. Valores mínimos, máximos e média do MAR Index obtidos a partir do perfil fenotípico de resistência aos antibióticos dos isolados de esgoto hospitalar, sanitário e água superficial.



É possível verificar que as médias do MAR Index dos isolados do esgoto hospitalar foram superiores às médias dos isolados do esgoto sanitário e água superficial, como esperado. Do esgoto hospitalar, dois isolados (G96 e G106) destacaram-se pela resistência aos 20 antibióticos testados (MAR Index = 1,000). Embora as médias do MAR Index dos outros pontos tenha sido inferiores às medias do hospital, isolados como G44 e G162 do esgoto sanitário bruto, G173 do esgoto sanitário tratado e G153 do ponto à jusante também apresentaram resistência aos 20 antibióticos.

Valores de MAR Index acima de 0,2 indicam fontes de alto risco e, nesse sentido, verifica-se que todos os pontos de amostragem estão acima desse ponto de corte. Entre os pontos de amostragem do hospital, o esgoto da enfermaria é qual representa maior risco, considerando que, em média, os isolados apresentaram MAR Index de 0,85, ou seja, resistência

a 17 antibióticos. Embora a média do MAR Index dos isolados do efluente tratado seja inferior à média dos isolados do efluente bruto, esse é um dado que não pode ser negligenciado considerando o perfil de resistência dos isolados à antibióticos clinicamente importantes e até mesmo como o isolado supracitado, G173, resistente a todos os antibióticos testados. Com relação aos valores de MAR Index dos isolados a partir da água superficial do Córrego Ribeirão Preto, verificou-se um aumento no valor médio do índice à jusante, que pode ser em função do lançamento de bactérias multirresistentes no corpo hídrico através do efluente tratado.

A resistência à múltiplos antibióticos, e mais especificamente à antibióticos de múltiplas classes, é um grave problema de saúde pública em termos de limitadas opções terapêuticas para tratamento de bactérias multirresistentes. Embora haja alto percentual de resistência, os antibióticos β -lactâmicos continuam sendo amplamente utilizados devido sua potencialidade bactericida, baixa toxicidade e oportunidade de associação com inibidores de β -lactamases (ex.: ácido clavulânico, sulbactam, tazobactam, avibactam, vaborbactam, relebactam). Atualmente têm se investido nessas associações, onde a combinação da ceftazidima-avibactam, imipenem-relebactam e meropenem-vaborbactam têm se mostrado eficientes contra enterobactérias produtoras de ESBL, KPC e AmpC (YAHAV et al., 2021). No mesmo sentido, a polimixina B representa o antibiótico de último recurso, no entanto, a disseminação do gene *mcr* (*mobile colistin resistance*) já compromete sua eficácia (HUSSEIN et al., 2021). Portanto, é necessário investimentos para o desenvolvimento e otimização das moléculas de antibióticos considerando a dispersão global de determinantes de resistência aos antibióticos e também medidas para conter os avanços da resistência para esses novos antibióticos que ainda apresentam sucesso na antibióticoterapia.

Com relação à detecção de genética de determinantes de resistência/tolerância, no total 14 genes de resistência aos antibióticos, que codificam enzimas ESBL e carbapenemases, e 3 de tolerância aos metais, que codificam mecanismos de tolerância à prata, cobre e mercúrio,

foram investigados. Entre o total de isolados o gene codificador de carbapenemase *bla_{KPC}* foi detectado em 51% dos isolados ($n = 55$), *bla_{CTX-M-1}* em 23% ($n = 25$), *bla_{CTX-M-8}* em 10% ($n = 11$), *bla_{GES}* em 2,8% ($n = 3$), *bla_{NDM}* em 1,9% ($n = 2$) e *bla_{VIM}* em 0,9% ($n = 1$).

O gene *bla_{KPC}* foi encontrado na maioria dos isolados do esgoto hospitalar e em isolados dos outros pontos de amostragem. Esse gene é endêmico no Brasil, principalmente em bactérias da espécie *K. pneumoniae*, e tem alta significância clínica, uma vez que esse gene codifica a enzima KPC que é capaz de hidrolisar as penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos (aztreonam) e os carbapenêmicos (SAMPAIO; GALES, 2016). O gene *bla_{KPC}* frequentemente é carregado em plasmídeos onde determinantes de resistência a antibióticos de outras classes também podem ser encontrados, levando à um fenótipo de resistência à múltiplos antibióticos (PORRECA; SULLIVAN; GALLAGHER, 2018), o que corrobora com os resultados encontrados.

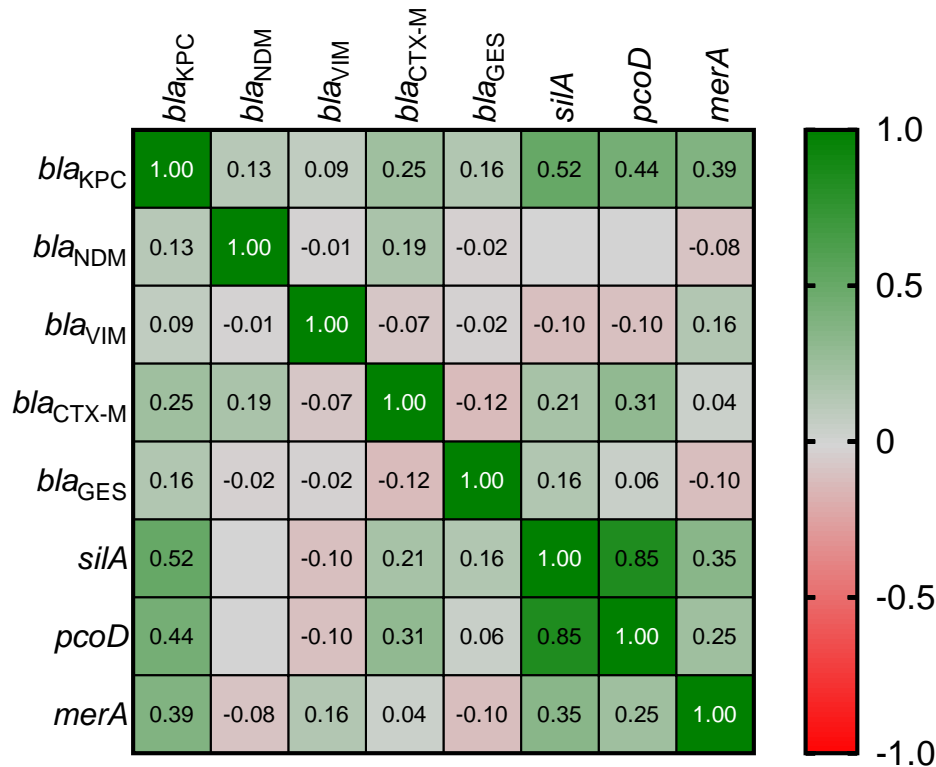
O gene *bla_{CTX-M}* foi o segundo ARG de maior ocorrência e codifica enzimas CTX-M do tipo ESBL capazes de hidrolisar penicilinas, cefalosporinas de amplo espectro e o aztreonam. Essas enzimas são divididas em 5 grupos (CTX-M-1, -2, -8, -9 e -25), codificadas por seus respectivos genes. No presente estudo, foram detectados os genes *bla_{CTX-M-1}*, que codifica enzimas do grupo CTX-M-1, e *bla_{CTX-M-8}*, que codifica enzimas do grupo CTX-M-8. As enzimas CTX-M são as mais frequentes entre as enzimas ESBL no Brasil e, de acordo, com Rocha, Pinto e Barbosa (2016) as enzimas CTX-M dos grupos 1 e 8 são as mais frequentes no Estado de São Paulo, juntamente com as enzimas do grupo 2. Assim como o gene *bla_{KPC}*, os genes *bla_{CTX-M}* frequentemente são carregados por plasmídeos, juntamente com determinantes de resistência a outros antibióticos (LAHLAOU; KHALIFA; MOUSSA, 2014), que acarreta em um fenótipo de multirresistência, como verificado nos isolados carreadoras de *bla_{CTX-M}*.

Destaca-se também a ocorrência do gene *bla_{GES}*, um gene de resistência aos antibióticos β -lactâmicos pouco frequente que pode codificar enzimas com espectro de ESBL, mas também

de carbapenemase, devido às mutações e trocas nas sequências de nucleotídeos e aminoácidos. A detecção dos genes *bla_{NDM}* e *bla_{VIM}*, ambas metallo-β-lactamases, também são de ampla significância considerando o perfil de hidrólise de antibióticos carbapenêmicos das enzimas codificadas. O gene *bla_{NDM}* teve sua origem na Índia, em New Delhi, e além do seu espectro de conferir resistência, esse gene chama atenção pela facilidade de mobilização e consequente dispersão entre as bactérias (CAMARGO, 2022). No Brasil, o gene *bla_{NDM}* foi detectado pela primeira vez em *Providencia rettgeri*, em 2013, e um estudo recente realizado em um hospital de Porto Alegre – RS verificou que a taxa de isolados positivos para o gene *bla_{NDM}* passou de 4,2% em 2015 para 24% em 2020, evidenciado seu alto potencial de disseminação (WINK et al., 2021). O gene *bla_{VIM}* foi identificado pela primeira vez em *Pseudomonas aeruginosa*, em Verona – Itália, em 1997, associado a integron de classe 1 cromossomal, mas teve sua dispersão global sendo encontrada em patógenos clinicamente importantes como *Acinetobacter* spp. e membros da família de enterobactérias, mas principalmente em isolados de *Pseudomonas aeruginosa* (ZHAO; HU, 2011). A detecção desses genes, tanto no esgoto hospitalar (*bla_{NDM}* e *bla_{VIM}*), quanto no esgoto sanitário bruto (*bla_{NDM}*), sugere a disseminação desses genes em contextos fora do âmbito intra-hospitalar, evidenciando a necessidade de estudos para averiguação epidemiológica da dispersão desses genes na região e de medidas de controle, considerando que são pouco frequentes na região de Ribeirão Preto – SP.

Com relação aos genes de tolerância aos metais, gene de tolerância a prata foi detectado em 52% dos isolados ($n = 56$), ao cobre em 50% ($n = 54\%$) e ao mercúrio em 28% ($n = 30$). Foi verificado que os genes de tolerância a prata *silA* e de tolerância ao cobre *pcoD* frequentemente eram detectados juntos e através da Correlação Linear de Pearson verificou-se uma forte correlação entre esses genes ($r = 0,85$, IC [0,7909 - 0,8969], $p < 0,0001$), como pode ser observado na Figura 13.

Figura 13. Matriz de correlação entre os genes de resistência aos antibióticos e de tolerância aos antibióticos, detectados nos isolados de esgoto hospitalar, sanitário e água superficial.



A forte correlação verificada entre os genes de tolerância à prata e ao cobre pode ser justificada molecularmente pela posição do operon *sil* e do operon *pco* serem encontrados adjacentes, sendo essa região conhecida como Ilha de Resistência à Prata e de Homeostase ao Cobre (CHASRI, *Copper Homeostasis and Silver Resistance Island*) (STAEHLIN et al., 2016). A prata tem sido amplamente utilizada em dispositivos médicos em hospitais, como por exemplo em cateteres e válvulas cardíacas para prevenção de biofilme, cremes tópicos para tratamento de queimaduras e em solução oftalmológica (MIJNENDONCKX et al., 2013). Assim como a prata, o cobre tem sido vastamente utilizado em serviços médicos especialmente para revestimento de superfícies para prevenção de biofilme e em absorventes impregnados para evitar infecções pós-parto em gestantes (ARENSEN et al., 2019). O cobre também é utilizado na agricultura, como controlador de pragas e na suplementação de animais (HOBMAN; CROSSMAN, 2015).

Já o mercúrio tem seu uso histórico contra infecções e na agricultura e estima-se que o operon *mer* seja ancestral, que o faz estar amplamente difundido nas comunidades microbianas, considerando que é essencial para a homeostasia e sobrevivência da bactéria (HOBMAN; CROSSMAN, 2015). A exposição aos diferentes metais faz com que as bactérias desenvolvam diferentes mecanismos de tolerância, seja bombas de efluxos ou redutases. Os metais, assim como outros compostos, são considerados como promissores para o tratamento antimicrobiano devido à ampla dispersão de genes de resistência aos antibióticos que levam à falha terapêutica. Nesse sentido, os metais são considerados como potenciais agentes antibacterianos, no entanto, sua eficácia pode estar comprometida com a também dispersão de genes de tolerância aos metais. Assim, pesquisas que atuem na testagem dos metais em suas diferentes formas contra bactérias resistentes é necessária tendo em vista a urgência de novos compostos com atividade antimicrobiana para tratamento de bactérias multirresistentes.

5.3. Desafios da propagação de antibióticos e bactéria multirresistentes no contexto da Saúde Única

O presente estudo avaliou a ocorrência de antibióticos e de bactérias multirresistentes, bem como de ARGs e de MTG, em esgoto e água superficial, estando alinhado com o segundo objetivo estratégico “*Fortalecer os conhecimentos e a base científica por meio da vigilância e pesquisa*”, do Plano de Ação Nacional de Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos no Âmbito da Saúde Única (PAN-BR), do Ministério da Saúde (BRASIL, 2018). A ampla dispersão de bactérias expressando fenótipo de resistência à múltiplos antibióticos e de seus genes se revela com uma emergência sanitária, considerando os números alarmantes de óbitos anuais (>1,2 milhões de pessoas, MURRAY et al., 2022). As estimativas para 2050 são de mais de 10 milhões de óbitos/ano (1 morte a cada 3 segundos) e o cenário de escassez de novos antimicrobianos impulsiona as estimativas. Em comparação com os vírus, o

potencial de transmissão das bactérias é limitado afortunadamente, pois a chamada “*pandemia silenciosa*” impactaria na saúde global de forma sem precedentes (MENDELSON; SHARLAND; MPUNDU, 2022).

A legislação vigente assegura a destinação do esgoto hospitalar sem tratamento ao sistema municipal de coleta e tratamento (BRASIL, 2002), no entanto, foi verificado a ocorrência de bactérias multirresistentes no efluente sanitário bruto e tratado, bem como no rio receptor, o que nos revela uma transmissão silenciosa e negligenciada entre as matrizes aquáticas. Indo de encontro às propostas do PAN-BR e da abordagem de Saúde Única, que visa o enfrentamento da AMR de maneira multisetorial e proposição de medidas mitigadoras, é necessária a contenção desses microrganismos nos efluentes dos hospitais, como por exemplo pelo estabelecimento de tratamento desses efluentes antes do lançamento na rede coletora, por processos que garantam a remoção desses microrganismos e dos antibióticos, pois favorecem a propagação de bactérias resistentes.

Ainda nesse sentido, a adição de um tratamento terciário eficaz para tratamento do esgoto municipal reduziria a carga desses contaminantes lançadas nos corpos hídricos, como por exemplo desinfecção por luz UV, ozônio, filtração e processos oxidativos avançados (HERRAIZ-CARBONÉ et al., 2021). O emprego dessas tecnologias de tratamento garantiria não somente a redução da resistência aos antibióticos no ambiente, mas também de outros contaminantes emergentes como os microplásticos. Estudos recentes apontam os microplásticos como vetores de bactérias resistentes ao ambiente e, portanto, processos complementares de tratamento reduziria não somente a carga microbiana, mas também promoveria remoção de seus carreadores (ZAGUI et al., 2022).

No Brasil, a cobertura do saneamento ambiental é limitada, especialmente em termos de coleta e tratamento de esgoto sanitário. Recentes dados do Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento (SNIS), do ano de 2021, mostra que R\$7,35 bilhões foram investidos em

sistema de esgoto, que 55,8% da população brasileira é atendida com esgotamento sanitário e 51,2% do esgoto gerado é tratado (BRASIL, 2021), ou seja, quase metade de todo esgoto gerado no Brasil é lançado no meio ambiente sem tratamento. Embora os investimentos financeiros têm sido expressivos, nota-se uma grande deficiência de cobertura sanitária, especialmente nas regiões norte e nordeste. O papel das ETEs no tratamento dos efluentes sanitários vai além da proteção ambiental, mas também na proteção e promoção da saúde pública, principalmente na eliminação de agentes infecciosos como as bactérias multirresistentes aos antibióticos. Abordagens multissetoriais com foco no saneamento também vão em direção dos cumprimentos dos Objetivos do Desenvolvimento Sustentável (ODS), estipulados pela Organização das Nações Unidas, que prezam pelo progresso do saneamento em países em desenvolvimento (6º Objetivo).

De fato, o controle da resistência aos antibióticos é um persistente desafio a ser superado e que requer enfrentamentos que não devem ser restritos ao ambiente hospitalar. Investimentos em programas de vigilância epidemiológica, educação em saúde, desenvolvimento de novos antibióticos, expansão do saneamento e redução do consumo de antibióticos são estratégias que podem contribuir para o combate contra a ameaça do século.

Conclusões

6. CONCLUSÕES

- Os antibióticos β -lactâmicos, amoxicilina e ampicilina, foram detectados amplamente nos pontos de amostragem, em concentrações superiores à ciprofloxacina, sulfametoxazol e tetraciclina.
- As altas concentrações de amoxicilina e ampicilina encontradas nos efluentes podem estar associada ao seu amplo uso comunitário.
- Bactérias do grupo coliformes utilizadas como indicadoras foram detectadas em altas concentrações nas amostras avaliadas e permitiu verificar decaimento nas concentrações no efluente tratado após tratamento secundário, embora sem significância estatística.
- Bactérias fenotipicamente produtoras de ESBL (BFP-ESBL) e de carbapenemases (BFP-C) apresentaram-se em altas concentrações nas amostras avaliadas e não houve porcentual de remoção desses microrganismos após o tratamento de esgoto.
- As concentrações de coliformes, de BFP-ESBL e de BFP-C no ponto à jusante da ETE aumentaram em comparação com as concentrações à montante, o que sugere que o lançamento do efluente tratado pode estar contribuindo para aumento dessas bactérias no Córrego Ribeirão Preto.
- *K. pneumoniae* foi a espécie de maior ocorrência entre os isolados selecionados para estudos fenotípicos e genotípicos.

- A partir dos resultados do teste de susceptibilidade aos antibióticos, verificou-se altas porcentagens de resistência aos antibióticos β -lactâmicos.
- Isolados do esgoto hospitalar apresentaram amplo fenótipo de resistência com relação aos isolados do efluente sanitário e água superficial.
- O MAR Index indicou que todos os pontos de amostragem podem ser considerados como fontes de alto risco para resistência bacteriana (MARI > 0,2).
- Os isolados do esgoto hospitalar apresentou MAR Index superior aos isolados dos demais pontos de amostragem, como esperado.
- MAR Index médio dos isolados da enfermaria foi de 0,85, que representa resistência média a 17 antibióticos.
- O gene codificador de carbapenemase *bla_{KPC}* foi o de maior prevalência, sendo encontrado em 51% dos isolados ($n = 55$).
- A detecção dos genes *bla_{NDM}* e *bla_{VIM}* alerta a necessidade de vigilância e controle desses genes, considerando a baixa frequência na região.
- O gene *silA* de tolerância à prata foi o mais detectado entre os genes de tolerância à metais, seguido do gene *pcoD* de tolerância ao cobre.
- Correlação forte foi verificada na coexistência dos genes *silA* e *pcoD*.

Referências

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, E. P.; CHAIN, E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. **Nature**, v. 146, p. 837-837, 1940.
- ALANIS, A. J. Resistance to antibiotics: Are we in the post-antibiotic era? **Archives of Medical Research**, v. 36, p. 697-705, 2005.
- ALBA, C.; BLANCO, A.; ALARCÓN, T. Antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 30, n. 5, p. 489-497, 2017.
- ALÓS, J. I. Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 33, n. 10, p. 692-699, 2015.
- AMBLER, R. P. The structure of beta-lactamases. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, v. 289, n. 1036, p. 321-331, 1980.
- ANDRADE, L. N.; SIQUEIRA, T. E. S.; MARTINEZ, R.; DARINI, A. L. C. Multidrug-resistant CTX-M-(15, 9, 2)- and KPC-2-producing *Enterobacter hormaechei* and *Enterobacter absuriae* isolates possessed a set of acquired heavy metal tolerance genes including a chromosomal *sil* operon (for acquired silver resistance). **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 539, 2018.
- ANTUNES, N. T.; FISHER, J. F. Acquired Class D β -lactamases. **Antibiotics**, v. 3, n. 3, p. 398-434, 2014.
- APHA/AWWA/WEF. American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation. **Standards methods for the examination of water and wastewater**. 23ed. Washington DC: APHA Press. 2017.
- ARENDSSEN, L. P.; THAKAR, R.; SULTAN, A. H. The use of copper as an antimicrobial agent in health care, including obstetrics and gynecology. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 32, n. 4, p. e00125-18, 2019.
- AYDIN, S.; AYDIN, M. E.; ULVI, A.; KILIC, H. Antibiotics in hospital effluents: occurrence, contribution to urban wastewater, removal in a wastewater treatment plant, and environmental risk assessment. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, p. 544-558, 2019.
- BARKAY, T.; KRITTEE, K.; BOYD, E.; GEESEY, G. A thermophilic bacterial origin and subsequent constraints by redox, light and salinity on the evolution of the microbial mercuric reductase. **Environmental Microbiology**, v. 12, p. 2904–2917, 2010.
- BARTLEY, P. S.; DOMITROVIC, T. N.; MORETTO, V. T.; SANTOS, C. S.; PONCE-TERASHIMA, R.; REIS, M. G.; et al. Antibiotic resistance in *Enterobacteriaceae* from surface waters in urban Brazil highlights the risks of poor sanitation. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 100, n. 6, p. 1369-1377, 2019.
- 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.

BENGTSSON-PALME, J.; KRISTIANSOON, E.; LARSSON, D. G. J. Environmental factors influencing the development and spread of antibiotic resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 42, p. 68-80, 2018.

BERENDONK, T. U.; MANAIA, C. M.; MERLIN, C.; FATTA-KASSINOS, D.; CYTRYN, E.; WALSH, F.; et al. Tackling antibiotic resistance: the environmental framework. **Nature Reviews**, v. 13, p. 310-317, 2015.

BEVAN, E. R.; JONES, A. M.; HAWKEY, P. M. Global epidemiology of CTX-M β -lactamases: temporal and geographical shifts in genotype. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 72, p. 2145-2155, 2017.

BLAIR, J. M. A.; WEBBER, M.; BAYLAY, A. J.; OGBOLU, D. O.; PIDDOCK, L. J. V. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 42-51, 2015.

BLUMER, J. F. Meropenem: evaluation of a new generation carbapenem. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 8, p. 73-92, 1997.

BOGAERTS, P.; CASTRO, R.; MENDONÇA, R.; HUANG, T. D.; GLUPCZYNSKI, Y. Validation of carbapenemase and extended-spectrum β -lactamase multiplex endpoint PCR assays according to ISO 15189. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, p. 1576-1582, 2013.

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 challenges. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 7, n. 1, a025239, 2016.

BOYD, S. E.; LIVERMORE, D. M.; HOOPER, D. C.; HOPE, W. W. Metallo- β -lactamases: structure, function, epidemiology, treatment options, and the development pipeline. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 64, n. 10, p. e00397-20, 2020.

BRAGG, P. D.; RAINNIE, D. J. The effect of silver ions on the respiratory chain of *Escherichia coli*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 20, p. 883-889, 1974.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 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: 23 de fevereiro de 2021. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2002/rdc0050_21_02_2002.html#:~:text=RESOLU%C3%87%C3%83O%2DRDC%20N%C2%BA%2050%2C%20DE,que%20lhe%20confere%20o%20art>.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução CONAMA Nº 430, 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: 04 de dezembro de 2022. Disponível em: <<https://cetesb.sp.gov.br/aguas-interiores/wp->

[content/uploads/sites/12/2018/01/RESOLU%C3%87%C3%83O-No-430-DE-13-DE-MAIO-DE-2011.pdf](https://www.gov.br/mdr/pt-br/assuntos/saneamento/snis/painel/es)>.

BRASIL. Ministério da Integração e do Desenvolvimento Regional. **Sistema Nacional de Informação sobre Saneamento**. Acesso em: 18 de fevereiro de 2023. Disponível em: <<https://www.gov.br/mdr/pt-br/assuntos/saneamento/snis/painel/es>>.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Plano de ação nacional de prevenção e controle da resistência aos antimicrobianos no âmbito da Saúde Única 2018-2022**. Brasília: Ministério da Saúde, 2018.

BrCAST, *Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*. **Tabela de pontos de corte para interpretação de CIMs e diâmetros de halos**. Disponível em: <<http://brcast.org.br/documentos/>>.

BUSH, K. Past and present perspectives on β -lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, n. 10, p. e01076-18, 2018.

BUSH, K.; BRADFORD, P. A. β -lactams and β -lactamases inhibitors: An overview. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 6, p. a025247, 2016.

BUSH, K.; BRADFORD, P. A. Epidemiology of β -lactamase-producing pathogens. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 33, n. 2, p. e00047-19, 2020.

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.

BUSH, N. G.; DIEZ-SANTOS, I.; ABBOTT, L. R.; MAXWELL, A. Quinolones: mechanisms, lethality and their contributions to antibiotic resistance. **Molecules**, v. 25, p. 5662, 2020.

CACACE, D.; FATTA-KASSINOS, D.; MANAIA, C. M.; CYTRYN, E.; KREUZINGER, N.; RIZZO, L.; et al. Antibiotic resistance genes in treated wastewater and in the receiving water bodies: A pan-European survey of urban settings. **Water Research**, v. 162, p. 320-330, 2019.

CAMARGO, C. H. Current status of NDM-producing *Enterobacterales* in Brazil: a narrative review. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 53-1339-1344, 2022.

CAMPANELLA, T. A.; GALLAGHER, J. C. A clinical review and critical evaluation of imipenem-relebactam: Evidence to date. **Infection and Drug Resistance**, v. 13, p. 4297-4308, 2020.

CANTÓN, R.; GONZÁLEZ-ALBA, J. M.; GALÁN, J. C. CTX-M enzymes: origin and diffusion. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, p. 110, 2012.

CARNEIRO, M. S. et al. Evaluation of filter paper as a means to transport inactivated bacteria for identification using the MALDI-TOF MS system. **Journal of Microbiological Methods**, v. 171, n. 105863, 2020.

CARRARO, E.; BONETTA, S.; BERTINO, C.; LORENZI, E.; BONETTA, S.; GILLI, G. Hospital effluents management: Chemical, physical, microbiological risks and legislation in different countries. **Journal of Environmental Management**, v. 168, p. 185-199, 2016.

CETESB. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. **Norma Técnica L5.202 Coliformes totais, coliformes termotolerantes e *Escherichia coli* – determinação pela técnica de tubos múltiplos**. 5ed. 2018.

CHEESEMAN, S.; CHISTOFFERSON, A. J.; KARIUKI, R.; COZZOLINO, D.; DAENEKE, T.; CRAWFORD, R. J.; et al. Antimicrobial metal nanomaterials: From passive to stimuli-activated applications. **Advanced Science**, v. 7, p. 1902913, 2020.

CONTE, D.; PALMEIRO, J. K.; BAVAROSKI, A. A.; RODRIGUES, L. S.; CARDOZO, D.; TOMAZ, A. P.; et al. Antimicrobial resistance in *Aeromonas* species isolated from aquatic environments in Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, 2020. Ahead of print.

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.

CONSTANTINO, V. M.; FREGONESI, B. M.; TONANI, K. A. A.; ZAGUI, G. S.; TONINATO, A. P. C.; NONOSE, E. R. S.; et al. Estoque e descarte de medicamentos no domicílio: uma revisão sistemática. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 25, n. 2, p. 585-594, 2020.

CUZON, G.; NAAS, T.; NORDMANN, P. Functional characterization of Tn4401, a Tn3-based transposon involved in *bla*_{KPC} gene mobilization. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 11, p. 5370-5373, 2011.

DADGOSTAR, P. Antimicrobial resistance: implications and costs. **Infection and Drug Resistance**, v. 12, p. 3903-3910, 2019.

D’COSTA, V.; KING, C. E.; KALAN, L.; MORAR, M.; SUNG, W. W. L.; SCHWARZ, C.; et al. Antibiotic resistance is ancient. **Nature**, v. 477, p. 457-461, 2011.

DOI, Y.; IOVLEVA, A.; BONOMO, R. A. The ecology of extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) in the developed world. **Journal of Travel Medicine**, v. 24, p. S44-S51, 2017.

DONG, N.; YANG, X.; CHAN, E. W. C.; ZHANG, R.; CHEN, S. *Klebsiella* species: Taxonomy, hypervirulence and multidrug resistance. **eBioMedicine**, v. 79, p. 103998, 2022.

DURAND, G. A.; RAOULT, D.; DUBOURG, G. Antibiotic discovery: history, methods and perspectives. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 53, p. 371-382, 2019.

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.

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

EYLER, R. F.; SHVETS, K. Clinical pharmacology of antibiotics. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 14, n.7, p. 1080-1090, 2019.

FELIS, E.; KALKA, J.; SOCHACKI, A.; KOWALSKA, K.; BAJKACZ, S.; HARNISZ, M.; et al. Antimicrobial pharmaceuticals in the aquatic environment - occurrence and environmental implications. **European Journal of Pharmacology**, v. 866, p. 172813, 2020.

FEKIH, I. B.; ZHANG, C.; LI, Y. P.; ZHAO, Y.; ALWATHNANI, H. A.; SAQUIB, Q.; et al. Distribution of arsenic resistance genes in prokaryotes. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 2473, 2018.

FLEMING, A. On the antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. **The British Journal of Experimental Pathology**, v. 10, n. 3, p. 226-236, 1929.

GARCÍA-ALJARO, C.; BLANCH, A. R.; CAMPOS, C.; JOFRE, J.; LUCENA, F. Pathogens, faecal indicators and human-specific microbial source-tracking markers in sewage. **Journal of Applied Microbiology**, v.126, p. 701-717, 2019.

GIEBUŁTOWICZ, J.; TYSKI, S.; WOLINOWSKA, R.; GRZYBOWSKA, W.; ZAREBA, T.; DROBNIĘWSKA, A.; et al. Occurrence of antimicrobial agents, drug-resistant bacteria, and genes in the sewage-impacted Vistula River (Poland). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, p. 5788-5807, 2018.

GRASS, G.; RENSING, C.; SOLIOZ, M. Metallic copper as an antimicrobial surface. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 5, p. 1541–1547, 2011.

GROS, M.; RODRÍGUEZ-MOZAZ, S.; BARCELÓ, D. Rapid analyses of multiclass antibiotic residues and some of their metabolites in hospital, urban wastewater and river water by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to quadrupole-linear ion trap tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1292, p. 173-188, 2013.

GUERRA, P.; KIM, M.; SHAH, A.; ALAEE, M.; SMYTH, S. A. Occurrence and fate of antibiotic, analgesic/antiinflammatory, and antifungal compounds in five wastewater treatment processes. **Science of the Total Environment**, v. 473–474, p. 235–243, 2014.

GUPTA, S. K.; SHIN, H.; HAN, D.; HUR, H. G.; UNNO, T. Metagenomic analysis reveals the prevalence and persistence of antibiotic- and heavy metal-resistance genes in wastewater treatment plant. **Journal of Microbiology**, v. 56, n. 6, p. 408-415, 2018.

HALLER, L.; CHEN, H.; NG, C.; LE, T. H.; KOH, T. S.; BARKHAM, T.; et al. 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.

HARRABI, M.; GIUSTINA, A. V. D.; ALOULOU, F.; RODRIGUEZ-MOZAZ, S.; BARCELÓ, D.; ELLEUCH, B. Analysis of multiclass antibiotic residues in urban wastewater

in Tunisia. **Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management**, v. 10, p. 163-170, 2018.

HASSOUN-KHEIR, N.; STABHOLZ, Y.; KREFT, J. U.; CRUZ, R.; ROMALDE, J. L.; NESME, J.; et al. Comparison of antibiotic-resistant bacteria and antibiotic resistance genes abundance in hospital and community wastewater: A systematic review. **Science of the Total Environment**, v. 743, p. 140804, 2020.

HCFMRP. Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Relatório de Atividades 2021. Disponível em: < <https://site.hcrp.usp.br/wp-content/uploads/2022/09/Relatorio-de-Atividades-HCRP-2021.pdf> >.

HERRAIZ-CARBONÉ, M.; COTILLAS, S.; LACASA, E.; BARANDA, C. S.; RIQUELME, E.; CAÑIZARES, P.; et al. A review on disinfection technologies for controlling the antibiotic resistance spread. **Science of the Total Environment**, v. 797, p. 149150, 2021.

HERNANDO-AMADO, S.; COQUE, T. M.; BAQUERO, F.; MARTÍNEZ, J. L. Defining and combating antibiotic resistance from One Health and Global Health perspectives. **Nature Microbiology**, v. 4, p. 1432-1442, 2019.

HOBMAN, J. L.; CROSSMAN, L. C. Bacterial antimicrobial metal ion resistance. **Journal of Medical Microbiology**, v. 64, p. 471-497, 2015.

HOCQUET, D.; MULLER, A.; BERTRAND, X. What happens in hospitals does not stay in hospitals: antibiotic-resistant bacteria in hospital wastewater systems. **Journal of Hospital Infection**, v. 93, p. 395-402, 2016.

HUSSEIN, N. H.; AL-KADMY, I. M. S.; TAHA, B. M.; HUSSEIN, J. D. Mobilized colistin resistance (*mcr*) genes from 1 to 10: a comprehensive review. **Molecular Biology Reports**, v. 48, p. 2897-2907, 2021.

HUTCHINGS, M. I.; TRUMAN, A. W.; WILKINSON, B. Antibiotics: past, present and future. **Current Opinion in Microbiology**, v. 51, p. 72-80, 2019.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Ribeirão Preto. Disponível em: < <https://www.ibge.gov.br/cidades-e-estados/sp/ribeirao-preto.html> >.

IMADA, A.; KITANO, K.; KINTAKA, K.; MUROI, M.; ASAI, M. Sulfazecin and isosulfazecin, novel β -lactam antibiotics of bacterial origin. **Nature**, v. 289, p. 590-591, 1981.

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

JORGENSEN, J. H.; MAHER, L. A.; HOWELL, A. W. Activity of meropenem against antibiotic-resistant or infrequently encountered Gram-negative bacilli. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 35, n. 11, p. 2410-2414, 1991.

JUNG, W. K.; KOO, H. C.; KIM, K. W.; SHIN, S.; KIM, S. H.; PARK, Y. H. Antibacterial activity and mechanism of action of the silver ion in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, p. 2171-2178, 2008.

KANEKO, Y.; THEONDEL, M.; OLAKANMI, O.; BRITIGAN, B. E.; SINGH, P. K. The transition metal gallium disrupts *Pseudomonas aeruginosa* iron metabolism and has antimicrobial and antibiofilm activity. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 117, p. 877–888, 2007.

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.

KAZMIERCZAK, K. M.; BIEDENBACH, D. J.; HACKEL, M.; RABINE, S.; JONGE, B. L. M.; BOUCHILLON, S. K.; et al. Global dissemination of *bla*_{KPC} into bacterial species beyond *Klebsiella pneumoniae* and *in vitro* susceptibility to ceftazidime-avibactam and aztreonam-avibactam. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 8, p. 4490-4500, 2016.

KEYER, K.; IMLAY, J. A. Superoxide accelerates DNA damage by elevating free-iron levels. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, p. 13635–13640, 1996.

KIM, S.; YUN, Z.; HA, U. H.; LEE, S.; PARK, H.; KWON, E. E.; et al. Transfer of antibiotic resistance plasmids in pure and activated sludge cultures in the presence of environmentally representative micro-contaminant concentrations. **Science of the Total Environment**, v. 468-469, p. 813-820, 2014.

KNEIS, D.; BERENDONK, T. U.; Heß, S. High prevalence of colistin resistance genes in German municipal wastewater. **Science of the Total Environment**, v. 694, p. 133454, 2019.

KOHLER, V.; KELLER, W.; GROHMANN, E. Regulation of Gram-positive conjugation. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 1134, 2019.

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

KOVALAKOVA, P.; CIZMAS, L.; MCDONALD, T. J.; MARSALEK, B.; FENG, M.; SHARMA, V. K. Occurrence and toxicity of antibiotics in the aquatic environment: A review. **Chemosphere**, v. 251, p. 126351, 2020.

KRUMPERMAN, P. H. Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 46, n. 1., p. 165-170, 1983.

KUMAR, A.; BOJJAGANI, S.; MAURYA, A.; KISKU, G. C. Spatial distribution of physicochemical-bacteriological parametric quality and water quality index of Gomti River, India. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 194, p. 159, 2022.

LADOMERSKY, E.; PETRIS, M. J. Copper tolerance and virulence in bacteria. **Metallomics**, v. 7, n. 6, p. 957-964, 2015.

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

LAM, M. W.; YOUNG, C. J.; BRAIN, R. A.; JOHNSON, D. J.; HANSON, M. A.; WILSON, C. J.; et al. Aquatic persistence of eight pharmaceuticals in a microcosm study. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 23, p. 1431–1440, 2004.

LAURENS, C.; JEAN-PIERRE, H.; LICZNAR-FAJARDO, P.; HANTOVA, S.; GODREUIL, S.; MARTINEZ, O.; et al. Transmission of IMI-2 carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* from river water to human. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 15, p. 88-92, 2018.

LEDERBERG, J.; TATUM, E. L. Gene recombination in *Escherichia coli*. **Nature**, v. 158, p. 558, 1946.

LEMIRE, J. A.; HARRISON, J. J.; TURNER, R. J. Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. **Nature Reviews**, v. 11, p. 371-384, 2013.

LIMA, L. M.; SILVA, B. N. M.; BARBOSA, G.; BARREIRO, E. J. β -lactam antibiotics: An overview from a medicinal chemistry perspective. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 208, p. 112829, 2020.

LÓPEZ-SERNA, R.; MIRA, P.; DAMIÀ, B. Occurrence and distribution of multi-class pharmaceuticals and their active metabolites and transformation products in the Ebro River basin (NE Spain). **Science of the Total Environment**, v. 440, p. 280–289, 2012.

MAAROUFI, R.; DZIRI, O.; HADJADJ, L.; DIENE, S. M.; ROLAIN, J. M.; CHOUCANI, C. Detection by whole-genome sequencing of a novel metallo- β -lactamase produced by *Wautersiella falsenii* causing urinary tract infection in Tunisia. **Polish Journal of Microbiology**, v. 71, n. 1, p. 73-81, 2022.

MACHADO, C. S.; FREGONESI, B. M.; ALVES, R. I. S.; TONANI, K. A. A.; SIERRA, J.; MARTINIS, B. S.; et al. Health risks of environmental exposure to metals and herbicides in the Pardo River, Brazil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 25, p. 20160-20172, 2017.

MACOMBER, L.; ELSEY, S. P.; HAUSINGER, R. P. Fructose-1,6-bisphosphate aldolase (class II) is the primary site of nickel toxicity in *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 82, p. 1291–1300, 2011.

MACOMBER, L.; RENSING, C.; IMLAY, J. A. Intracellular copper does not catalyze the formation of oxidative DNA damage in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 189, p. 1616–1626, 2007.

MANAIA, C. M.; ROCHA, J.; SCACCIA, N.; MARANO, R.; RADU, E.; BIANCULLO, F.; et al. Antibiotic resistance in wastewater treatment plants: Tackling the black box. **Environment International**, v. 115, p. 312-324, 2018.

MARANO, R. B. M.; FERNANDES, T.; MANAIA, C. M.; NUNES, O.; MORRISON, D.; BERENDONK, T. U.; et al. A global multinational survey of cefotaxime-resistant coliforms in urban wastewater treatment plants. **Environment International**, v. 144, p. 106035, 2020.

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

MATHEMA, V. B.; THAKURI, B. C.; SILLANPÄÄ, M. Bacterial *mer* operon-mediated detoxification of mercurial compounds: a short review. **Archives of Microbiology**, v. 193, p. 837-844, 2011.

MCEWEN, S. A.; COLLIGNON, P. J. Antimicrobial Resistance: A One Health Perspective. **Microbiology Spectrum**, v. 6, n. 2, p. 1-26, 2018.

McHUGH, G. L.; MOELLERING, R. C.; HOPKINS, C.; SWARTZ, M. N. *Salmonella* Typhimurium resistant to silver nitrate, chloramphenicol, and ampicillin. **The Lancet**, v. 1, n. 7901, p. 235-240, 1975.

MENDELSON, M.; SHARLAND, M.; MPUNDU, M. Antibiotic resistance: calling time on the 'silent pandemic'. **JAC-Antimicrobial Resistance**, v. 4, n. 2, p. dlac016, 2022.

MIJNENDONCKX, K.; LEYS, N.; MAHILLON, J.; SILVER, S.; HOUDT, R. V. Antimicrobial silver: uses, toxicity and potential for resistance. **Biometals**, v. 26, p. 609-621, 2013.

MIR, R.; SALARI, S.; NAJIMI, M.; RASHKI, A. Determination of frequency, multiple antibiotic resistance index and resistotype of *Salmonella* spp. in chicken meat collected from southeast of Iran. **Veterinary Medicine and Science**, v. 8, n. 1, p. 229-236, 2022.

MOORE, B. A new screen test and selective medium for the rapid detection of epidemic strains of *Staphylococcus aureus*. **The Lancet**, v. 276, n. 7148, p. 453-458, 1960.

MORONES-RAMIREZ, J. R.; WINKLER, J. A.; SPINA, C. S.; COLLINS, J. J. Silver enhances antibiotic activity against Gram-negative bacteria. **Science Translational Medicine**, v. 5, p. 190ra81, 2013.

MOURÃO, J.; NOVAIS, C.; MACHADO, J.; PEIXE, L.; ANTUNES, P. Metal tolerance in emerging clinically relevant multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype 4,[5],12:i:- clones circulating in Europe. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 45, n. 6, p. 610-616, 2015.

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. **Lancet Infectious Diseases**, v. 13, n. 9, p. 785-796, 2013.

MURRAY, C. J. L.; IKUTA, K. S.; SHARARA, F.; SWETSCHINSKI, L.; AGUILAR, G. R.; GRAY, A.; et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. **Lancet**, v. 399, p. 629-655, 2022.

NADEEM, S. F.; GOHAR, U. F.; TAHIR, S. F.; MUKHTAR, H.; PORNPUKEDEEWATTANA, S.; NUKTHAMNA, P.; et al. Antimicrobial resistance: more than 70 years of war between humans and bacteria. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 46, n. 5, p. 578-599, 2020.

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.

NGIGI, A. N.; MAGU, M. M.; MUENDO, B. M. Occurrence of antibiotics residues in hospital wastewater, wastewater treatment plant, and in surface water in Nairobi County, Kenya. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 192, p. 18, 2020.

OLOWO-OKERE, A.; IBRAHIM, Y. K. E.; OLAYINKA, B. O.; MOHAMMED, Y.; NABTI, L. Z.; LUPANDE-MWENEBITU, D.; et al. Genomic features of an isolate of *Empedobacter falsenii* harboring a novel variant of metallo- β -lactamase, *bla*_{EBR-4} gene. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 98, p. 105234, 2022.

OMS, Organização Mundial da Saúde. Global Action Plan on Antimicrobial Resistance. Disponível em: < <https://www.who.int/antimicrobial-resistance/global-action-plan/en/>>.

OMS, Organização Mundial da Saúde. One Health. Disponível em: < <https://www.who.int/news-room/questions-and-answers/item/one-health> >. Acesso em 06 dezembro de 2022.

OMS, Organização Mundial da Saúde. WHO Report on Surveillance of Antibiotic Consumption 2019. Disponível em: <<https://www.who.int/publications/i/item/who-report-on-surveillance-of-antibiotic-consumption>>.

OMUFEREN, L. O.; MASEKO, B.; OLOWOYO, J. O. Occurrence of antibiotics in wastewater from hospital and conventional wastewater treatment plants and their impact on the effluent receiving rivers: current knowledge between 2010 and 2019. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 194, p. 306, 2022.

O'NEILL, J. Tackling drug-resistant infections globally: Final report and recommendations. In: Review on Antimicrobial Resistance. 2016.

ORY, J.; BRICHEUX, G.; ROBIN, F.; TOGOLA, A.; FORESTIER, C.; TRAORE, O. Biofilms in hospital effluents as a potential crossroads for carbapenemase-encoding strains. **Science of the Total Environment**, v. 675, p. 7-15, 2019.

PAL, C.; ASIANI, K.; ARYA, S.; RENSING, C.; STEKEL, D. J.; LARSSON, D. G. J.; et al. Metal resistance and its association with antibiotic resistance. **Advances in Microbial Physiology**, v. 70, p. 261-313, 2017.

PALLARES-VEGA, R.; BLAAK, H.; PLAATS, R.; HUSMAN, A. M. R.; LEAL, L. H.; LOOSDRECHT, M. C. M.; et al. Determinants of presence and removal of antibiotic resistance genes during WWTP treatment: A cross-sectional study. **Water Research**, v. 161, p. 319-328, 2019.

PAPP-WALLACE, K. M.; ENDIMIANI, A.; TARACILA, M. A.; BONOMO, R. A. Carbapenems: Past, present, and future. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 11, p. 4943-4960, 2011.

PASCUAL-BENITO, M.; BALLESTÉ, E.; MONLEÓN-GETINO, T.; URMENETA, J.; BLANCH, A. R.; GARCÍA-ALJARO, C.; et al. Impact of treated sewage effluent on the

bacterial community composition in an intermittent Mediterranean stream. **Environmental Pollution**, v. 266, p. 115254, 2020.

PEREIRA, Y.; LAGNIEL, G.; GODAT, E.; BAUDOUIN-CORNU, P.; JUNOT, C.; LABARRE, J. Chromate causes sulfur starvation in yeast. **Toxicological Sciences**, v. 106, p. 400–412, 2008.

PERRY, J.; WAGLECHNER, N.; WRIGHT, G. The prehistory of antibiotic resistance. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 6, p. a025197, 2016.

PETTAN-BREWER, C.; MARTINS, A. F.; ABREU, D. P. B.; BRANDÃO, A. P. D.; BARBOSA, D. S.; FIGUEROA, D. P. From the approach to the concept: One health in Latin America-experiences and perspectives in Brazil, Chile, and Colombia. **Frontiers in Public Health**, v. 9, 687110, 2021.

POIREL, L.; BONNIN, R. A.; NORDMANN, P. Genetic support and diversity of acquired extended-spectrum β -lactamases in Gram-negative rods. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, p. 883-893, 2012.

PORRECA, A. M.; SULLIVAN, K. V.; GALLAGHER, J. C. The epidemiology, evolution, and treatment of KPC-producing organisms. **Current Infectious Disease Reports**, v. 20, p. 13, 2018.

PRESTINACI, F.; PEZZOTTI, P.; PANTOSTI, A. Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon. **Pathogens and Global Health**, v. 109, n. 7, p. 309-318, 2015.

RAMMELKAMP, C. H.; KEEFER, C. S. Penicillin: Its antibacterial effect in whole blood and serum for the hemolytic *Streptococcus* and *Staphylococcus aureus*. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 22, n. 5, p. 649-657, 1943.

RAMSEY, C.; MACGOWAN, A. P. A review of the pharmacokinetics and pharmacodynamics of aztreonam. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, p. 2704-2712, 2016.

RANDALL, C. P.; GUPTA, A.; JACKSON, N.; BUSSE, D.; O'NEILL, A. J. Silver resistance in Gram-negative bacteria: a dissection of endogenous and exogenous mechanisms. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, p. 1037-1046, 2015.

RAZA, S.; JO, H.; KIM, J.; SHIN, H.; HUR, H. G.; UNNO, T. Metagenomic exploration of antibiotic resistome in treated wastewater effluents and their receiving water. **Science of The Total Environment**, v. 765, p. 142755, 2021.

REDDY, B.; DUBEY, S. K. River Ganges water as reservoir of microbes with antibiotic and metal ion resistance genes: High throughput metagenomic approach. **Environmental Pollution**, v. 246, p. 443-451, 2019.

RIERA, E.; CABOT, G.; MULET, X.; GARCÍA-CASTILLO, M.; CAMPO, R.; JUAN, C.; et al. *Pseudomonas aeruginosa* carbapenem resistance mechanisms in Spain: impact on the activity of imipenem, meropenem and doripenem. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, p. 2022-2027, 2011.

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, 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.

RODRIGUEZ-MOZAZ, S.; CHAMORRO, S.; MARTI, E.; HUERTA, B.; GROS, M.; SÀNCHEZ-MELSIÓ, A.; et al. Occurrence 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.

RODRIGUEZ-MOZAZ, S.; VAZ-MOREIRA, I.; GIUSTINA, S. V. D.; LLORCA, M.; BARCELÓ, D.; SCHUBERT, S.; et al. Antibiotic residues in final effluents of European wastewater treatment plants and their impact on the aquatic environments. **Environment International**, v. 140, p. 105733, 2020.

ROYA, M.; MASUD, Y.; SIMIN, N.; MITRA, G.; ESFANDIYAR, J.; SHAHRAM, S.; et al. Occurrence and fate of most prescribed antibiotics in different water environments of Tehran, Iran. **Science of the Total Environment**, v. 619–620, p. 446–459, 2018.

SADER, H. S.; CARVALHAES, C. G.; MENDES, R. E. Ceftaroline activity against *Staphylococcus aureus* isolated from patients with infective endocarditis, worldwide (2010–2019). **International Journal of Infectious Diseases**, v. 102, p. 524–528, 2021.

SAJJAD, W.; RAFIQ, M.; DIN, G.; HASAN, F.; IQBAL, A.; ZADA, S.; et al. Resurrection of inactive microbes and resistome present in the natural frozen world: reality or myth? **Science of the Total Environment**, v. 735, p. 139275, 2020.

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.

SAUVAGE, E.; TERRAK, M. Glycosyltransferases and transpeptidases/Penicillin-Binding Proteins: Valuable targets for new antibacterials. **Antibiotics**, v. 5, p. 12, 2016.

SENTA, I.; TERZIC, S.; AHEL, M. Occurrence and fate of dissolved and particulate antimicrobials in municipal waste water treatment. **Water Research**, v. 47, p. 705–714, 2013.

SFEIR, M. M. *Burkholderia cepacia* complex infections: More complex than the bacterium name suggest. **Journal of Infection**, v. 77, p. 166-170, 2018.

SINGH, S. B.; YOUNG, K.; SILVER, L. L. What is an “ideal” antibiotic? Discovery challenges and path forward. **Biochemical Pharmacology**, v. 133, p. 63-73, 2017.

SHUAA, A.-M.; IPEK, G.; AISHAH, B. A. L.; BASEM, S. Antibiotics in hospital effluent and domestic wastewater treatment plants in Doha, Qatar. **Journal of Water Processing Engineering**, v. 28, p. 60–68, 2019.

SMYTH, C.; O'FLAHERTY, A.; WALSH, F.; DO, T. T. Antibiotic resistant and extended-spectrum β -lactamase producing faecal coliforms in wastewater treatment plant effluent. **Environmental Pollution**, v. 262, p. 114244, 2020.

SOLIOZ, M.; ABICHT, H. K.; MERMOD, M.; MANCINI, S. Response of Gram-positive bacteria to copper stress. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 15, p. 3–14, 2010.

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.

SQUADRONE, S. Water environments: metal-tolerant and antibiotic-resistant bacteria. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 192, p. 238, 2020.

STADTMAN, E. R. Oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reactions. **Annual Review of Biochemistry**, v. 62, p. 797–821 1993.

STAEHLIN, B. M.; GIBBONS, J. G.; ROKAS, A.; O'HALLORAN, T. V.; SLOT, J. C. Evolution of heavy metal homeostasis/resistance island reflects increasing copper stress in Enterobacteria. **Genome Biology and Evolution**, v. 8, n. 3, p. 811-826, 2016.

STERLING, J. P. Silver-resistance, allergy, and blue skin: Truth or urban legend? **Burns**, v. 40, p. S19-S23, 2014.

STOHS, S. J. & BAGCHI, D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 18, p. 321–336, 1995.

TAHRANI, L.; JORIS, V. L.; ROEL, A.; LUC, V.; HEDI BEN MANSOUR.; et al. Identification and risk assessment of human and veterinary antibiotics in the wastewater treatment plants and the adjacent sea in Tunisia. **Water Science & Technology**, v. 76, n. 11, p. 3000–3021, 2017.

TETAZ, T. J.; LUKE, R. K. J. Plasmid-controlled resistance to copper in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 154, n. 3, p. 1263-1268, 1983.

TOOKE, C. L.; HINCHLIFFE, P.; BRAGGINTON, E. C.; COLENZO, C. K.; HIRVONEN, C. H. A.; TAKEBAYASHI, Y.; et al. β -lactamases and β -lactamase inhibitors in the 21st century. **Journal of Molecular Biology**, v. 431, p. 3472-3500, 2019.

TONANI, K. A.; JULIÃO, F. C.; TREVILATO, T. M.; TAKAYANAGUI, A. M.; BOCIO, A.; DOMINGO, J. L.; et al. 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.; et al. 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.

VALKO, M.; MORRIS, H.; CRONIN, M. T. D. Metals, toxicity and oxidative stress. **Current Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 1161–1208, 2005.

VALKO, M.; RHODES, C. J.; MONCOL, J.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, v. 160, p. 1–40, 2006.

VERLICCHI, P. Trends, new insights and perspectives in the treatment of hospital effluents. **Current Opinion in Environmental Science & Health**, v. 19, p. 100217, 2021.

VERLICCHI, P.; AL AUKIDY, M.; GALLETTI, A.; PETROVIC, M.; BARCELÓ, D. Hospital effluent: Investigation of the concentrations and distribution of pharmaceuticals and environmental risk assessment. **Science of the Total Environment**, v. 430, p. 109–118, 2012.

VIMBELA, G. V.; NGO, S. M.; FRAZE, C.; YANG, L.; STOUT, D. A. Antibacterial properties and toxicity from metallic nanomaterials. **International Journal of Nanomedicine**, v. 12, p. 3941-3965, 2017.

VIROLLE, C.; GOLDLUST, K.; DJERMOUN, S.; BIGOT, S.; LESTERLIN, C. Plasmid transfer by conjugation in Gram-negative bacteria: from the cellular to the community level. **Genes**, v. 11, p. 1239, 2020.

WANG, G.; ZHOU, S.; HAN, X.; ZHANG, L.; DING, A.; LI, Y.; et al. Occurrence, distribution, and source track of antibiotics and antibiotic resistance genes in the main rivers of Chongqing city, southwest China. **Journal of Hazardous Materials**, v. 389, p. 122110, 2020.

WELTE, T.; KANTECKI, M.; STONE, G. G.; HAMMOND, J. Ceftaroline fosamil as a potential treatment for *Staphylococcus aureus* community-acquired pneumonia in adults. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 54, p. 410-422, 2019.

WINK, P. L.; MARTINS, A. S.; VOLPATO, F.; ZAVASCKI, A. P.; BARTH, A. L. Increased frequency of *bla*_{NDM} in a tertiary care hospital in southern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 52, p. 299-301, 2021.

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.

WRIGHT, A. J. The penicillins. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 74, n. 3, p. 290-307, 1999.

YAHAV, D.; GISKE, C. G.; GRAMATNIECE, A.; ABODAKPI, H.; TAM, V. H.; LEIBOVICI, L. New β -lactam- β -lactamases inhibitor combinations. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 34, n. 1, p. e00115-20, 2021.

YANG, Q.; ZHANG, H.; YU, Y.; KONG, H.; DUAN, Q.; WANG, Y.; et al. In vitro activity of imipenem/relebactam against *Enterobacteriaceae* isolates obtained from intra-abdominal, respiratory tract, and urinary tract infections in China: Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART), 2015-2018. **Clinical Infectious Diseases**, v. 71, p. 427-435, 2020.

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

ZAGUI, G. S.; ANDRADE, L. N.; MOREIRA, N. C.; SILVA, T. V.; MACHADO, G. P.; DARINI, A. L.; et al. Gram-negative bacteria carrying β -lactamase encoding genes in hospital and urban wastewater in Brazil. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 192, p. 376, 2020.

ZAGUI, G. S.; ANDRADE, L. N.; SIERRA, J.; ROVIRA, J.; DARINI, A. L. C.; SEGURA-MUÑOZ. Plasticsphere as a pathway for antimicrobial-resistant bacteria spread to the environment: New challenge and open questions. **Environmental Research**, v. 214, n. 4, p. 114156, 2022.

ZAGUI, G. S.; MOREIRA, N. C.; SANTOS, D. V.; DARINI, A. L. C.; DOMINGO, J. L.; SEGURA-MUÑOZ, S. I.; et al. High occurrence of heavy metal tolerance genes in bacteria isolated from wastewater: A new concern? **Environmental Research**, v. 196, p. 110352, 2021.

ZHANG, L.; MA, X.; LUO, L.; HU, N.; DUAN, J.; TANG, Z. The prevalence and characterization of extended-spectrum β -lactamase- and carbapenemase-producing bacteria from hospital sewage, treated effluents and receiving rivers. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, p. 1183, 2020.

ZHAO, F.; LIU, J.; SHI, W.; HUANG, F.; LIU, L.; ZHAO, S.; et al. Antimicrobial susceptibility and genotyping of *Mycoplasma pneumoniae* isolates in Beijing, China, from 2014 to 2016. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, v. 8, p. 18, 2019.

ZHAO, W. H.; HU, Z. Q. Epidemiology and genetics of VIM-type metallo- β -lactamases in Gram-negative bacilli. **Future Microbiology**, v. 6, n. 3, p. 317-333, 2011.