



UNIVERSIDADE DE RIBEIRÃO PRETO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS, NATURAIS E TECNOLOGIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA AMBIENTAL

RAFAEL NAKAMURA DA SILVA

CARACTERIZAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE AOS
ANTIMICROBIANOS E DO POTENCIAL PATOGÊNICO DE
ENTEROBACTÉRIAS ISOLADAS DE ESGOTOS HOSPITALARES

RIBEIRÃO PRETO
2022

RAFAEL NAKAMURA DA SILVA

CARACTERIZAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE AOS
ANTIMICROBIANOS E DO POTENCIAL PATOGÊNICO DE
ENTEROBACTÉRIAS ISOLADAS DE ESGOTOS HOSPITALARES

Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Tecnologia Ambiental da
Universidade de Ribeirão Preto UNAERP,
como requisito de avaliação para a obtenção
do título de Doutor em Tecnologia Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. André Pitondo da Silva

Ribeirão Preto
2022

Ficha catalográfica preparada pelo Centro de Processamento
Técnico da Biblioteca Central da UNAERP

- Universidade de Ribeirão Preto -

SILVA, Rafael Nakamura da, 1991-

S586c Caracterização da susceptibilidade aos antimicrobianos e
do potencial patogênico de enterobactérias isoladas de esgotos
hospitalares / Rafael Nakamura da Silva. – Ribeirão Preto, 2022.

66 f. : il. color.

Orientador: Prof.º Dr.º André Pitondo da Silva.

Tese (doutorado) - Universidade de Ribeirão Preto,

RAFAEL NAKAMURA DA SILVA
“CARACTERIZAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS E
DO POTENCIAL PATOGENICO DE ENTEROBACTÉRIAS ISOLADAS DE
ESGOTOS HOSPITALARES”

Tese de Doutorado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Tecnologia Ambiental do Centro de Ciências Exatas, Naturais e Tecnologias da Universidade de Ribeirão Preto, para a obtenção do título de Doutor em Tecnologia Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. André Pitondo da Silva.

Área de concentração: Tecnologia Ambiental

Data de defesa: 25 de novembro de 2022

Resultado: Aprovado

BANCA EXAMINADORA

Assinado de forma digital por André Pitondo da Silva
Dados: 2022.11.25 18:23:57 -03'00'
André Pitondo da Silva
Prof. Dr. André Pitondo da Silva
Presidente/Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP



Prof. Dr. Valdir Schaleh.
Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP
Assinado de forma digital por MURILO DANIEL DE MELLO INNOCENTINI:10290211808
Dados: 2022.11.27 21:50:05 -03'00'
MURILO DANIEL DE MELLO INNOCENTINI:10290211808
Prof. Dr. Murilo Daniel de Mello Innocentini
Universidade de Ribeirão Preto – UNAERP

Assinado de forma digital por Tatiana Amabile de Campos
Dados: 2022.11.27 20:41:13 -03'00'

Prof. Dra. Tatiana Amabile de Campos
Universidade de Brasília - UnB

Prof. Dr. Georgios Joannis Pappas Júnior
Universidade de Brasília - UnB

Ribeirão Preto
2022

*Dedico este trabalho a todos os combatentes
da resistência aos antimicrobianos!*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos as pessoas que fizeram parte da minha jornada em relação ao desenvolvimento da tese.

À Universidade de Ribeirão Preto, na pessoa da magnífica reitora **Profa. Dra. Suzelei de Castro França**.

À antiga coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Ambiental, **Profa. Dra. Luciana Rezende Alves de Oliveira**. Agradeço toda solicitude oferecida e o reforço positivo me dado durante o exame de qualificação.

Ao atual coordenador do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Ambiental, **Prof. Dr. Murilo Daniel de Mello Innocentini**. Agradeço todo profissionalismo, disponibilidade, confiança, ensinamentos e conselhos dados.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. André Pitondo da Silva** que faz parte da minha vida desde que me aceitou como aluno em 2017. Sou grato a todos ensinamentos (desde os mais básicos aos complexos), as orientações (tanto acadêmicas quanto pessoais), confiança no meu trabalho (responsabilidades que me atribuiu) e paciência (disponibilidade em sempre ouvir minhas ideias e opiniões). Além dos agradecimentos, deixo aqui minha enorme admiração e satisfação pela excelência em seu desempenho como orientador. Obrigado por sempre compartilhar sua sabedoria comigo, seja por meio de palavras ou de ações.

Ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Ambiental, em especial, aos professores (as) que me deram aulas: **Prof. Dr. André Pitondo da Silva, Prof. Dr. Eduardo Cleto Pires, Prof. Dr. Gustavo Almeida Frata, Profa. Dra. Luciana Rezende Alves de Oliveira, Prof. Dr. Luciano Farias de Novaes, Prof. Dr. Murilo Daniel de Mello Innocentini, Prof. Dr. Renê de Oliveira Belebony, Prof. Dr. Valdir Schalch, Prof. Dr. Wellington Cyro de Almeida Leite**.

À **Profa. Dra. Marise Bastos Stevanato** e ao **Prof. Dr. Carlos Eduardo Saraiva Miranda**, pelos diversos auxílios, convivência e por serem professores exemplares.

Aos integrantes e ex-integrantes do LABAC, pela convivência, conversas e pelos momentos divertidos que compartilhamos. Obrigado em especial à **Mariana Oliveira, Miguel Augusto, Rafael Goulart, Leila Dias, Amanda Ferreira, Victoria Louzada, Carol Bressan, Enzo Ruas, Gabriela Lisi, Aline Clara Cruvinel e Ana Laura Stefanelli**.

Aos funcionários da UNAERP que conviveram tão agradavelmente comigo. Obrigado **Tassiana Trevisan, Claudinéia Araújo, Divaneide Dantas, Luciana Colassante, Valdir da Silva, Antônio Adriani e Patrícia Machado.**

Ao **João Furlan** (FCFRP-USP) e **Felipe Almeida** (UnB) por indiretamente me inspirarem como exemplos de doutorandos modelos. À amiga **Inara Fernanda** (FCFRP-USP) pela convivência e pela amizade durante meu início na carreira científica.

Ao **Rodrigo Fujimoto** e **Ricardo de Sousa** (EMBRAPA, ambos), pela colaboração na identificação dos isolados bacterianos.

E por fim, agradeço aqueles que contribuíram por meios não relacionados à academia, às pessoas que mais amo, e por isso merecem agradecimentos por todas minhas conquistas. Obrigado **Madalena Nakamura, Robson Nakamura, Mariana Nakamura, Nina Nakamura, Emily Nakamura, Roberta Nakamura, Akiko Nakamura** e **Clara Kekis.**



Este trabalho foi realizado no Laboratório de Bacteriologia e Biologia Molecular (LABAC) da Universidade de Ribeirão Preto, com apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), por meio da concessão de bolsa de estudo para doutorado (processo no 88882365161 e Código Financeiro 001). Apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), por meio do financiamento concedido ao LABAC (Bolsa nº 2013 / 22581-5).

*Com grandes poderes
vêm grandes responsabilidades!*

(Benjamin Parker)

RESUMO

A resistência aos antimicrobianos está entre as maiores ameaças atuais à saúde pública. O aumento global da resistência antimicrobiana tem sido um fato cada vez mais preocupante em todo o mundo e o esgoto hospitalar é um ambiente com o potencial para favorecer a disseminação de microrganismos resistentes, como bactérias multirresistentes, que comprometem a eficácia do tratamento e prevenção de infecções em humanos e animais. O objetivo do presente estudo foi investigar o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos e o potencial patogênico de bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, isoladas de esgotos hospitalares. Com o intuito de adquirir dados de hospitais de diferentes complexidades, as coletas das amostras foram realizadas em um hospital de nível secundário de atenção à saúde no município de Ribeirão Preto (SP) e um hospital de nível terciário de Uberlândia (MG), Brasil. Para o isolamento das bactérias, foram utilizadas técnicas de filtração por membrana e diluição seriada. Os isolados bacterianos foram identificados por meio a técnica MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight*). O perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos foi realizado por teste de disco-difusão. Genes de virulência foram investigados por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) e o fenótipo de hiper mucoviscosidade pelo *String test*. Foram identificadas 41 enterobactérias, sendo 28 do esgoto hospitalar secundário e 13 do esgoto hospitalar terciário, sendo *Klebsiella pneumoniae* a espécie predominante (63,4%, n = 26). Todas (n = 28) as *Enterobacteriaceae* do esgoto hospitalar secundário foram classificadas como MDR (*multidrug-resistant*) e 76,9% (n = 10) do esgoto hospitalar terciário, foram MDR. Os genes codificadores de virulência *ycfM*, *fimH*, *mrkD*, *kfu* e *entB* foram detectados em diversos isolados. Os resultados indicaram que o esgoto de ambos hospitais (independentemente do nível de atenção à saúde) continham considerável quantidade de bactérias MDR carregando genes de virulência, inclusive, *K. pneumoniae* expressando o fenótipo de hiper mucoviscosidade. A presença de bactérias com as características encontradas traz um alerta sobre seu potencial de contaminação e disseminação para o meio ambiente, sobretudo, o espalhamento de genes que contribuirão com o aumento da resistência aos antimicrobianos. A obtenção de dados como estes, pode auxiliar na definição de novas estratégias de saúde pública e medidas profiláticas de caráter político, prático e conscientizador.

Palavras-chave: Resistência antimicrobiana. Virulência. *Enterobacteriaceae*. Esgoto hospitalar. Saúde pública.

ABSTRACT

Antimicrobial resistance is among the greatest current threats to public health. The global increase in antimicrobial resistance has been an increasingly worrying fact around the world and hospital sewage is an environment with the potential to favor the spread of resistant microorganisms, such as multidrug-resistant bacteria, which compromise the effectiveness of treatment and prevention of infections in humans and animals. The aim of the present study was to investigate the susceptibility profile to antimicrobials and the pathogenic potential of bacteria belonging to the *Enterobacteriaceae* family, isolated from hospital sewage. In order to acquire data from hospitals of different complexities, sample collections were carried out in a secondary level hospital of health care in the city of Ribeirão Preto (SP) and a tertiary level hospital in Uberlândia (MG), Brazil. For the isolation of bacteria, membrane filtration and serial dilution techniques were used. Bacterial isolates were identified using the MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight) technique. The antimicrobial susceptibility profile was performed by disk-diffusion test. Virulence genes were investigated by PCR (Polymerase Chain Reaction) and the hypermucoviscosity phenotype by the String test. A total of 41 *Enterobacteriaceae* were identified, 28 from secondary hospital sewage and 13 from tertiary hospital sewage, with *Klebsiella pneumoniae* being the predominant species (63.4%, n = 26). All (n = 28) *Enterobacteriaceae* from secondary hospital sewage were classified as MDR (multidrug-resistant) and 76.9% (n = 10) from tertiary hospital sewage were MDR. The virulence encoding genes *ycfM*, *fimH*, *mrkD*, *kfu* and *entB* were detected in several isolates. The results indicated that the sewage of both hospitals (regardless of the level of health care) contained considerable amounts of MDR bacteria carrying virulence genes, including *K. pneumoniae* expressing the hypermucoviscosity phenotype. The presence of bacteria with the characteristics found brings an alert about their potential for contamination and dissemination to the environment, above all, the spread of genes that will contribute to the increase of resistance to antimicrobials. Obtaining data such as these can help to define new public health strategies and prophylactic measures of a political, practical and awareness-raising nature.

Keywords: Antimicrobial resistance. Virulence. *Enterobacteriaceae*. Hospital sewage. Public Health.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURAS

- Figura 1** - Diagrama representando as principais rotas de transmissão de resistência aos antimicrobianos 19
- Figura 2** - Lista de patógenos prioritários para Pesquisa e Desenvolvimento (P&D) de novos antibióticos 22
- Figura 3** - Principais mecanismos de ação dos fármacos antibacterianos 24
- Figura 4** - Principais mecanismos de resistência aos antimicrobianos 26
- Figura 5** - Descarte de resíduos de Serviço de Saúde em sistema de esgoto municipal. A) Recipientes contendo o material coletado após uma cirurgia de grande porte. B) Descarte de resíduos líquidos coletados em diferentes cirurgias realizadas em hospital terciário de Uberlândia 27
- Figura 6** - Coleta das amostras no hospital secundário de Ribeirão Preto, SP. A) Ponto receptor da saída de esgoto de todo hospital. B) Interior do ponto receptor 31
- Figura 7** - Armazenamento das amostras bacterianas. A) Criotubos contendo as culturas das amostras, meio de cultura e 15% glicerol. B) Ultrafreezer -80° C 32
- Figura 8** - Técnica de membrana filtrante 33
- Figura 9** - Culturas bacterianas mistas provenientes da técnica de diluição seriada em ágar MacConkey. A) Concentrado. B) Diluído 33
- Figura 10** - Culturas bacterianas puras em ágar Mueller Hinton. A) Exemplos. B) A seta aponta para cultura com características morfológicas de *Serratia* spp. C) A seta aponta para cultura com características morfológicas de *Pseudomonas* spp. 34
- Figura 11** - Equipamento MALDI-TOF-MS (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry*) (Bruker Daltonics) 35
- Figura 12** - Materiais relacionados ao antibiograma. A) Escala de McFarland, a seta aponta para a turbidez 0,5. B) Cartucho contendo discos do antibiótico ceftarolina (Oxoid). C) Frasco contendo discos do antibiótico cefepime (Sensifar) 37

Figura 13 - Teste de sensibilidade aos antimicrobianos por disco-difusão em ágar Mueller Hinton. A) Formação de halos de inibição com diâmetros relativamente largos. B) Formação de halos de inibição estreitos ou ausência de halos.....	37
Figura 14 - <i>K. pneumoniae</i> apresentando fenótipo de hiper mucoviscosidade	38
Figura 15 - Extração e análise espectrofotométrica. A) Microtubos contendo o lisado bacteriano durante o processo de extração de DNA genômico. B) Equipamento Nanofotometro P-Class P360 (Implen).....	39
Figura 16 - Materiais e reagentes de amplificação. A) Microtubos de 2 ml contendo DNA genômico dos isolados bacterianos, utilizados como DNA alvo. B) Reagentes da PCR, a seta esquerda aponta para a enzima DNA polimerase e a seta direita para os dNTPs. C) Microtubos de 0,2 ml contendo amplicons	42
Figura 17 - Equipamento Termociclador ProFlex PCR system (ThermoFisher)	42
Figura 18 – Eletroforese em gel de agarose. A) Estrutura para confecção de gel de agarose. B) Gel de agarose em processo de solidificação. A seta aponta para o pente, estrutura removida após a solidificação do gel, formando os poços onde os <i>amplicons</i> são aplicados. C) A seta esquerda aponta para a fonte de energia (Bio-Rad). A seta direita para a cuba de eletroforese contendo o gel de agarose, o cabo preto é o polo negativo e o vermelho o positivo	43
Figura 19 - Equipamento para a captura da imagem do material amplificado. A) Parte inferior do Fotodocumentador (Loccus), mostrando a bandeja onde o gel corado é depositado para visualização sob luz UV. B) Parte superior do Fotodocumentador, mostrando a imagem do gel em tempo real. C) Foto de um gel e suas nove canaletas. A seta esquerda aponta para a canaleta com o <i>ladder</i> . A seta direita aponta para um conjunto de canaletas que receberam <i>amplicons</i> de diferentes bactérias, todas amplificaram bandas com aproximadamente 1.6000 pb (pares de bases)	44
Figura 20 - Equipamento Sequenciador ABI3500 XL (Applied Biosystem)	45
Figura 21 - Eletroferograma (programa ChromasPro) obtido por sequenciamento Sanger, a seta aponta para parte da sequência de nucleotídeos resultante	45
Figura 22 - Procedimento de consulta de similaridade de nucleotídeos (programa BLAST), a seta aponta para a sequência inquirida	46

Figura 23 - Procedimento de consulta de similaridade de nucleotídeos (programa BLAST), a seta aponta para outras sequências encontradas no banco de dados, depositadas como o mesmo gene pesquisado e possuindo 100% similares à sequência inquirida	46
Figura 24 - Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos e genes de virulência encontrados entre as 28 cepas multirresistentes de <i>Enterobacteriaceae</i> isoladas do esgoto hospitalar de Ribeirão Preto	48
Figura 25 - Porcentagem de cepas não-susceptíveis entre as 28 cepas das cinco espécies de <i>Enterobacteriaceae</i> isoladas do esgoto hospitalar de Ribeirão Preto ..	49
Figura 26 - Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos, fenótipo de hiper mucoviscosidade e genes de virulência encontrados entre as 13 cepas de <i>Enterobacteriaceae</i> isoladas do esgoto hospitalar de Uberlândia	50
Figura 27 - Percentual de cepas não-susceptíveis entre as 13 cepas das três espécies de <i>Enterobacteriaceae</i> isoladas do esgoto hospitalar de Uberlândia	50

QUADROS

Quadro 1 - Categorias de importância dos antimicrobianos	23
Quadro 2 - Mecanismos de resistência e suas características	26
Quadro 3 - Detalhamento dos genes de virulência pesquisados por PCR e respectivos primers. F, primer forward. R, primer, reverse. pb, pares de base do produto. TA, temperatura de anelamento	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Adenina
AMR	Resistência aos antimicrobianos, <i>antimicrobial resistance</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ARB	Bactéria resistente aos antimicrobianos, <i>antimicrobial resistant bacteria</i>
ARG	Genes de resistência aos antimicrobianos, <i>antimicrobial resistant genes</i>
Art.	Artigo
ATCC	Amostra controle, <i>American Type Culture Collection</i>
BHI	Meio de cultura <i>Brain Heart Infusion</i>
C	Celsius
C	Citosina
CG	Grupo clonal, <i>clonal group</i>
CLSI	Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais, <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
DNA	Ácido desoxirribonucleico, <i>deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxinucleotídeo trifosfatados, <i>Deoxynucleotide triphosphates</i>
EAS	Estabelecimentos assistenciais de saúde
<i>et al.</i>	E colaboradores, <i>et alii</i>
<i>etc.</i>	Dentre outros, <i>et cetera</i>
ETE	Estação de tratamento de esgoto
<i>e. g.</i>	Por exemplo, <i>exempli gratia</i>
G	Guanina
HMV	Hipermucoviscosidade ou hipermucoviscoso
Inc.	Inciso
MALDI-TOF	Técnica de espectrometria de massa, <i>matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight</i>
MC	Meio de cultura MacConkey
MDR	Multirresistente aos antimicrobianos, <i>multidrug-resistant</i>
MG	Minas Gerais

MH	Meio de cultura Mueller Hinton
ml	Mililitros, unidade de medida
mM	Milimolar
nm	Nanômetros, unidade de medida
n. p.	Não paginado
nº	Número
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Técnica de reação em cadeia da polimerase, <i>polymerase chain reaction</i>
PDR	Pan-resistente aos antimicrobianos, <i>pandrug-resistant</i>
PNRS	Política Nacional de Resíduos Sólidos
pb	Pares de bases
P&D	Pesquisa e desenvolvimento
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RNA	Ácido ribonucleico, <i>ribonucleic acid</i>
rpm	Rotações por minuto
RSS	Resíduos de serviços de saúde
S	Svedberg, unidade de medida
SP	São Paulo
spp.	Espécies, <i>species</i>
T	Timina
XDR	Extensivamente resistente aos antimicrobianos, <i>extensively drug-resistant</i>
µg	Micrograma, unidade de medida
µl	Microlitro, unidade de medida

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	17
2. 1 OBJETIVO GERAL	17
2. 2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3 REVISÃO DE LITERATURA	18
3. 1 SAÚDE ÚNICA, ESGOTO E ÁGUAS RESIDUÁRIAS	18
3. 2 PARALELO ENTRE BACTÉRIAS MULTIRRESISTENTES EA PANDEMIA DE COVID-19.....	20
3. 3 LISTA DE BACTÉRIAS DE PRIORIDADE CRÍTICA	21
3. 4 LISTA DE ANTIMICROBIANOS DE IMPORTÂNCIA CRÍTICA	22
3. 5 MECANISMOS DE AÇÃO DE FÁRMACOS ANTIBACTERIANOS	24
3. 6 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA DE BACTÉRIAS	25
3. 7 LEGISLAÇÃO E DADOS HOSPITALARES	25
4 MATERIAL E MÉTODOS	30
4. 1 FONTE DAS AMOSTRAS	30
4. 2 COLETA E ARMAZENAMENTO	30
4. 3 ISOLAMENTO DAS BACTÉRIAS	31
4. 4 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS BACTERIANOS	34
4. 5 TESTE DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS	35
4. 6 PESQUISA DO FENÓTIPO DE HIPERMUCOVISCOSIDADE	36
4. 7 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO	38
4. 8 DETECÇÃO DE GENES CODIFICADORES DE VIRULÊNCIA	39
4. 8. 1 Eletroforese em Gel de Agarose	40
4. 8. 2 Sequenciamento	43
5 RESULTADOS	47
5.1 ESGOTO DO HOSPITAL SECUNDÁRIO DE RIBEIRÃO PRETO.....	47
5. 2 ESGOTO DO HOSPITAL TERCIÁRIO DE UBERLÂNDIA	49
6 DISCUSSÃO	52
7 CONCLUSÕES	58
8 TRABALHOS FUTUROS	60
REFERÊNCIAS	61

1 INTRODUÇÃO

Uma das grandes preocupações no mundo todo, é com controle da disseminação de bactérias multirresistentes provenientes de procedimentos e infecções hospitalares. Morosini e Cantón (2018) ressaltam que a incidência de infecção hospitalar varia entre os países e, mais ainda, entre diferentes hospitais de um mesmo país, pois a complexidade dos grandes hospitais é inevitavelmente elevada, exigindo rígidas medidas de controle de contenção da infecção, que nem sempre têm sucesso.

Na revisão sobre resistência antimicrobiana (AMR, do inglês *antimicrobial resistance*) presidida por Jim O'Neill e apoiada conjuntamente pelo governo do Reino Unido em 2014, foi demonstrado o perigo iminente da AMR, podendo haver impactos profundos na saúde e consequências macroeconômicas para o mundo, especialmente em economias emergentes. Foi estimado que 700 mil pessoas morrem anualmente devido a AMR, superando o número de outras grandes causas de mortes como tétano (60 mil), cólera (100-120 mil) sarampo (130 mil) (O'NEILL, 2014). Comparado à quantidade mundial de mortes anuais ocasionadas por acidentes de trânsito (1,2 milhão), doenças diarreicas (1,4 milhão) e diabetes (1,5 milhão) a AMR pode aparentar menos preocupante, principalmente quando contrastada aos 8,2 milhões de mortes anuais por câncer, entretanto, o rápido aumento da AMR acentua a preocupação desta ameaça. Foi estimado que a quantidade de morte anual em 2050 chegaria a 10 milhões, caso medidas e estratégias de contenção da AMR não sejam aplicadas (O'NEILL, 2014).

Os hospitais são potenciais disseminadores de várias bactérias multirresistentes por meio de líquidos excretados pelos pacientes com as mais variadas infecções. Limpezas de áreas críticas como: centros cirúrgicos, unidades de terapia intensiva, lavanderias, materiais de laboratórios, entre outros setores hospitalares, assim como resíduos de serviços de saúde (RSS), também podem contribuir para a disseminação de bactérias resistentes no esgoto hospitalar. Quando estes resíduos não passam por tratamentos adequados, ao serem lançados na rede de esgoto, podem contaminar mananciais (VIEIRA; RODRIGUES; PICOLI, 2013).

Os RSS podem levar à degradação ambiental e promover a transmissão de agentes infecciosos, contaminação da água dos rios pelos esgotos hospitalares não submetidos a tratamentos adequados. A presença de bactérias multirresistentes nos

resíduos hospitalares representam riscos à saúde humana, animal e ao meio ambiente (BILA; DEZOTTI, 2003; TONUCCI, 2006; NASCIMENTO, 2009). Dentre as maiores preocupações, estão as enterobactérias, cuja multirresistência fora do ambiente hospitalar tem sido cada vez mais relatada (TAVARES, 2014). Um estudo realizado por Azevedo *et al.* (2019) demonstrou-se a presença de clones de *Klebsiella pneumoniae* multirresistentes (MDR, do inglês *multidrug-resistant*) com um grande número de genes de resistência e virulência, pertencentes ao CG258 (CG, do inglês *clonal group*), conhecido internacionalmente como clones de alto risco de disseminação, causando infecções urinárias em pacientes da comunidade no Brasil. Sugerindo assim, um alerta para a circulação de clones epidêmicos que usualmente são encontrados no ambiente hospitalar, circulando na comunidade.

Embora o esgoto hospitalar não seja uma quantidade tão representativa em comparação ao esgoto municipal, o esgoto hospitalar é considerado uma das principais fontes de contribuição de antibióticos nas estações de tratamento de esgoto (ETEs). Devido ao alto consumo de antibióticos em hospitais, e como 90% deles são excretados nas fezes e urina humanas como compostos originais ou subprodutos, estudos indicam que as concentrações de antibióticos nos efluentes hospitalares podem ser 100 vezes maiores do que nos efluentes municipais (ALMAKKI *et al.*, 2019). Esse fato, entre outros como o descarte incorreto de líquidos infectados (DIAS *et al.*, 2021), pode favorecer a pressão seletiva de bactérias resistentes aos antimicrobianos (ARB, do inglês *antimicrobial resistant bacteria*), no esgoto hospitalar e, conseqüentemente, a contaminação ambiental.

Portanto, é essencial investigar bactérias multirresistentes de esgoto hospitalar, bem como avaliar seu potencial patogênico. Partindo-se da perspectiva da recente abordagem de Saúde Única (*One Health*), os setores humano, animal e ambiental, estão conectados. Ações e acontecimentos envolvendo um desses setores, conseqüentemente envolvem os outros. A obtenção de perfis bacterianos em ambientes com pressão seletiva pode auxiliar na definição de novas estratégias de saúde pública e medidas profiláticas de caráter político, prático e de conscientização.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Esse estudo teve como objetivo investigar fenotípica e molecularmente diferentes espécies bacterianas presentes em esgotos hospitalares provenientes de dois hospitais, sendo um de nível secundário de atenção à saúde e outro de nível terciário.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar e identificar diferentes espécies de *Enterobacteriaceae* presentes em amostras de esgotos hospitalares;
- Determinar o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos dos isolados bacterianos;
- Detectar a presença de genes codificadores de virulência nos isolados;
- Investigar presença do fenótipo de hiper mucoviscosidade em *Klebsiella pneumoniae*;
- Correlacionar os resultados adquiridos dos isolados provenientes do esgoto hospitalar de nível secundário e terciário.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 SAÚDE ÚNICA, ESGOTO E ÁGUAS RESIDUÁRIAS

O termo Saúde Única (*One Health*) refere-se ao esforço coletivo executado por profissionais de ciência da saúde, objetivando alcançar um nível de saúde ideal aos setores humano, animal e ambiental (MCEWEN; COLLIGNON, 2018). Essa abordagem baseia-se na dependência mútua e relações que acontecem intersetorialmente, e. g. estima-se que até 75% de doenças infecciosas humanas das últimas décadas possuem origem zoonótica (WOOLHOUSE; GOWTAGE-SEQUERIA, 2005).

O problema global da resistência antimicrobiana envolve os múltiplos setores, por isso, ele deve ser analisado da perspectiva *One Health* (Figura 1). Humanos e animais compartilham vários antibióticos em comum para a terapêutica e, o uso exagerado e incorreto ocorre em ambos. Outro importante fator que favorece o aumento da AMR é a utilização de antibiótico como promotor de crescimento na pecuária. O meio ambiente recebe resíduos e metabólitos de antimicrobianos oriundos de esgoto humano, esterco de gado, aquicultura, etc. Além dos próprios genes de resistência presentes nos locais citados, por isso, o meio ambiente possui potencial de reservatório de exposição de AMR e genes de resistência aos antimicrobianos (ARG, do inglês *antimicrobial resistant genes*).

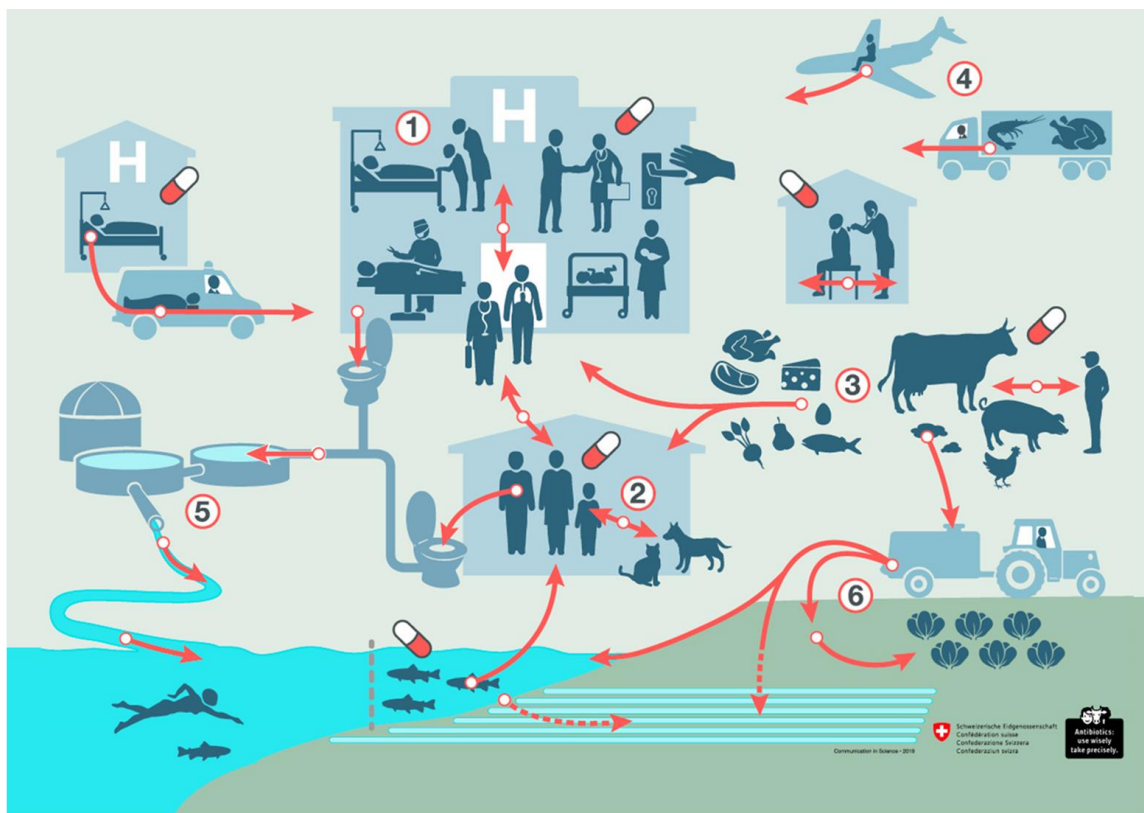
Para países desenvolvidos, onde verifica-se maior universalização de sistema de tratamento de água e sistema de esgoto sanitário, a transmissão de AMR pode ocorrer principalmente por alimentação, e. g. frutas e verduras contaminadas por esterco ou água de irrigação, bem como, por ingestão de carnes contaminadas durante seu processamento. Para países com tratamento de esgoto e de água deficientes, a transmissão de AMR e ARG ocorrem provavelmente tendo a água como principal veículo (MCEWEN; COLLIGNON, 2018).

No Brasil, segundo o Sistema Nacional de informações sobre Saneamento (SNIS) em sua análise do ano de 2020, dos 5570 municípios brasileiros, 2807 (50,4%) possuem sistema público de esgoto e 1937 (34,8%) não possuem. Os 826 (14,8%) municípios restantes não participaram da amostra. Portanto, o percentual de municípios sem sistema público de esgoto, que por consequência, necessitam do tratamento prévio do esgoto, varia entre 34,8% a 49,6%, no entanto, as informações

relativas à realização ou não do tratamento prévio não estão bem elucidadas no Brasil (SNIS, 2021).

Além do problema anterior, outro potencial modo de contaminação ambiental por bactérias multirresistentes provenientes de esgoto, é por meio dos extravasamentos de esgoto. No ano de 2020, foram registrados 901,3 mil extravasamentos, ocorrendo principalmente na região sudeste (74,2%) (SNIS, 2021).

FIGURA 1 – Diagrama representando as principais rotas de transmissão de resistência aos antimicrobianos



1) Instituições de saúde, as bactérias resistentes podem ser transmitidas através do contato entre pacientes, entre pacientes e seus visitantes, pela equipe de enfermagem ou através de superfícies e dispositivos médicos contaminados (durante um procedimento médico); 2) As bactérias resistentes que ocorrem após o tratamento com antibióticos podem ser transferidas de um humano para um animal, ou vice-versa; 3) As bactérias também podem infectar a carne crua durante o abate e causar infecções alimentares. Eles também podem contaminar produtos lácteos, ovos, peixes e frutos do mar, legumes e frutas; 4) O turismo e as importações de alimentos são a maneira mais rápida de espalhar cepas bacterianas resistentes através das fronteiras nacionais; 5) Bactérias resistentes podem entrar em rios, lagos e reservas subterrâneas, embora as estações de tratamento eliminem 99% delas em águas residuais tratadas antes de despejar a água no ambiente natural; 6) O espalhamento de esterco (chorume) em campos cultivados também pode levar à disseminação de bactérias, que podem se multiplicar nas plantas, infiltrar-se em águas subterrâneas ou ser levadas para rios e lagos.

Fonte: Adaptado de <https://www.bag.admin.ch/bag/en/home/krankheiten/infektionskrankheiten-bekaempfen/antibiotikaresistenzen/wie-breiten-sich-antibiotikaresistenzen-aus-.html>. Acesso em 14 mar. 2022.

Diversos estudos recentes vêm destacando a atuação de águas residuárias como reservatório de AMR, pois além de serem um ambiente favorável para ARB, funcionam como um reservatório de ARG. Os processos de tratamento das águas residuárias e dos esgotos ajudam na redução da carga bacteriana, porém, o mesmo não ocorre com os genes, por serem de difícil degradação. Esses genes podem ser disseminados para o meio ambiente e se espalhar nas bactérias através de transferências horizontais (FOUZ *et al.*, 2020).

Fouz *et al.* (2020) analisaram 63 artigos em sua revisão sistemática sobre resistência aos antimicrobianos em amostras de esgoto. Para isso, utilizaram 4 bancos de dados internacionais: *Embase*, *Medline*, *PubMed* e *Web of Science Core Collection*, utilizando os termos “*Antimicrobial resistance*” ou “AMR” combinados com “*sewage*” (esgoto) como palavras-chave para encontrar artigos entre 2009 e 2019. O total de 1461 artigos foram obtidos, após a remoção das duplicadas e dos critérios de exclusão (*e. g.* sem ter o texto completo em inglês, não possuir *design* observacional de estudo, sem foco específico em resistência aos antimicrobianos em esgoto, *etc.*), permaneceram 63 artigos no estudo. Os tipos de amostras investigadas eram de esgoto municipais, esgotos hospitalares, ETEs, rios, córregos, dentre outras. Os estudos analisados evidenciaram o papel das águas residuárias e do esgoto como principais fontes de ARB e ARG no meio ambiente. Em particular, esgotos municipais não tratados, esgotos hospitalares, esgotos farmacêuticos foram caracterizados com níveis clinicamente relevantes. Sugerindo um estado alarmante, considerando que muitas espécies bacterianas clinicamente relevantes, como *Escherichia coli* enterotoxigênica e *Salmonella* sorotipos tifóide e não tifóide mostraram-se capazes de sobreviverem em meios aquáticos por tempos relativamente longos (FOUZ *et al.*, 2020).

3. 2 PARALELO ENTRE BACTÉRIAS MULTIRRESISTENTES E A PANDEMIA DE COVID-19

Com a atual pandemia de COVID-19, pesquisadores de todo o mundo têm levantado a preocupação quanto à presença de microrganismos patogênicos nos esgotos hospitalares e têm demonstrado a presença do SARS-CoV-2 em amostras de esgoto de diferentes países, como Holanda, Austrália, França, EUA e o Brasil (AHMED *et al.*, 2020; PRADO *et al.*, 2020; MEDEMA *et al.*, 2020; WU *et al.*, 2020; WURTZER *et al.*, 2020). Tais fatos reforçam que, assim como o vírus causador da

COVID-19, diversas espécies bacterianas multirresistentes podem se espalhar pelos sistemas de águas residuárias (NADDEO; LIU, 2020).

Conforme alertado por Nordmann, Poirel e Frey (2020), a atual disseminação de genes de resistência em todo o mundo, principalmente em países em desenvolvimento pode, em breve, levar a situações difíceis semelhantes às observadas na atual pandemia de COVID-19. Ao contrário do SARS-Cov2, que se manifesta por um aumento repentino de sintomas respiratórios atípicos graves e monitorados diariamente em cada país do mundo, a disseminação de genes de resistência é silenciosa, principalmente em portadores não sintomáticos, pois não está associada a doenças específicas ou sintomas imediatos. No entanto, uma vez na população, os genes de resistência são difíceis ou impossíveis de controlar ou erradicar. Eles permanecem em bactérias comensais em humanos e animais, representam uma fonte para novos surtos, em particular, doenças adquiridas na comunidade.

3. 3 LISTA DE BACTÉRIAS DE PRIORIDADE CRÍTICA

A Organização Mundial da Saúde (OMS) desenvolveu a lista de prioridade global de bactérias resistentes aos antibióticos, com o intuito de orientar a pesquisa, descoberta e desenvolvimento de novos antibióticos. A lista foi dividida em três categorias: prioridade crítica, alta e média (Figura 2), partindo-se de dez critérios de seleção: mortalidade, prevalência da resistência aos antimicrobianos, tendência da resistência de 10 anos, cuidados de saúde e carga comunitária, transmissibilidade, evitabilidade (hospitalar e comunitária), tratabilidade e fluxo atual (OMS, 2017).

Na categoria de maior importância, a de prioridade crítica, estão as espécies bacterianas *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* resistentes antibióticos da classe dos carbapenêmicos. Além dessas espécies, todas bactérias pertencentes à família das *Enterobacteriaceae* (também chamadas de enterobactérias) resistentes a carbapenêmicos e cefalosporinas de 3ª geração são categorizadas como patógenos de prioritários para o desenvolvimento de pesquisa e novos medicamentos.

Embora as enterobactérias sejam microrganismos comensais, possuem potencial para se tornar um patógeno oportunista e causar diversas infecções graves em humanos (infecções do trato urinário, septicemia, pneumonia, etc.). Além de contribuírem para o aumento da resistência antimicrobiana, por meio de mutações em

genes específicos ou transferência horizontal de genes que codificam mecanismos de resistência (TOOMBS-RUANE *et al.*, 2017). Por essa razão, nosso estudo avaliou exclusivamente espécies bacterianas pertencentes à essa família.

FIGURA 2 – Lista de patógenos prioritários para Pesquisa e Desenvolvimento (P&D) de novos antibióticos

P R I O R I D A D E	C R Í T I C A	#
		1
2	A L T A	<p><i>Enterococcus faecium</i>, vancomicina-resistente</p> <p><i>Staphylococcus aureus</i>, meticilina-resistente, vancomicina-intermediária/resistente</p> <p><i>Helicobacter pylori</i>, claritromicina-resistente</p> <p><i>Campylobacter</i>, fluoroquinolona-resistente</p> <p><i>Salmonella spp.</i>, fluoroquinolona-resistente</p> <p><i>Neisseria gonorrhoeae</i>, 3ª geração cefalosporina-resistente, fluoroquinolona-resistente</p>
		3

Micobactérias (incluindo *Mycobacterium tuberculosis*), não foram submetidas a revisão para inclusão, pois já é uma prioridade estabelecida globalmente . * *Enterobacteriaceae*: *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterobacter spp.*, *Serratia spp.*, *Proteus spp.*, *Providencia spp.*, *Morganella spp.*

Fonte: Adaptado de OMS (2017).

3. 4 LISTA DE ANTIMICROBIANOS DE IMPORTÂNCIA CRÍTICA

A OMS desenvolveu a Lista de Antimicrobianos de Importância Crítica em 2005, desde então, esse documento vem sendo atualizado e a 6ª edição de 2018 é a versão mais recente (OMS, 2019). Destinado a autoridades de saúde pública e outras partes envolvidos na gestão da resistência antimicrobiana de modo a garantir que todos antimicrobianos (especialmente os de importância crítica) sejam usados com prudência, tanto na medicina humana quanto na veterinária. Este documento deve ser usado como uma referência para auxiliar a formular e priorizar estratégias de gestão de risco para conter AMR. Todos os antimicrobianos utilizados na medicina humana são categorizados como: criticamente importante, altamente importante e, importante (Quadro 1).

QUADRO 1 – Categorias de importância dos antimicrobianos

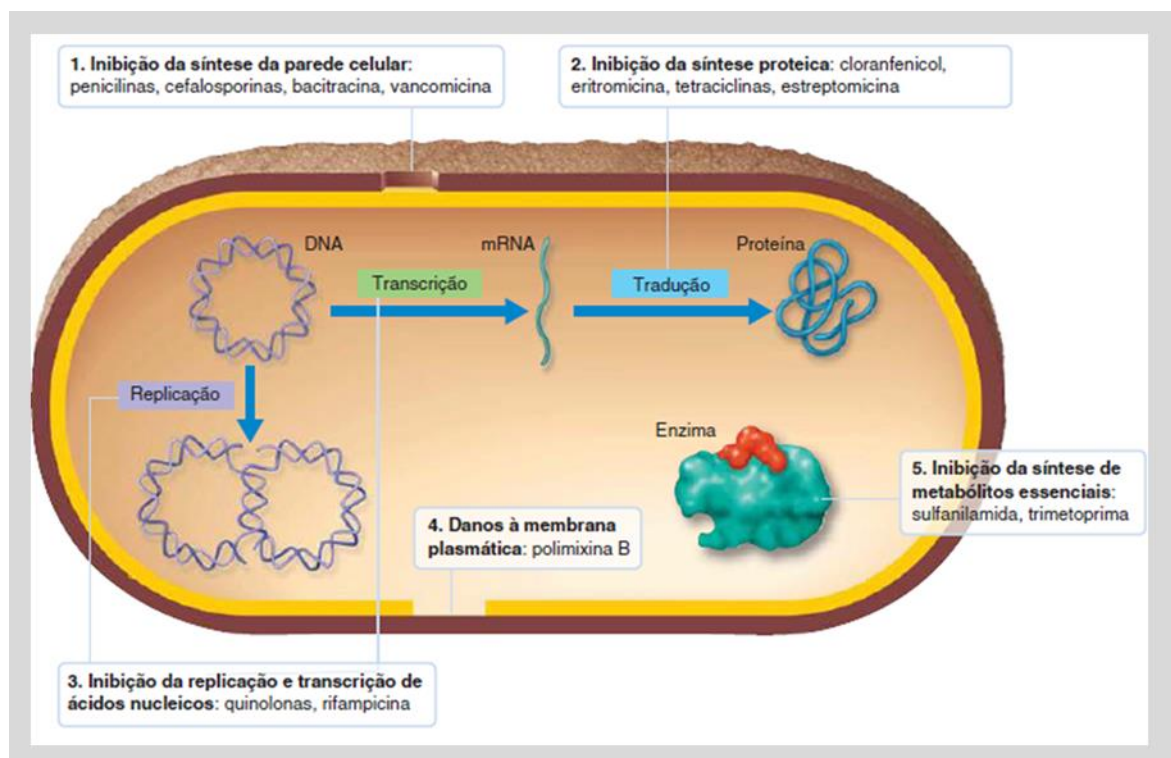
Classe antimicrobiana	Exemplo de antimicrobiano (s)
CRITICAMENTE IMPORTANTES	
Aminoglicosídeos	gentamicina
Ansamícinas	rifampicina
Carbapenênicos	meropenem
Cefalosporinas (3 ^a -5 ^a geração)	ceftriaxona, cefepime, ceftarolina, ceftobiprole
Glicopeptídeos	vancomicina
Glicilglicina	tigeciclina
Lipopeptídeos	daptomicina
Macrolídeos	azitromicina, eritromicina
Monobactâmicos	aztreonam
Oxazolidinonas	linezolida
Penicilina (antipseudomonal)	piperacilina
Aminopenicilinas	ampicilina
Aminopenicilina com inibidores de β -lactamases	amoxicilina-ácido clavulânico
Derivados de ácido fosfônico	fosfomicina
Polimixinas	colistina
Quinolonas	ciprofloxacina
Drogas para doenças causadas por micobactérias	isoniazida
ALTAMENTE IMPORTANTES	
Anfenicóis	cloranfenicol, tianfenicol
Cefalosporinas (1 ^a e 2 ^a geração) e cefamicinas	cefazolina
Lincosamidas	clindamicina
Penicilina (amidopenicilina)	mecillinam
Penicilina (antiestafilocócicas)	flucloxacilina
Penicilina (espectro estreito)	benzatina-benzilpenicilina, fenoximetilpenicilina
Ácidos pseudomônicos	mupirocina
Riminofenazinas	clofazimina
Antibacterianos esteróides	ácido fusídico
Estreptograminas	quinupristina/dalfopristina
Sulfonamidas e combinações	sulfamethoxazole, trimetoprim
Sulfonas	dapsona
Tetraciclina	clortetraciclina
IMPORTANTES	
Aminociclitóis	espectinomomicina
Polipeptídeos cíclicos	bacitracina
Derivados de nitrofurantoína	nitrofurantoína
Nitroimidazoles	metronidazol
Pleuromutilinas	retapamulina

Fonte: Adaptado de OMS (2019).

3. 5 MECANISMOS DE AÇÃO DE FÁRMACOS ANTIBACTERIANOS

Fármacos antibacterianos podem ser antibióticos ou quimioterápicos, na prática, usualmente ignora-se essa distinção, no entanto, antibióticos são substâncias produzidos por microrganismos (*e. g.* penicilina, o primeiro antibiótico desenvolvido através de observações realizadas por Alexander Fleming, em 1928), enquanto, quimioterápicos são totalmente sintéticos (*e. g.* sulfa, descoberta em 1927) (TRABULSI; ALTERTHUM, 2015; TORTORA; FUNKE; CASE, 2017). O diferencial do tratamento antimicrobiano é a toxicidade seletiva, capacidade de atuar sobre a bactéria, causando sua morte (bactericida) ou inibindo seu crescimento (bacteriostático), sem causar danos ao hospedeiro. Esses fármacos podem apresentar diferentes mecanismos de ação, a Figura 3 apresenta os principais mecanismos utilizados.

FIGURA 3 – Principais mecanismos de ação dos fármacos antibacterianos



Fonte: Tortora, Funke e Case (2019. p. 551).

Dos fármacos antibacterianos que atuam na inibição da síntese de parede celular, os mais utilizados são os β -lactâmicos, nomeados assim por atuarem sobre o

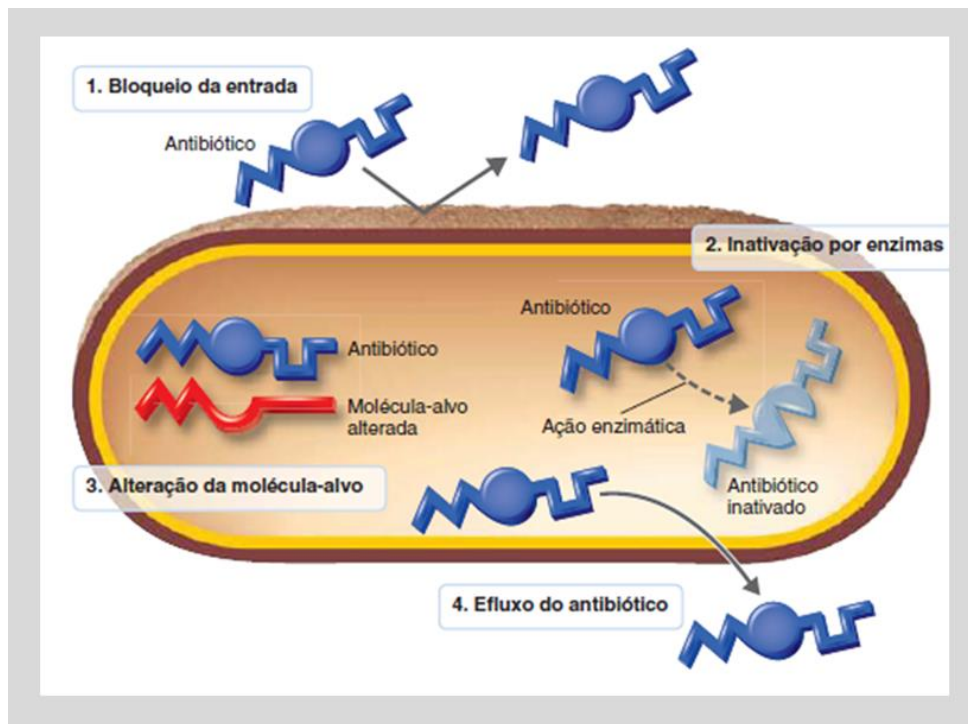
anel β -lactâmico, componente estrutural de antibióticos de diversas classes (*e. g.* penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos, monobactâmicos). A inibição da síntese proteica ocorre na organela ribossomo, podendo ser na subunidade 30S (S, Svedberg) ou 50S. A inibição da síntese de ácidos nucleicos ocorre pela atuação sobre a enzima DNA girase (impedindo a replicação do DNA) ou sobre a enzima RNA polimerase (impedindo a síntese de RNA). O mecanismo de danos à membrana plasmática altera a permeabilidade da bactéria, levando à perda de metabólitos. Por fim, a inibição de metabólitos essenciais ocorre por interrupção de vias fundamentais para posterior síntese de precursores de DNA e RNA, devido os fármacos serem análogos estruturais de substâncias necessárias para via, ocorre inibição competitiva (TRABULSI; ALTERTHUM, 2015; MADIGAN *et al.*, 2016; TORTORA; FUNKE; CASE, 2017).

3. 6 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA DE BACTÉRIAS

Com o surgimento de fármacos antimicrobianos, também surgiram bactérias resistentes a esses fármacos. As bactérias resistentes apresentam alguma diferença genética em comparação às bactérias sensíveis, originadas de mutações aleatórias ou transmitidas por outras bactérias (transmissão horizontal), geralmente através de compartilhamento de genes por conjugação de plasmídeos, transformação, transdução e transposons. Bactérias resistentes a vários antibióticos são denominadas multirresistentes, superbactérias ou MDR. Os principais mecanismos de resistência aos antimicrobianos são: bloqueio de entrada do fármaco, como modificação das porinas para impedir que os antibióticos entrem na bactéria; inativação por enzimas, como a produção de β -lactamases (enzimas que degradam o anel β -lactâmicos de antibióticos); alteração de molécula-alvo, pequenas modificações em sítios alvos podem neutralizar os antibióticos; efluxo do antibiótico, as bactérias normalmente possuem proteínas de membrana capazes de ejetar substância tóxicas para o meio externo da célula (TORTORA; FUNKE; CASE, 2017). (Figura 4) (Quadro 2).

3. 7 LEGISLAÇÃO E DADOS HOSPITALARES

Os hospitais são potenciais disseminadores de bactérias multirresistentes por meio de diferentes formas. Primeiro por ser uma área de alta concentração de pacientes com infecções bacterianas. Segundo porque as excretas dos pacientes com

FIGURA 4 – Principais mecanismos de resistência aos antimicrobianos

Fonte: Tortora, Funke e Case (2019 p. 570).

QUADRO 2 – Mecanismos de resistência e suas características

Mecanismo de resistência	Exemplo de antibiótico	Base genética da resistência	Mecanismo presente em:
Redução da permeabilidade	Penicilinas	Cromossômica	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Bactérias entéricas</i>
Inativação do antibiótico e. g. : β -lactamases; enzimas modificadoras, tais como metilases, acetilases, fosforilases e outras	Penicilinas Cloranfenicol Aminoglicosídeos	Plasmidial e cromossômica Plasmidial e cromossômica Plasmidial	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Bactérias entéricas</i> <i>Neisseria gonorrhoeae</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Bactérias entéricas</i> <i>Staphylococcus aureus</i>
Alteração do alvo e. g. : RNA-polimerases, rifamicina; ribossomo, eritromicina e estreptomicina; DNA-girase, quinolonas	Eritromicina Rifamicina Estreptomicina Norfloxacina	Cromossômica	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Bactérias entéricas</i> <i>Bactérias entéricas</i> <i>Bactérias entéricas</i> <i>Staphylococcus aureus</i>
Efluxo (bombeamento para fora da célula)	Tetraciclina Cloranfenicol Eritromicina	Plasmidial Cromossômica Cromossômica	<i>Bactérias entéricas</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Staphylococcus</i>

Fonte: Adaptado de Madigan *et al.* (2016. p. 820).

as mais variadas infecções bacterianas podem conter ARB, adicionalmente, as excretas dos pacientes que fazem uso de antibioticoterapia podem aumentar a

pressão seletiva no esgoto que as recebe, como descrito por Almakki *et al.* (2019) que reportaram que até 90% dos antibióticos podem ser excretados nas fezes e na urina.

Dias *et al.* (2021) realizaram um levantamento das bactérias presentes nos resíduos líquidos, provenientes de cirurgias infectadas, frequentemente lançados na rede de esgoto (Figura 5). Esse estudo analisou amostras de um hospital terciário de Uberlândia, MG, no período de 2015 a 2019. Como resultado, encontraram 361 cepas MDR (*e. g. Staphylococcus aureus, K. pneumoniae, Acinetobacter baumannii, E. coli, Serratia marcescens, Pseudomonas aeruginosa, etc.*), alertando para a necessidade da implementação de protocolos de descarte adequado para os resíduos líquidos infectados do hospital, com a finalidade de evitar disseminação de bactérias potencialmente patogênicas e MDR nas estações de esgoto e, conseqüentemente, em bacias hidrográficas.

FIGURA 5 – Descarte de resíduos de Serviço de Saúde em sistema de esgoto municipal. A) Recipientes contendo o material coletado após uma cirurgia de grande porte. B) Descarte de resíduos líquidos coletados em diferentes cirurgias realizadas em hospital terciário de Uberlândia



Fonte: Dias (2021).

Embora os resíduos provenientes de cirurgias mencionados anteriormente, sejam resíduos líquidos, eles se enquadram como resíduos sólidos quando contidos em recipientes. Podendo, assim, seguir uma destinação final ambientalmente adequada, conforme a Lei nº 12.305, de 2 de agosto de 2010, regulamentada pelo decreto Nº 10.936, de 12 de janeiro de 2022, que institui a Política Nacional de Resíduos Sólidos (PNRS). No art. 3º, inc. XVI o resíduo sólido é definido como:

Material, substância, objeto ou bem descartado resultante de atividades humanas em sociedade, a cuja destinação final se procede, se propõe

proceder ou se está obrigado a proceder, nos estados sólido ou semissólido, bem como gases contidos em recipientes e líquidos cujas particularidades tornem inviável o seu lançamento na rede pública de esgotos ou em corpos d'água, ou exijam para isso soluções técnica ou economicamente inviáveis em face da melhor tecnologia disponível (BRASIL, 2010, [n.p.]).

Os RSS são definidos em categorias em função do risco associado, a RDC 222/2018 em seu art. 3º define cinco grupos (A-E), sendo o primeiro desses o Grupo A: “resíduos com a possível presença de agentes biológicos que, por suas características, podem apresentar riscos de infecção” (BRASIL, 2018, [n.p.]). A categorização em grupos e subgrupos auxilia a gestão dos RSS, desde seu acondicionamento, transporte, tratamento e descarte ambientalmente adequado.

A Resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) nº 430, de 13 de maio de 2011, complementa a Resolução nº 357 de, de 17 março de 2015. Dispõe sobre as condições, parâmetros, padrões e diretrizes para a gestão do lançamento de efluentes em corpos receptores (BRASIL, 2011). O capítulo II, seção II, dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes e a seção III dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes de sistemas de tratamento de esgoto sanitário.

A Resolução - RDC da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) 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 (EAS). O item 7. 1. 3 discorre sobre o lançamento externo de EAS:

Caso a região onde o EAS estiver localizado tenha rede pública de coleta e tratamento de esgoto, todo o esgoto resultante desse pode ser lançado nessa rede sem qualquer tratamento. Não havendo rede de coleta e tratamento, todo esgoto terá que receber tratamento antes de ser lançado em rios, lagos, etc. (se for o caso). (BRASIL, 2002, [n.p.]).

No entanto, como já mencionado, os dados em relação a efetuação do tratamento prévio do esgoto, por parte dos hospitais localizados em municípios sem rede pública de coleta e tratamento não estão bem estabelecidos.

Segundo a Confederação Nacional de Saúde (CNSaúde) e Federação Brasileira de Hospitais (FBH) o número de hospitais brasileiros em janeiro de 2022 é de 7191, sendo 4466 de hospitais privados (59% com fins lucrativos e 41% sem fins lucrativos), a maioria localizada na região sudeste, especialmente em São Paulo e Minas Gerais. Os 2725 restantes, são hospitais públicos (CNSaúde, 2022). Nenhum

dado atual, ou de anos anteriores, sobre o percentual de hospitais e seus respectivos níveis de atenção à saúde foi encontrado na literatura. Entretanto, é possível obter uma noção semelhante ao observar o percentual de hospitais em relação à sua quantidade de leitos, onde a quantidade inferior ou igual a 50 leitos se assemelha às condições do hospital secundário deste estudo. Quantidades entre 51 e 150 leitos se assemelham ao hospital terciário. Nos hospitais privados brasileiros, 59% possuem um número igual ou inferior a 50 leitos e 32,6% possuem de 51 a 150 leitos; no estado de São Paulo o percentual encontrado é de 50,3% e 36,7%, respectivamente; já em Minas Gerais o percentual é de 60,9% e 32,4% (CNSaúde, 2022). Segundo Souza *et al.* (2019), 78% dos estabelecimentos hospitalares vinculados ao Sistema Único de Saúde (SUS) possuem menos de 50 leitos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 FONTE DAS AMOSTRAS

As amostras foram coletadas de esgotos hospitalares de dois hospitais: (a) hospital de nível secundário de atenção à saúde, município de Ribeirão Preto, São Paulo (Figura 8). O hospital funciona numa construção moderna, ampla e com rígido controle de qualidade, possui infraestrutura física que comporta 30 leitos de enfermaria, dois leitos complementares de neonatal, três salas cirúrgicas, maternidade com sala de aleitamento, realizando em média 4 mil consultas, 200 cirurgias de médio e pequeno porte e 90 partos por mês; (b) hospital de nível terciário de atenção à saúde, Uberlândia, Minas Gerais. O hospital possui capacidade de 520 leitos para internações e é considerado referência para o estado de Minas Gerais, atende várias especialidades, área cirúrgica, internação clínica, seguimento ambulatorial e no atendimento emergencial.

Os hospitais foram selecionados devido seus diferentes níveis de atenção à saúde, conseqüentemente, suas diferenças em relação a quantidade de pacientes atendidos, número de leitos e complexidade das cirurgias realizadas. A priori, amostras de esgoto pertencente a um EAS de nível primário de atenção à saúde também seriam analisadas, no entanto, a chegada da pandemia de COVID-19 impossibilitou o acesso a novas coletas.

4.2 COLETA E ARMAZENAMENTO

As amostras de esgoto do hospital de Ribeirão Preto e Uberlândia foram coletadas em nove de maio de 2019 e nove de dezembro de 2019, respectivamente, utilizando materiais e recipientes esterilizados. As amostras foram coletadas nos pontos receptores da saída de esgoto de ambos hospitais, a caixa de passagem, local onde todos os efluentes se convergem (a Figura 6 mostra a caixa de passagem do esgoto hospitalar secundário), duas coletas equidistantes (30 cm) de 150 ml de esgoto foram transferidas para um frasco reagente (Laborglas, Brasil), totalizando uma amostra com 300 ml de esgoto para cada hospital. Após a coleta, as amostras foram acondicionadas em gelo durante o transporte para o laboratório.

Após homogeneizar as amostras, visando manter estoques das culturas obtidas para futuros estudos e garantir a viabilidade do material coletado, alíquotas de

FIGURA 6 – Coleta das amostras no hospital secundário de Ribeirão Preto, SP. A) Caixa de passagem do esgoto. B) Interior da caixa de passagem



Fonte: Autor, 2019.

8 ml foram transferidas para tubos cônicos Falcon de 15 ml e, em seguida, centrifugados durante 10 min / 3.000 giros (Eppendorf 5804R, Alemanha) conforme adaptação de Resende (2009). O sobrenadante foi descartado e o *pellet* formado foi ressuspensionado em 5 ml do meio de cultura líquido *Brain Heart Infusion* (BHI) (Oxoid, Reino Unido); incubadas por 18 horas na temperatura de 35° C. Posteriormente, as amostras receberam glicerol na concentração de 15% para a crioproteção e, por fim, as amostras foram estocadas em ultrafreezer à -80° C (Figura 7).

4. 3 ISOLAMENTO DAS BACTÉRIAS

Para o isolamento das bactérias, as amostras de esgoto foram filtradas utilizando-se a técnica de membrana filtrante, adaptado de Mara (1974), utilizando sistemas descartáveis de filtração à vácuo (KASVI) com membrana de poros de 0,22 µm (Figura 8). Após a filtração, as membranas foram introduzidas em tubos cônicos Falcon contendo 10 ml de água autoclavada e submetidas ao vórtex (Vortex AV-2,

FIGURA 7 – Armazenamento das amostras bacterianas. A) Criotubos contendo as culturas das amostras, meio de cultura e 15% glicerol. B) Ultrafreezer -80° C



Fonte: Autor, 2019.

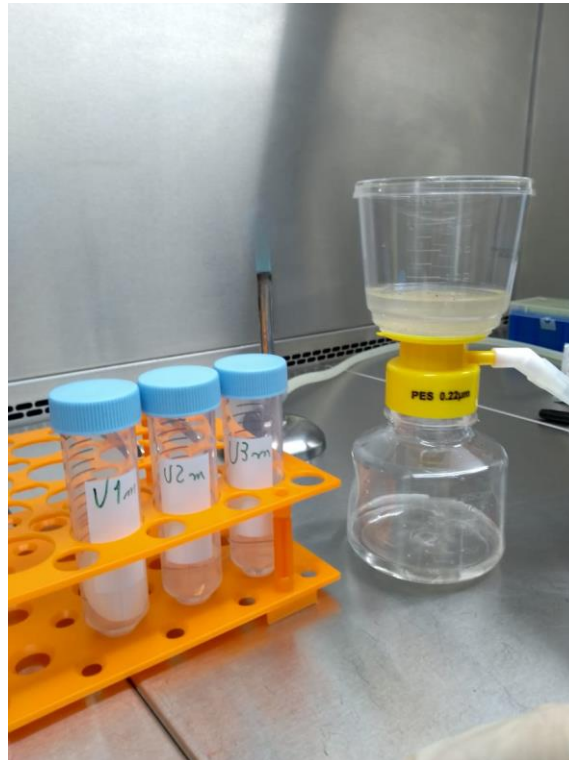
Gehaka, Brasil), sob velocidade máxima, por 30 segundos, repetindo o processo por três vezes.

Em seguida, visando a obtenção de colônias isoladas, foi realizada diluição seriada para obtenção de diferentes concentrações de cada amostra (1/10, 1/100, 1/1000, 1/10.000, 1/100.000 e 1/1.000.000), as diluições foram semeadas por espalhamento uniforme de 0,1 ml da amostra utilizando-se alça de Drigalsky (técnica *Spread-plate*) no meio de cultura ágar MacConkey (MC) (Oxoid, Reino Unido) (Figura 9), que permite selecionar bacilos Gram-negativos e verificar a fermentação ou não da lactose. Utilizar MC nesta etapa do isolamento foi uma escolha estratégica baseada no objetivo de selecionar bactérias da família *Enterobacteriaceae*.

Após a incubação das placas por 18 horas na temperatura de 35° C, colônias isoladas de diferentes morfologias foram selecionadas e novamente semeadas em ágar Mueller Hinton (MH) (Oxoid, Reino Unido) para isolamento e obtenção de culturas puras (Figura 10) e, em seguida, incubadas nas mesmas condições por 18 horas. As culturas isoladas foram então estocadas em 2 ml de meio de cultura BHI líquido,

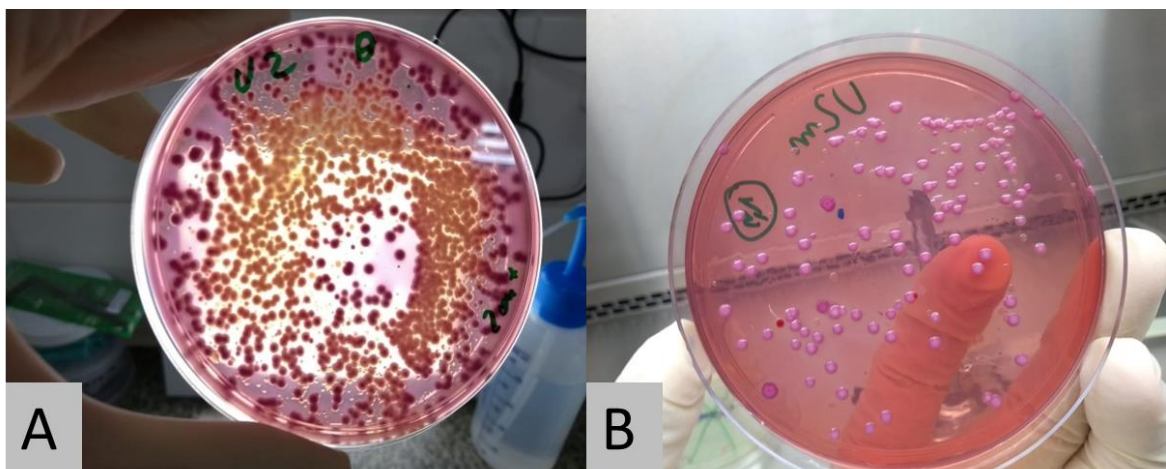
acrescido de 15% de glicerol em ultrafreezer à -80°C , para manter a viabilidade das células bacterianas e serem utilizadas nos próximos experimentos.

FIGURA 8 – Técnica de membrana filtrante



Fonte: Autor, 2019.

FIGURA 9 – Culturas bacterianas mistas provenientes da técnica de diluição seriada em ágar MacConkey. A) Concentrado. B) Diluído



Fonte: Autor, 2019.

FIGURA 10 – Culturas bacterianas puras em ágar Mueller Hinton. A) Exemplos. B) A seta aponta para cultura com características morfológicas de *Serratia* spp. C) A seta aponta para cultura com características morfológicas de *Pseudomonas* spp.



Fonte: Autor, 2019.

4. 4 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS BACTERIANOS

Os isolados bacterianos foram submetidos à identificação das espécies pela técnica de MALDI-TOF-MS (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry*), determinando o peso molecular das proteínas ribossômicas (< 500000 Dalton) por um pulso de laser 260-337 nm (KARAS; HILLENKAMP, 1988).

Após crescimento da bactéria em meio de cultura MH, as colônias isoladas foram coletadas e alocadas em um suporte de metal inoxidável, em locais pré-determinados, por meio de esfregaço. Posteriormente, 1 µL de uma solução matriz (Ácido-a-ciano-4-hidroxi-cinâmico) foi adicionado ao esfregaço e deixado secar em temperatura ambiente. Uma solução padrão de *E. coli* foi usada em alvo adjacente à bactéria teste, para ser utilizada como calibrador padrão do equipamento. Após a ação do laser, espectros foram gerados e analisados pelo sistema operacional MALDI *Biotyper Compass 1.4* e *Flex Control*, fornecidos pela empresa Bruker Daltonics Inc. Bremer, Alemanha (Figura 11). Os picos espectrais encontrados foram comparados com uma biblioteca fornecida pela empresa. Score com valores $\geq 1,7$ foram considerados para identificação em nível de gênero e espécie para as bactérias (TEKIPPE *et al.*, 2013).

FIGURA 11 – Equipamento MALDI-TOF-MS (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry*) (Bruker Daltonics)



Fonte: <https://www.bruker.com/pt/products-and-solutions/mass-spectrometry/maldi-tof.html>. Acesso em: 20 jan. 2022.

4. 5 TESTE DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

O teste de sensibilidade aos antimicrobianos por disco-difusão foi realizado nos isolados pertencentes à ordem dos *Enteriobacteriales*, seguindo as recomendações do *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2020), utilizando 39 diferentes discos de antibióticos (Oxoid, Reino Unido e Sensifar, Brasil). Os antibióticos testados e suas respectivas concentrações foram: ácido nalidíxico (30 µg), amicacina (30 µg), ampicilina - sulbactam (10/10 µg), amoxicilina - clavulanato (20/10 µg), aztreonam (30 µg), cefaclor (30 µg), cefazolina (30 µg), cefepima (30 µg), cefixima (5 µg), cefoxitina (30 µg), cefotaxima (30 µg), cefotetan (30 µg), ceftarolina (30 µg), ceftazidima (30 µg), ceftriaxona (30 µg), cefuroxima (30µg), ciprofloxacina (5 µg), cloranfenicol (30 µg), doripenem (10 µg), doxiciclina (30 µg), ertapenem (10 µg), estreptomicina (10 µg), fosfomicina (200 µg), gentamicina (10 µg), imipenem (10 µg), lemeфлоxacina (10 µg), levofloxacina (5 µg), meropenem (10 µg), minociclina (30 µg), netilmicina (30 µg),

nitrofurantoina (300 µg), norfloxacin (10 µg), ofloxacin (5 µg), piperacilina - tazobactam (100/10 µg), sulfametazol - trimetoprim (23,75/1,25 µg), sulfonamida (300 µg), tetraciclina (30 µg), ticarcilina - clavulanato (75/10 µg), tobramicina (10 µg)). As linhagens *E. coli* ATCC® 25922 e ATCC® 35218, e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 foram utilizadas como controles deste experimento.

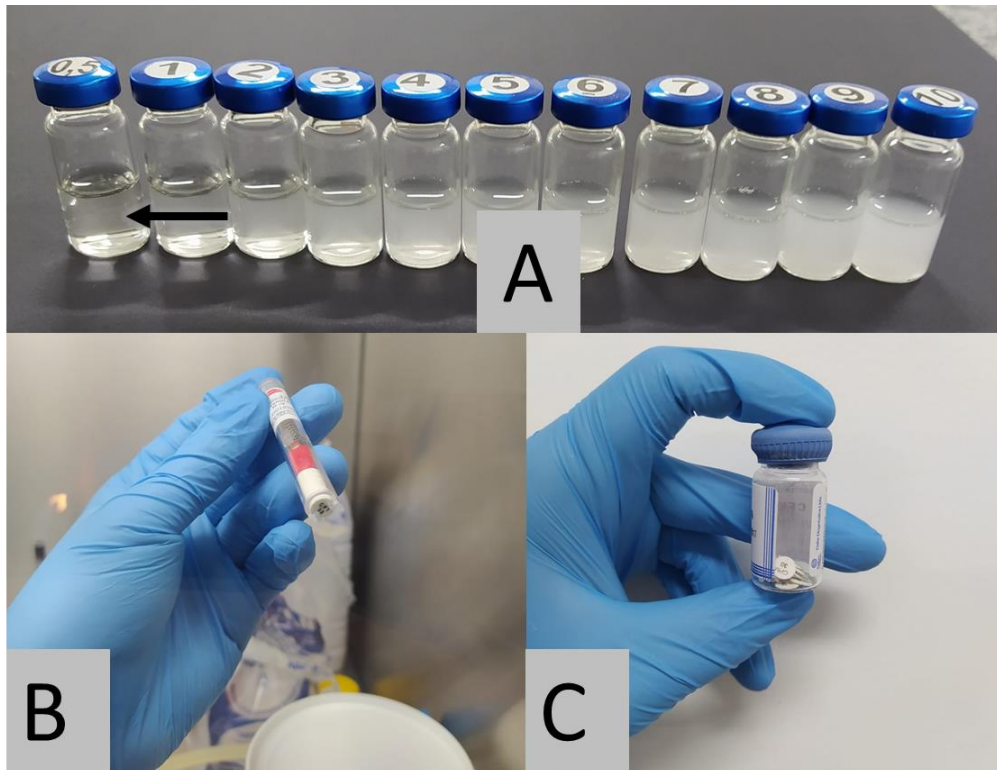
A técnica de disco-difusão, também conhecida como antibiograma, consistiu inicialmente em inocular uniformemente as bactérias analisadas (culturas frescas) sob a superfície das placas de Petri com ágar MH. Para padronizar as quantidades de inóculos aplicados, foram preparadas soluções de inóculos e salinas com a turbidez equivalente à escala 0,5 de McFarland (aproximadamente $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônias (UFC)/ml (Figura 12). Em seguida, discos de diferentes antibióticos (Figura 12) foram posicionados sob o ágar, com isso, os antibióticos impregnados nos discos iniciam seu processo de difusão, espalhando-se radialmente e tendo sua concentração diminuída conforme seu distanciamento dos discos. As placas contendo os inóculos bacterianos e os discos de antibióticos seguiram para incubação em estufa por 18 horas em temperatura de 37° C e, após esse período, observou-se a formação ou a ausência da formação de halos de inibição ao redor dos discos de antibióticos (Figura 13). O halo de inibição é a região onde não houve crescimento bacteriano, devido à concentração de antibiótico presente na região, o diâmetro dos halos foram utilizados para classificar as bactérias como não-susceptíveis, que englobaram as bactérias resistentes e resistentes intermediárias ou sensíveis aos antibióticos específicos (CLSI, 2020).

Com base nos resultados dos antibiogramas, os isolados bacterianos foram classificados como MDR, XDR (*extensively drug-resistant*) ou PDR (*pandrug-resistant*) de acordo com Magiorakos *et al.* (2012). Isolados apresentando não-susceptibilidade para um ou mais antibióticos em três ou mais categorias antimicrobianas, são denominadas MDR. Isolados apresentando não-susceptibilidade para um ou mais antibióticos em todas, porém, com exceção de uma ou duas categorias, são XDR. E, por fim, PDR é a classificação dada a isolados que possuam não-susceptibilidade em todos os antibióticos testados.

4. 6 PESQUISA DO FENÓTIPO DE HIPERMUCOVISCOSIDADE

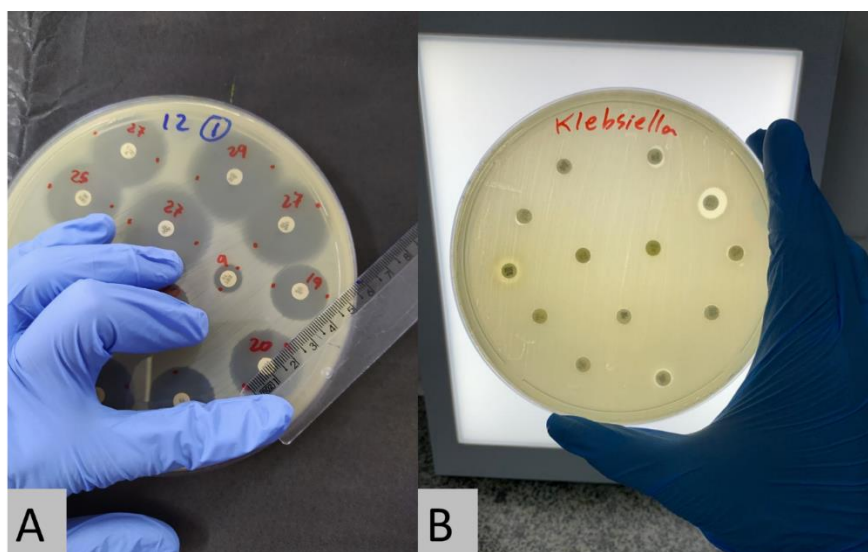
Para a detecção fenotípica de hipermucoviscosidade (HMV) os isolados de *K.*

FIGURA 12 – Materiais relacionados ao antibiograma. A) Escala de McFarland, a seta aponta para a turbidez 0,5. B) Cartucho contendo discos do antibiótico ceftarolina (Oxoid). C) Frasco contendo discos do antibiótico cefepime (Sensifar)



Fonte: Autor, 2020

FIGURA 13 – Teste de sensibilidade aos antimicrobianos por disco-difusão em ágar Mueller Hinton. A) Formação de halos de inibição com diâmetros relativamente largos. B) Formação de halos de inibição estreitos ou ausência de halos



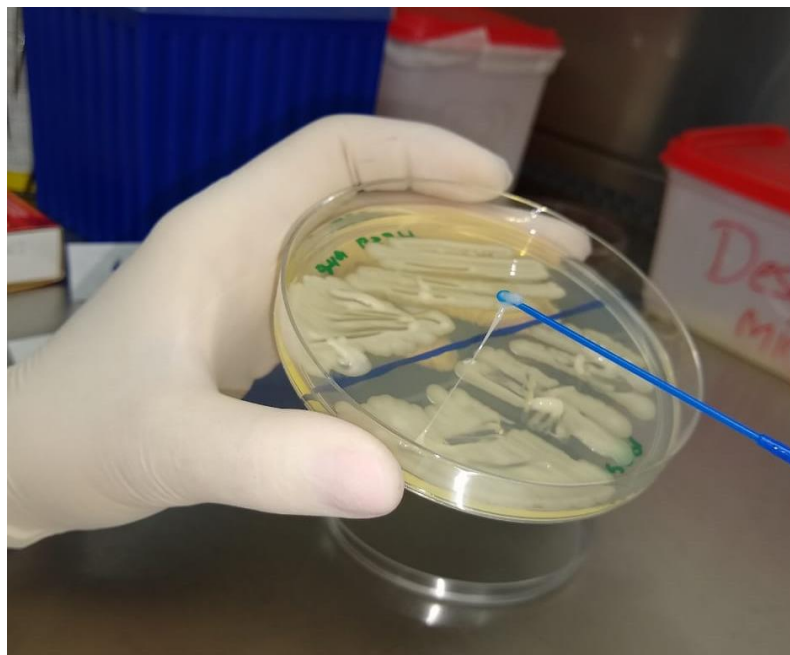
Fonte: Autor, 2020

pneumoniae foram inoculados em placas com ágar MH, incubados por 18 horas em temperatura de 37° C. Após o crescimento bacteriano, com auxílio de uma alça bacteriológica, uma colônia isolada foi tocada e levantada verticalmente. Quando ocorreu-se formação de um filamento viscoso ≥ 5 mm considerou-se como resultado positivo para hiper mucoviscosidade, conforme Wiskur, Hunt e Callegan (2008) (Figura 14).

4. 7 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO

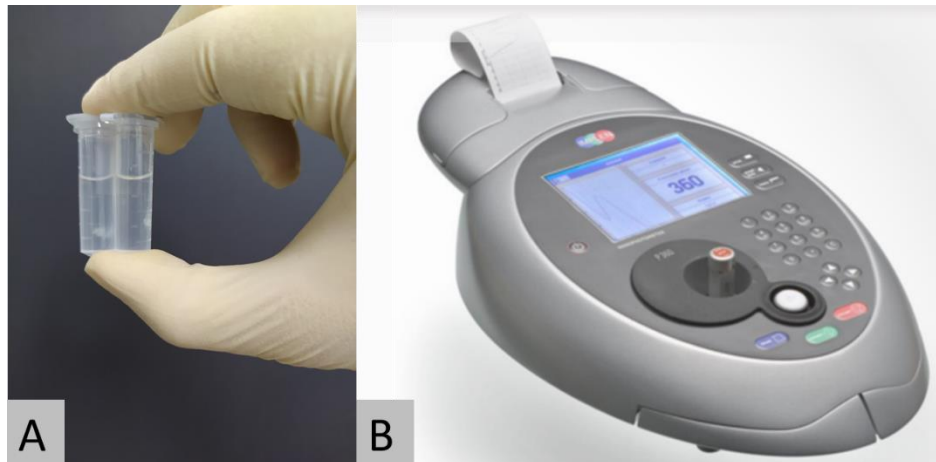
A extração do DNA genômico de todos os isolados foi realizada utilizando-se o método Fenol-Clorofórmio-Álcool Isoamílico, segundo Covone *et al.* (1998). Após a extração, a concentração e a pureza do DNA genômico foram determinadas por análise espectrofotométrica, pelo equipamento Nanofotometro P-Class P360 (Implen, Alemanha), empregando-se os comprimentos de onda de 260 e 280 nm. As extrações de DNA com razão entre 1,6 e 1,9 foram consideradas de boa qualidade, devido ao baixo nível de impurezas (*e. g.* proteínas, reagentes, *etc.*), assim, o DNA genômico obtido foi considerado apto a ser utilizado nas reações de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) somente quando atendessem a qualidade desejada (Figura 15).

FIGURA 14 – *K. pneumoniae* apresentando fenótipo de hiper mucoviscosidade



Fonte: Autor, 2020

FIGURA 15 – Extração e análise espectrofotométrica. A) Microtubos contendo o lisado bacteriano durante o processo de extração de DNA genômico. B) Equipamento Nanofotometro P-Class P360 (Implen)



Fonte: A) Autor, 2020. B) <https://www.implen.de/wp-content/uploads/2015/04/NanoPhotometer-P-Class-User-Manual-2.1.pdf>. Acesso em: 20 jan. 2022.

4. 8 DETECÇÃO DE GENES CODIFICADORES DE VIRULÊNCIA

Todos os isolados foram submetidos a ensaios de PCR para detecção e identificação de 11 genes de virulência, responsáveis por fenótipos tais como: adesinas, fímbrias do tipo 1 e 3, sideróforos, citotoxicidade, mucoviscosidade, α -hemolisinas, dentre outros, conforme descritos no Quadro 3. A metodologia foi executada conforme os autores referenciados na mesma tabela.

A técnica referida é amplamente utilizada em biologia molecular, trata-se da amplificação *in vitro* de segmentos específicos de DNA. Os segmentos específicos pesquisados no presente estudo são referentes a genes de virulência que podem estar presentes ou não nos DNAs genômicos (que inclui plasmídeos e cromossomo bacteriano) extraídos de cada amostra (Figura 16) (TRABULSI; ALTERTHUM, 2015).

As de reações de amplificação foram realizadas utilizando Taq DNA polimerase e respectivos reagentes, no Termociclador ProFlex PCR system (ThermoFisher) (Figura 17). Os principais reagentes foram: *primers* (iniciadores), oligonucleotídeos desenhados para se anelar em regiões específicas do DNA alvo, primordial para iniciar-se a construção de uma cópia do seguimento (extensão da fita); Taq DNA polimerase, enzima responsável pela extensão; dNTPs (*deoxynucleotide triphosphates*), com as bases nitrogenadas adenina (A), timina (T), guanina (G) e citosina (C) para compor as fitas copiadas; etc (Figura 16).

As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 25 µl, sendo: 15,55 µl de água ultrapura; 2,5 µl de tampão (10x) para PCR (Sigma-Aldrich, Estados Unidos); 1,75 µl de MgCl₂ (Sigma-Aldrich); 0,5 µl de dNTP (Sinapse, Brasil) (10 mM); 1 µl de *primer forward* e 1 µl de *primer reverse* (25 mM), 0,2 µl de Taq DNA polimerase (Sigma-Aldrich) e 2,5 µl de DNA alvo. As condições para a reação de amplificação no Termociclador foram: desnaturação inicial a 95° C por 2 minutos; seguido de 30 ciclos: 95° C por 1 minuto (desnaturação), X° C por 1 minuto (temperatura de anelamento) (Quadro 3) e 72° C por 2 minutos (extensão); após o término de todos os ciclos, 72° por 5 minutos para a extensão final. O produto de PCR é denominado *amplicon*.

Foram adicionadas três linhagens bacterianas portadoras dos genes como controles positivos e reações sem DNA foram incluídas como controles negativos. As linhagens pertencem a uma coleção bacteriana armazenada no Laboratório de Bacteriologia e Biologia Molecular (LABAC) e encontram-se estocadas a - 80° C, em meio BHI acrescido de glicerol 15%. Tratam-se de linhagens de *K. pneumoniae* denominadas como: Kp01 (portando *entB*, *mrkD*, *magA*, *rmpA*, *iutA*, K2 e *fimH*), Kp49 (*kfu*, *entB*, *mrkD*, *ybtS*, *allS*, *magA*, *rmpA*, *iutA*, *fimH* e *ycfM*) e NTUH (*kfu*, *entB*, *mrkD*, *ybtS*, *allS*, *magA*, *rmpA* e *ycfM*).

4. 8. 1 Eletroforese em Gel de Agarose

Para a visualização dos resultados dos *amplicons*, foi utilizado a técnica de eletroforese em gel de agarose. A técnica referida baseia-se na migração de biomoléculas eletricamente carregadas inseridas à uma matriz de gel submetida a um campo elétrico (REDDY; RAJU, 2012). Os *amplicons* foram inseridos em gel de agarose (1%) imerso em solução Tris-acetato-EDTA (TAE) (1%) dentro da cuba de eletroforese (Figura 18). Para que cada *amplicon* não se difunda pelo TAE, eles são homogeneizados junto ao *loading buffer* (tampão de carga), e aplicados em poços criados durante a confecção do gel. A cuba de eletroforese possui uma extremidade ligada a um eletrodo negativo e a outra a um positivo, como o DNA do *amplicon* possui carga negativa, ele migra conforme a passagem da corrente elétrica, indo do polo negativo para o positivo. Fragmento menores de DNA migram mais rápido do que maiores, por essa razão, foi possível saber se o tamanho do *amplicon* analisado, condiz com o tamanho do gene pesquisado, bastou-se utilizar um marcador de peso

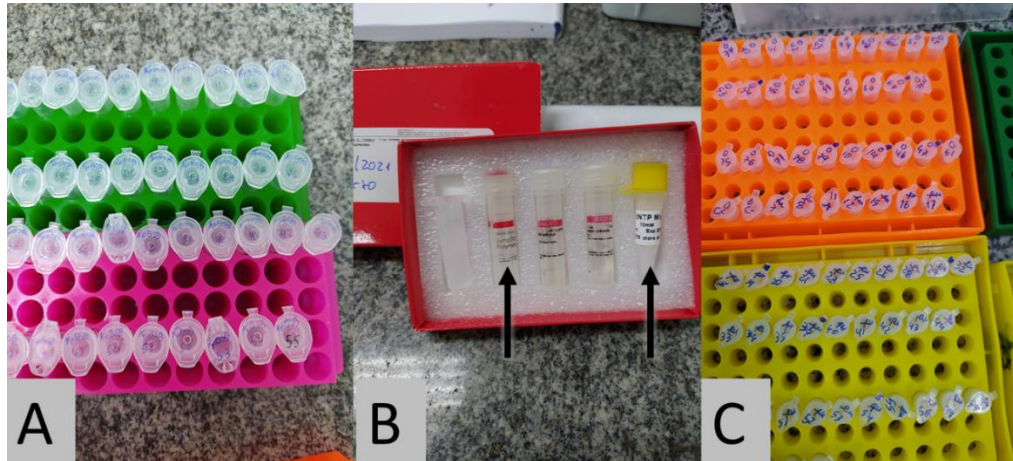
QUADRO 3 - Detalhamento dos genes de virulência pesquisados por PCR e respectivos *primers*. F, *primer forward*. R, *primer reverse*. pb, pares de base do produto. TA, temperatura de anelamento

Gene	Fenótipo	Primers (5'- 3', F/R)	TA (° C)	pb	Referência
<i>rmpA</i>	regulador de fenótipo mucóide	ACTGGGCTACCTCTGCTTCA CTTGCATGAGCCATCTTTCA	53	536	Yu <i>et al.</i> (2008)
<i>kfu</i>	sistema de absorção de ferro	GAAGTGACGCTGTTTCTGGC TTTCGTGTGGCCAGTGACTC	57	797	Ma <i>et al.</i> (2005)
<i>allS</i>	metabolismo de alantoína	CCGAAACATTACGCACCTTT ATCACGAAGAGCCAGGTCAC	57	508	Yu <i>et al.</i> (2008)
<i>fimH</i>	adesinas tipo 1	ATGAACGCCTGGTCCTTTGC GCTGAACGCCTATCCCCTGC	55	688	Fertas-Aissani <i>et al.</i> (2012)
<i>mrkD</i>	adesinas tipo3	CCACCAACTATTCCCTCGAA ATGGAACCCACATCGACATT	52	240	Sahly <i>et al.</i> (2008)
<i>ycfM</i>	lipoproteína de membrana externa	ATCAGCAGTCGGGTCAGC CTTCTCCAGCATTTCAGCG	55	160	Fertas-Aissani <i>et al.</i> (2012)
<i>entB</i>	biossíntese de enterobactina	ATTTCTCAACTTCTGGGGC AGCATCGGTGGCGGTGGTCA	57	371	Fertas-Aissani <i>et al.</i> (2012)
<i>iutA</i>	receptor de aerobactina	GGCTGGACATCATGGGAACTGG CGTCGGGAACGGGTAGAATCG	63	300	Mamlouk <i>et al.</i> (2006)
<i>ybtS</i>	biossíntese de yersinabactina	AGTGGTGCGTTCTGCGTC ATTTCTACATCTGGCGTTA	50	477	Fertas-Aissani <i>et al.</i> (2012)
K2	sorotipo capsular	CAACCATGGTGGTCGATTAG TGTTAGCCATATCCCTTTGG	50	531	Yu <i>et al.</i> , (2008)
<i>magA</i>	mucoviscosidade associado ao gene A	GGTGCTCTTTACATCATTGC GCAATGGCCATTTGCGTTAG	59	1282	Fang <i>et al.</i> , (2004)

Fonte: Autor, 2022.

molecular (*ladder*), o *ladder* possui diferentes fragmentos de tamanhos padronizados (Figura 19), possibilitando assim, a comparação dos tamanhos (o tamanho do DNA é dado conforme a quantidade de pares de bases). A tensão elétrica aplicada inicialmente foi de 60 volts por cinco minutos. Imediatamente após, 80 volts por 75 minutos.

FIGURA 16 – Materiais e reagentes de amplificação. A) Microtubos de 2 ml contendo DNA genômico dos isolados bacterianos, utilizados como DNA alvo. B) Reagentes da PCR, a seta esquerda aponta para a enzima DNA polimerase e a seta direita para os dNTPs. C) Microtubos de 0,2 ml contendo *amplicons*



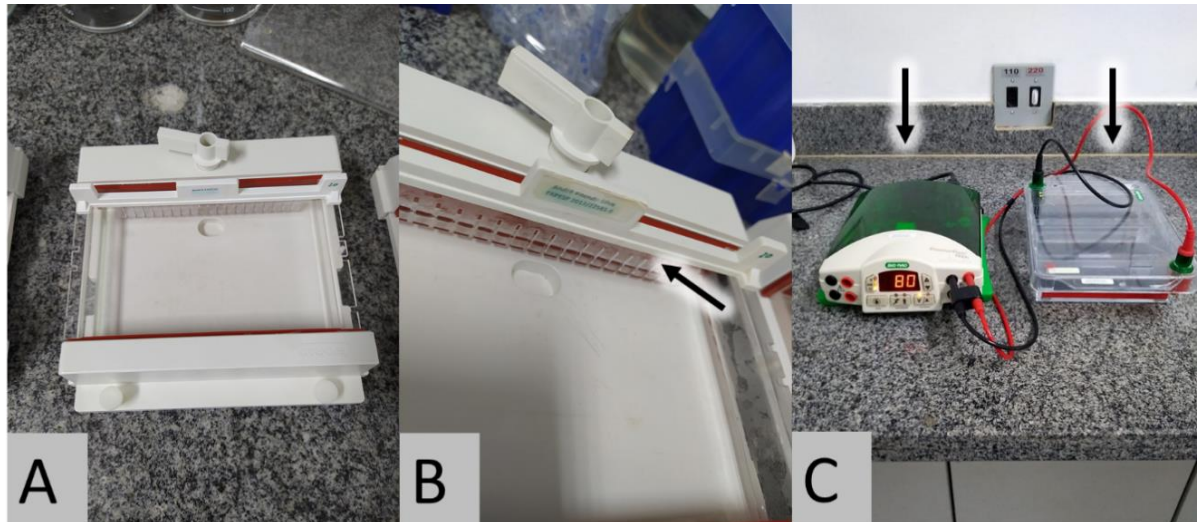
Fonte: Autor, 2020.

FIGURA 17 – Equipamento Termociclador ProFlex PCR system (ThermoFisher)



Fonte: Autor, 2020.

FIGURA 18 – Eletroforese em gel de agarose. A) Estrutura para confecção de gel de agarose. B) Gel de agarose em processo de solidificação. A seta aponta para o pente, estrutura removida após a solidificação do gel, formando os poços onde os *amplicons* são aplicados. C) A seta esquerda aponta para a fonte de energia (Bio-Rad). A seta direita para a cuba de eletroforese contendo o gel de agarose, o cabo preto é o polo negativo e o vermelho o positivo



Fonte: Autor, 2020.

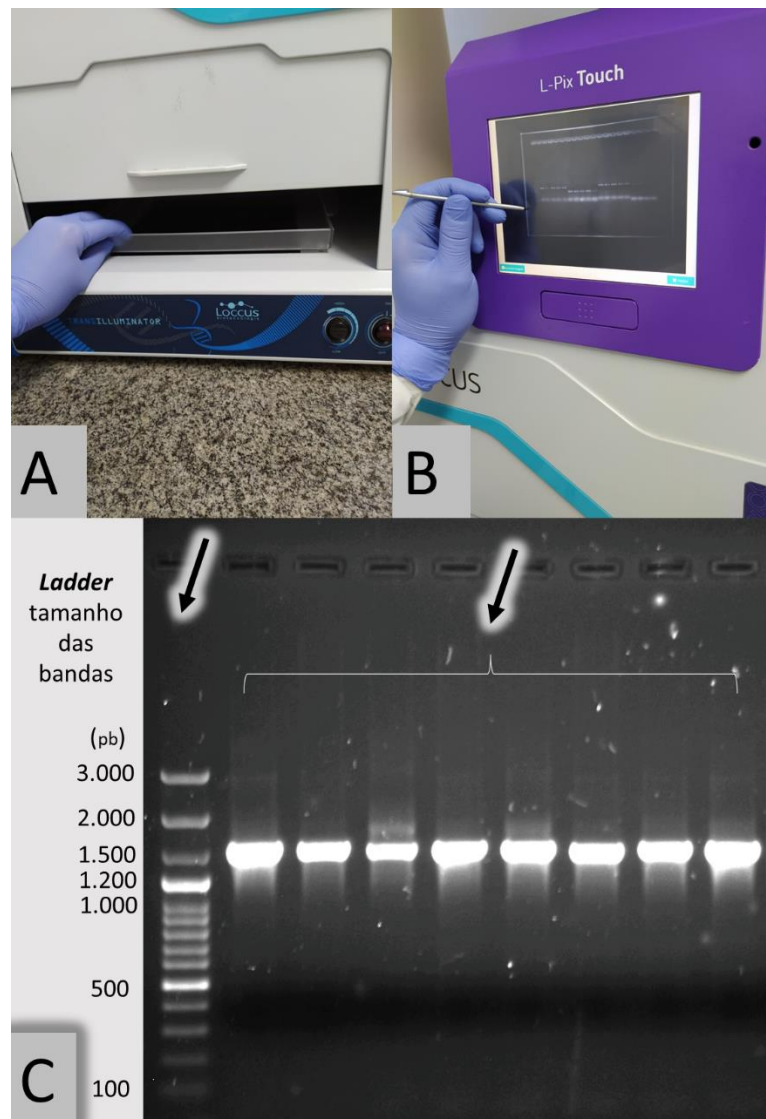
Para a visualização do DNA, o gel foi corado durante 10 minutos por imersão em solução de brometo de etídio (0,5 µg/ml), um corante fluorescente sob luz ultra violeta (UV) que se intercala entre as bases nitrogenadas do DNA (REDDY; RAJU, 2012). O equipamento Fotodocumentador L-PIX Touch (Loccus, Brasil) (Figura 20) foi utilizado para a visualização e registro fotográfico da posição das bandas de DNA presentes no gel de agarose (banda é o nome dado a região onde o *amplicon* cessou sua migração).

4. 8. 2 Sequenciamento

A técnica de sequenciamento Sanger foi utilizada com a finalidade de confirmar a identidade dos *amplicons* obtidos para cada gene amplificado, visto que, embora sugestivo, o tamanho do *amplicon* observado após a eletroforese nem sempre condiz com o gene esperado. Os *amplicons* dos genes detectados para os diferentes genes de virulência foram sequenciados utilizando-se os mesmos *primers* de amplificação. Os sequenciamentos foram realizados no Núcleo de Serviços em Biotecnologia do Hemocentro de Ribeirão Preto do campus da Universidade de São Paulo de Ribeirão Preto (<http://lgmb.fmrp.usp.br/nsb/>), empregando-se o sequenciador ABI 3500 XL Genetic Analyser (Applied Biosystems, Estados Unidos) (Figura 20). As sequências

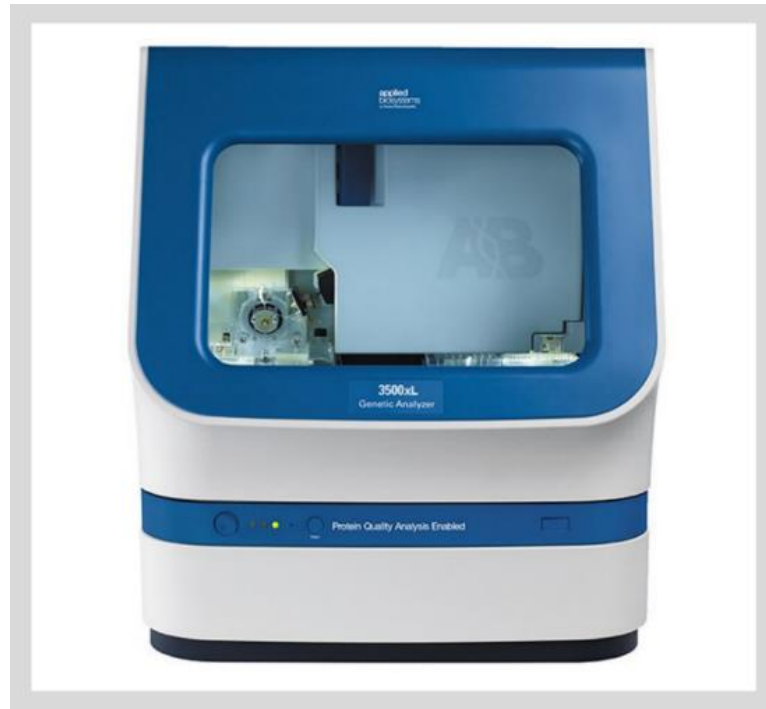
obtidas, também conhecidas por eletroferogramas (Figura 21) foram submetidos à consulta de similaridade de nucleotídeos por meio do programa BLAST, para comparação com sequências homólogas depositadas no bando mundial de dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) (Figura 22) (Figura 23).

FIGURA 19 – Equipamento para a captura da imagem do material amplificado. A) Parte inferior do Fotodocumentador (Loccus), mostrando a bandeja onde o gel corado é depositado para visualização sob luz UV. B) Parte superior do Fotodocumentador, mostrando a imagem do gel em tempo real. C) Foto de um gel e suas nove canaletas. A seta esquerda aponta para a canaleta com o *ladder*. A seta direita aponta para um conjunto de canaletas que receberam *amplicons* de diferentes bactérias, todas amplificaram bandas com aproximadamente 1.6000 pb (pares de bases)



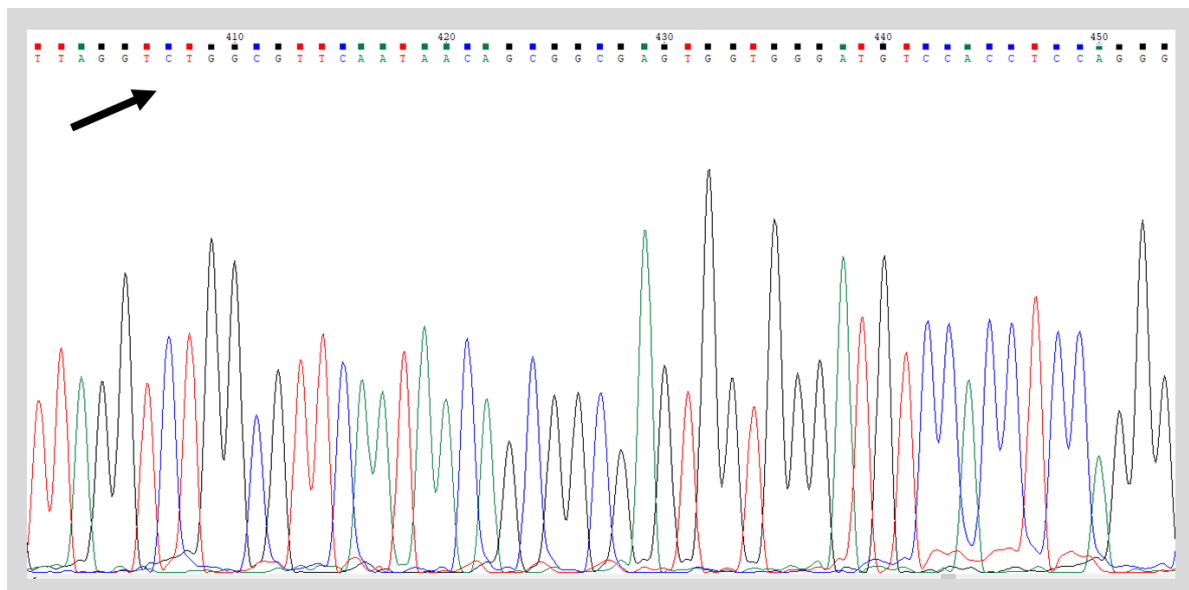
Fonte: Autor, 2020.

FIGURA 20 – Equipamento Sequenciador ABI3500 XL (Applied Biosystem)



Fonte: <https://emu.fmrp.usp.br/equipamentos/categoria2/applied-biosystems-3500/>. Acesso em: 20 jan. 2022.

FIGURA 21 – Eletroferograma (programa ChromasPro) obtido por sequenciamento Sanger, a seta aponta para parte da sequência de nucleotídeos resultante



Fonte: Autor, 2020.

FIGURA 22 – Procedimento de consulta de similaridade de nucleotídeos (programa BLAST), a seta aponta para a sequência inquirida

U.S. National Library of Medicine
National Center for Biotechnology Information

BLAST® » blastn suite

Standard Nucleotide BLAST

Enter Query Sequence

Enter accession number(s), gi(s), or FASTA sequence(s) [Clear](#)

Query subrange [?](#)

GGGGTGTTCCTCTCGGTGCTCGCCTACTACCGTTTATTTATATGCCGGTG
GCGGCCGTGCTGCGCCGCTCGATCCACCCCTGAAGATGTCGCCGCG
TCGCTGGGCACGCCCGCTGGAAAGTTCTTCCGGTGGTCTCCCG
CAGCTGCGTCTGGCAATCTGCGCGGTGCGCTGCTGGTGGCCCTGCAT

Or, upload file Nenhum arq... o selecionado [?](#)

Job Title

Enter a descriptive title for your BLAST search [?](#)

Align two or more sequences [?](#)

Reset page
Bookmark

New columns added to the Description Table
Click 'Select Columns' or 'Manage Columns'.

Fonte: Autor, 2020.

FIGURA 23 – Procedimento de consulta de similaridade de nucleotídeos (programa BLAST), a seta aponta para outras sequências encontradas no banco de dados, depositadas como o mesmo gene pesquisado e possuindo 100% similares à sequência inquirida

U.S. National Library of Medicine
National Center for Biotechnology Information

BLAST® » blastn suite » results for RID-WR31XY38016

Job Title: Nucleotide Sequence
RID: WR31XY38016
Program: BLASTN
Database: nt
Query ID: Id|Query_65219
Description: None
Molecule type: dna
Query Length: 578

Filter Results

Organism exclude
Percent Identity to
E value to
Query Coverage to

Sequences producing significant alignments

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Klebsiella pneumoniae strain K08410 iron transport and phosphotransferase function (kfu) gene, partial cds	Klebsiella pneu...	1088	1088	100%	0.0	100.00%	578	MH818578.1
<input checked="" type="checkbox"/> Klebsiella pneumoniae strain KpAm11 iron transport and phosphotransferase function protein (kfu) gene, cart...	Klebsiella pneu...	1084	1084	99%	0.0	100.00%	578	MT330314.1

Fonte: Autor, 2020.

5 RESULTADOS

O total de 63 isolados bacterianos foram obtidos das amostras coletadas de ambos os hospitais, no entanto, sete isolados não foram identificados pela técnica de MALDI-TOF. Permanecendo assim, o total de 56 isolados com espécies bacterianas identificadas.

5.1 ESGOTO DO HOSPITAL SECUNDÁRIO DE RIBEIRÃO PRETO

O total de 33 isolados bacterianos foi encontrado nas amostras coletadas do esgoto do hospital secundário localizado no município de Ribeirão Preto, SP. Dentre os 33 isolados, 28 pertencem à família *Enterobacteriaceae*, sendo a maioria da espécie *K. pneumoniae* (71,4%, n = 20), quatro *Serratia marcescens* (14,3%), duas *E. coli* (7,1%), uma *Citrobacter freundii* (7,1%) e uma *Raoutella ornithinolytica* (3,6%). Outros isolados identificados foram: *Pseudomonas nitroreducens*, *Burkholderia cenocepacia*, *Bacillus cereus* e *Stenotrophonas maltophilia* (um isolado de cada espécie, exceto para *S. maltophilia*, com dois isolados), como o foco do presente estudo é para membros das *Enterobacteriaceae*, nenhum dado relacionado a essas espécies foi apresentado.

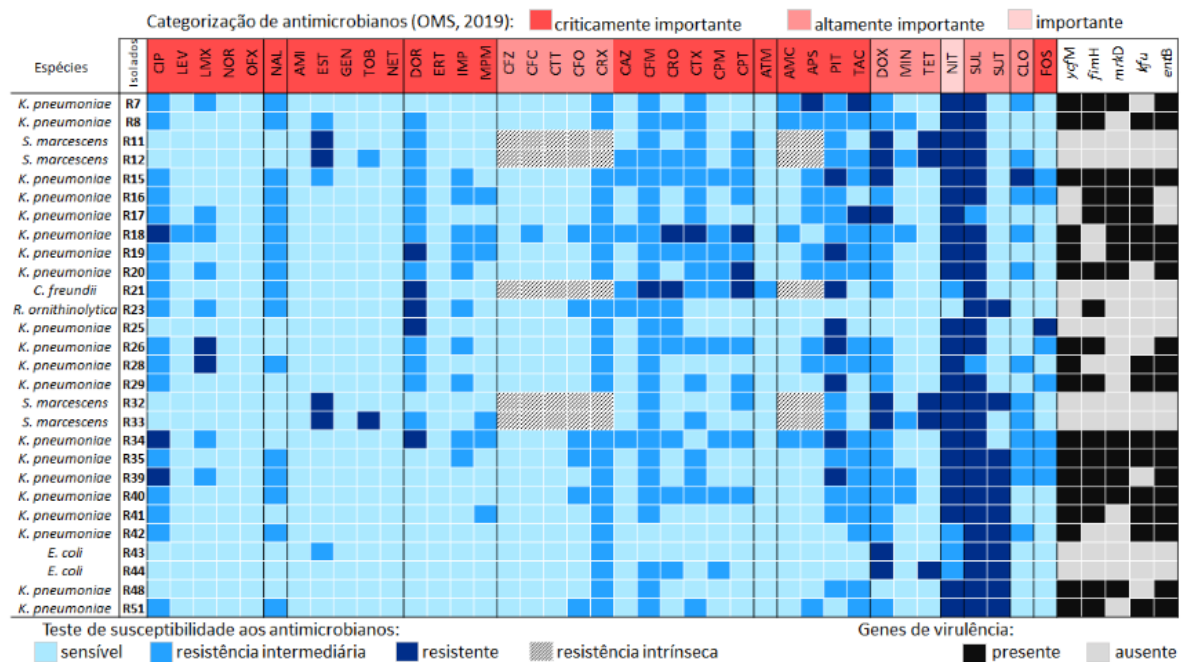
Os testes de susceptibilidade aos antimicrobianos demonstraram que todas enterobactérias apresentaram o perfil MDR. Os isolados *K. pneumoniae* R18, R34 e R15 apresentaram os maiores índices de não-susceptibilidade, apresentando resistência ou resistência intermediária para 61,5%, 53,8% e 51,1% dos 39 discos de antibióticos testados, respectivamente (Figura 24). O isolado *S. marcescens* R12 também demonstrou não-susceptibilidade a grande parte (50%) dos 32 discos de antibióticos. A quantidade de discos de antibióticos testados para *S. marcescens* e *C. freundii* foi menor devido à resistência intrínseca que essas espécies apresentam à sete dos antibióticos testados neste estudo (Figura 24). Todos os isolados apresentaram não-susceptibilidade aos antibióticos cefuroxima e sulfonamida, por outro lado, todos os isolados foram sensíveis a norfloxacin, ofloxacin, amicacina, gentamicina, netilmicina, ertapenem, cefazolina, cefaclor e cefotetan (Figura 24). A Figura 25 apresenta o percentual de cepas não-susceptíveis entre as cinco espécies bactérias encontradas.

Foram encontrados cinco diferentes genes de virulência detectados nas enterobactérias isoladas, sendo eles: *ycfM*, *fimH*, *mrkD*, *kfu* e *entB*. O gene *mrkD* foi

detectado em 42,9% das cepas, o gene *kfu* em 50% e os genes *fimH*, *ycfM* e *entB*, em mais da metade dos isolados, sendo 57,1%, 60,7% e 60,7%, respectivamente. Todos os genes encontrados estavam presentes apenas em *K. pneumoniae* e o *fimH* também foi detectado no isolado de *R. ornithinolytica*, conforme ilustrado na Figura 24. Um exemplar de cada gene encontrado foi aleatoriamente selecionado e as suas identidades foram confirmadas molecularmente pelo sequenciamento dos *amplicons* obtidos. As seqüências foram depositadas no GenBank, com exceção do *ycfM*, que possui um *amplicon* menor que 200 pb, sendo os números de acesso de OL373964 a OL373967.

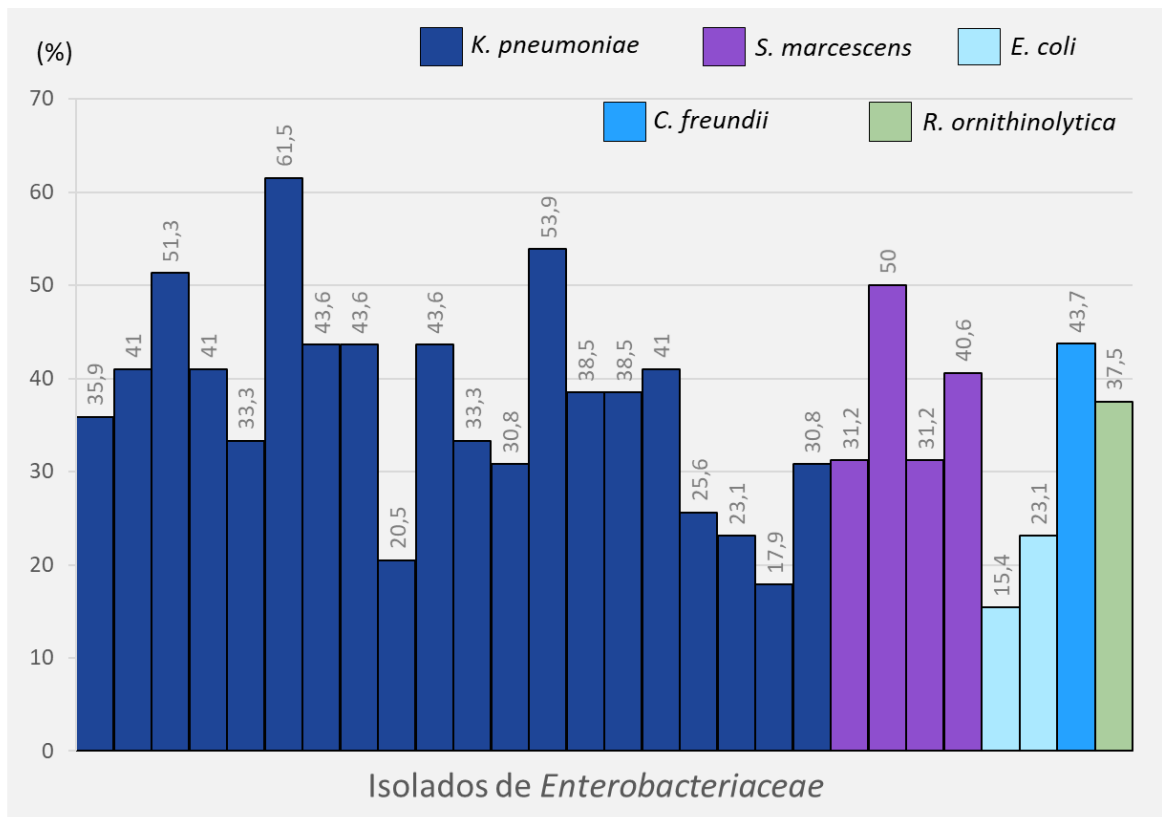
Nenhuma *K. pneumoniae* isolada do esgoto do hospital secundário de Ribeirão Preto expressou o fenótipo HMV.

FIGURA 24 – Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos e genes de virulência encontrados entre as 28 cepas multirresistentes de *Enterobacteriaceae* isoladas do esgoto hospitalar de Ribeirão Preto



Classes e antimicrobianos testados: fluoroquinolonas - ciprofloxacina (CIP), levofloxacina (LEV), lomefloxacina (LMX), ofloxacina (OFX), norfloxacina (NOR); quinolonas - ácido nalidíxico (NAL); aminoglicosídeos - amicacina (AMI), estreptomicina (EST), gentamicina (GEN), tobramicina (TOB), netilmicina (NET); carbapenem - doripenem (DOR), ertapenem (ERT), imipenem (IPM), meropenem (MPM); cefalosporinas (1ª e 2ª gerações) - cefazolina (CFZ), cefaclor (CFC), cefotetan (CTT), ceftoxitina (CFO), cefuroxima (CRX); cefalosporinas (3ª, 4ª e 5ª) - ceftazidima (CAZ), cefixima (CFM), ceftriaxona (CRO), cefotaxima (CTX), cefepima (CPM), ceftarolina (CPT); monobactama - aztreonam (ATM); penicilina com inibidores de β-lactamase - amoxicilina / clavulanato (AMC), ampicilina / sulbactam (APS), piperacilina / tazobactam (PIT), ticarcilina / clavulanato (TAC); tetraciclina - doxiciclina (DOX), minociclina (MIN), tetraciclina (TET); derivados de nitrofurano - nitrofurantoína (NIT); sulfonamidas e associações - sulfonamida (SUL), trimetoprim / sulfametoxazol (SUT); anfenicóis - cloranfenicol (CLO); derivados do ácido fosfônico - fosfomicina (FOS)

FIGURA 25 – Porcentagem de cepas não-susceptíveis entre as 28 cepas das cinco espécies de *Enterobacteriaceae* isoladas do esgoto hospitalar de Ribeirão Preto



Fonte: Autor, 2022.

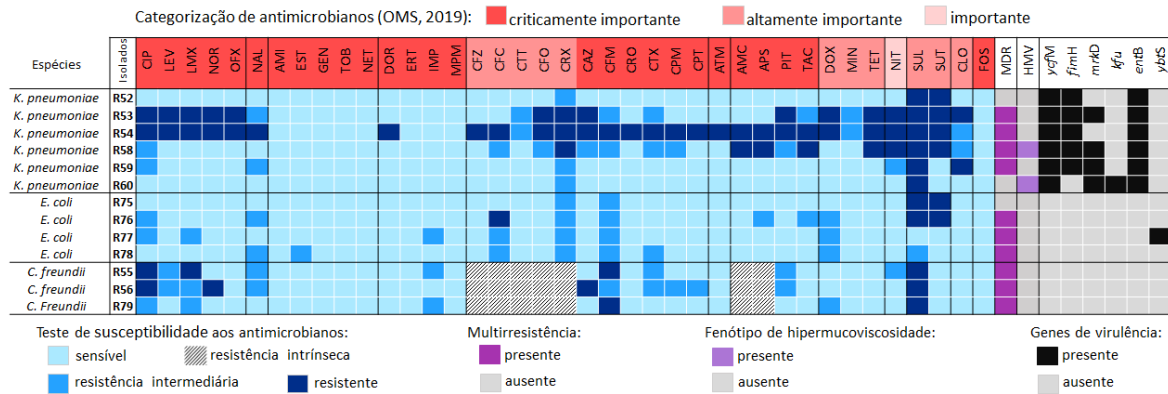
5.2 ESGOTO DO HOSPITAL TERCIÁRIO DE UBERLÂNDIA

O total de 23 isolados foi encontrado nas amostras coletadas do esgoto do hospital terciário localizado no município de Uberlândia, MG. Dentre esses isolados, 13 pertencem à família das *Enterobacteriaceae*, sendo seis *K. pneumoniae* (46,1%), quatro *E. coli* (30,8%) e três *C. freundii* (23,1%). Outros isolados identificados foram: *B. cereus*, *Corynebacterium vitaeruminis*, *Kurthia gibsonii* e *Elizabethkingia meningoseptica*, como o foco do presente estudo é para membros da família *Enterobacteriaceae*, nenhum dado relacionado a essas espécies foi apresentado.

Os testes de sensibilidade aos antimicrobianos demonstraram que a maioria das cepas de enterobactérias estudadas nesse hospital demonstrou-se MDR (76,9%, n = 10). Apenas duas *K. pneumoniae* (R52, R59) e uma *E. coli* (R60) foram exceções (Figura 26). A cepa de *K. pneumoniae* R54 teve o maior índice de não-susceptibilidade aos antibióticos testados, sendo 30/39 (76,9%), seguido pelas cepas R53 com 21/39 (53,8%) e R58, 17/39 (43,6%). A cepa de *C. freundii* com a maior não-susceptibilidade foi a R56, com 12/32 (37,5%) e, entre as cepas de *E. coli*, a R76 foi a mais não-

susceptível, com 10/39 (25,6%) (Figura 26). A Figura 27 ilustra o percentual de cepas não-susceptíveis das espécies bacterianas encontradas.

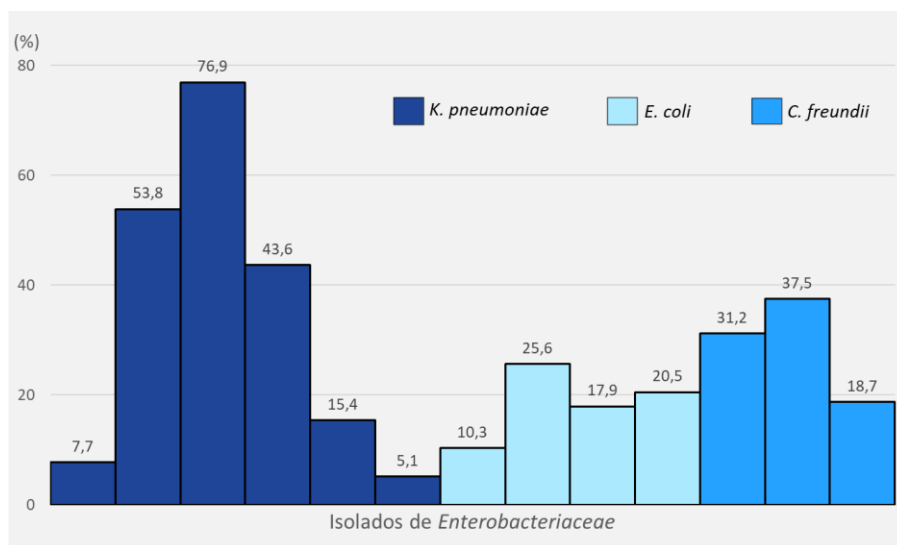
FIGURA 26 – Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos, fenótipo de hiper mucoviscosidade e genes de virulência encontrados entre as 13 cepas de *Enterobacteriaceae* isoladas do esgoto hospitalar de Uberlândia



MDR, multirresistente. HMV, fenótipo de hiper mucoviscosidade. Classes e antimicrobianos testados: fluoroquinolonas - ciprofloxacina (CIP), levofloxacina (LEV), lomefloxacina (LMX), ofloxacina (OFX), norfloxacina (NOR); quinolonas - ácido nalidíxico (NAL); aminoglicosídeos - amicacina (AMI), estreptomicina (EST), gentamicina (GEN), tobramicina (TOB), netilmicina (NET); carbapenem - doripenem (DOR), ertapenem (ERT), imipenem (IPM), meropenem (MPM); cefalosporinas (1ª e 2ª gerações) - cefazolina (CFZ), cefaclor (CFC), cefotetan (CTT), ceftazidima (CAZ), cefixima (CFM), ceftriaxona (CRO), cefotaxima (CTX), cefepima (CPM), ceftarolina (CPT); monobactama - aztreonam (ATM); penicilina com inibidores de β-lactamase - amoxicilina / clavulanato (AMC), ampicilina / sulbactam (APS), piperacilina / tazobactam (PIT), ticarcilina / clavulanato (TAC); tetraciclina - doxiciclina (DOX), minociclina (MIN), tetraciclina (TET); derivados de nitrofurano - nitrofurantoína (NIT); sulfonamidas e associações - sulfonamida (SUL), trimetoprim / sulfametoxazol (SUT); anfenicóis - cloranfenicol (CLO); derivados do ácido fosfônico - fosfomicina (FOS)

Fonte: Autor, 2022.

FIGURA 27 – Percentual de cepas não-susceptíveis entre as 13 cepas das três espécies de *Enterobacteriaceae* isoladas do esgoto hospitalar de Uberlândia



Fonte: Autor, 2022.

Os genes de virulência *ycfM* e *entB* foram detectados em todos os seis isolados de *K. pneumoniae*, outros genes encontrados em *K. pneumoniae* foram: *fimH* (n = 5), *mrkD* (n = 4) e *kfu* (n = 1). O gene *ybtS* foi detectado apenas em um isolado de *E. coli*. Nenhum gene de virulência foi detectado nas cepas de *C. freundii*. Os isolados que apresentaram os referidos genes estão especificados na Figura 26. Os genes encontrados foram confirmados molecularmente pelo sequenciamento dos *amplicons* obtidos e as sequências foram depositadas no GenBank (exceto *ycfM*) com os números de acesso entre OL373968 a OL373972.

Duas *K. pneumoniae* (R58 e R60) isoladas do esgoto do hospital terciário de Uberlândia expressaram o fenótipo de hiper mucoviscosidade (Figura 26).

6 DISCUSSÃO

A resistência aos antimicrobianos é uma das grandes ameaças globais da atualidade, dentre as áreas conhecidas pelo aumento da resistência antimicrobiana, a área hospitalar é uma das que recebe destaque. Por consequência, os esgotos hospitalares possuem potencial de favorecer a seleção de bactérias resistentes e também patogênicas, levando à necessidade de categorização dessas bactérias.

Com o intuito de correlacionar os resultados adquiridos de enterobactérias isoladas de esgotos hospitalares com diferentes características, amostras de esgotos pertencentes a dois hospitais de diferentes níveis de atenção à saúde foram avaliadas. Um hospital possui nível de atenção secundária e o outro terciária, ambos hospitais possuem atendimentos médicos especializados, realizam cirurgias e contém leitos para internação, no entanto, o hospital terciário realiza cirurgias de maior complexidade, atende uma demanda significativamente maior de pacientes e possui centenas de leitos a mais que o hospital secundário. Ambos hospitais estão localizados em cidades grandes do sudeste brasileiro, com população estimada maior que 700.000 habitantes (IBGE, 2021). O hospital secundário fica no município de Ribeirão Preto, interior do estado de São Paulo. O hospital terciário fica no município de Uberlândia, interior do estado de Minas Gerais, é considerado referência para micro e macrorregião de seu estado.

No presente estudo, foram encontradas 41 enterobactérias nas amostras analisadas dos esgotos hospitalares coletados do hospital secundário de Ribeirão Preto e do hospital terciário de Uberlândia. Apesar da diversidade de espécies bacterianas encontradas serem próximas, sendo nove espécies no hospital secundário e oito no terciário, a quantidade de enterobactérias isoladas para cada esgoto hospitalar se diferiu consideravelmente, sendo 28 isolados no esgoto hospitalar de Ribeirão Preto (secundário) e 13 no de Uberlândia (terciário).

Entre as *Enterobacteriaceae* identificadas, *K. pneumoniae* e *E. coli* estão entre as espécies mais comumente encontradas de bactérias resistentes isoladas de fontes relacionadas a esgotos hospitalares, esgotos municipais, efluentes de rio e ETAR (Fouz *et al.*, 2020). *S. marcescens*, *C. freundii* e *R. ornithinolytica* também são espécies bacterianas encontradas em ambientes aquáticos e de solo, inclusive, cepas resistentes a antimicrobianos portadoras de fatores de virulência têm sido relatadas causando infecções em humanos, especialmente pacientes imunocomprometidos

(PRASHAD, 2019; LIU *et al.*, 2018; HAJJAR *et al.*, 2020). Toombs-Ruane *et al.* (2017) demonstraram os desafios associados à resistência antimicrobiana em diferentes espécies pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, incluindo a transferência de ARG entre animais, humanos e meio ambiente, reforçando a necessidade de uma abordagem *One Health* para controlar a disseminação de cepas MDR.

Os dados obtidos por meio dos experimentos demonstram um alto percentual de *Enterobacteriaceae* multirresistentes em ambos os esgotos hospitalares estudados, assim como o esperado, baseando-se na literatura pertinente. No entanto, esperava-se que os isolados do esgoto do hospital de nível secundário obtivesse menores percentuais de MDR ao se comparar com o terciário, devido sua menor estrutura e quantidade de leitos, circulação de pacientes e procedimentos cirúrgicos. Contudo, essa conjectura não se concretizou.

O esgoto do hospital secundário apresentou 100% de enterobactérias MDR e o terciário 76,9%. No estudo de Zagui *et al.* (2020), que avaliaram 45 bacilos Gram-negativos isolados de águas residuárias hospitalares e de tratamento de águas residuárias urbanas, 33,3% das bactérias apresentaram o perfil MDR. Em outro estudo conduzido por Zagui *et al.* (2021), 60,7% de bactérias MDR estavam presentes em um total de 28 isolados de esgoto hospitalar. Ambos os estudos foram realizados em um hospital também localizado na cidade de Ribeirão Preto, porém, em um hospital terciário, no presente estudo, o hospital de Ribeirão Preto possui nível de atenção secundário. Outra diferença são os pontos de coleta da amostragem, sendo que nosso estudo utilizou apenas a caixa de passagem do esgoto hospitalar (ponto de convergência dos efluentes hospitalares), Zagui *et al.* (2020) coletaram na caixa de passagem do esgoto hospitalar, esgoto hospitalar ambulatorial, esgoto hospitalar de enfermaria, esgoto bruto de ETE urbana e esgoto tratado de ETE urbana. No entanto, comparando apenas os isolados de um mesmo ponto de coleta (caixa de passagem) entre o presente estudo e o estudo de Zagui *et al.* (2020), a espécie mais comumente encontrada foi *K. pneumoniae* com 100% de fenótipo MDR (n = 20 e n = 7, respectivamente), corroborando com o presente estudo.

A OMS classificou os antimicrobianos importantes do ponto de vista médico para o gerenciamento de risco de AMR. Todos os antimicrobianos usados na medicina humana foram separados em três categorias de acordo com sua importância: criticamente importante, altamente importante e importante (OMS, 2019). Uma quantidade considerável de *Enterobacteriaceae* demonstraram-se não-susceptível às

classes antimicrobianas criticamente importantes, como: cefalosporinas de terceira a quinta geração, destacando cefixima com 87,8% de isolados não-susceptíveis (considerando ambos esgotos hospitalares); fluoroquinolonas e quinolonas, destacando ciprofloxacina, 70,7% e; penicilina com inibidores de β -lactamase, destacando piperacilina tazobactam, 68,3%. Alguns poucos isolados foram não-susceptíveis às classes de aminoglicosídeos, monobactâmicos e derivados do ácido fosfônico, também classificados como criticamente importantes (OMS, 2019). Considerando a importância das cefalosporinas de terceira geração (e superiores) e das fluoroquinolonas, esses antimicrobianos devem ser usados raramente, apenas quando os dados laboratoriais demonstram que não há outras opções terapêuticas para a infecção (COLLIGNON; MCEWEN, 2019).

Outra lista publicada pela OMS foi a de bactérias prioritárias, constando as principais bactérias que ameaçam a saúde humana e precisam de desenvolvimento de pesquisas e novos antibióticos (OMS, 2017). Nessa lista, as bactérias resistentes foram classificadas em três categorias de prioridade: média, alta e crítica. Bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae* resistentes aos carbapenêmicos e β -lactamases de espectro estendido estão na categoria de prioridade crítica. Apenas 18 cepas (43,9%) dentre todo montante de isolados deste estudo foram susceptíveis a todos carbapenêmicos testados (doripenem, ertapenem, imipenem e meropenem). A porcentagem foi ainda menor quando comparada às cefalosporinas de terceira ou mais gerações, sendo que apenas cinco cepas (12,2%) foram susceptíveis a todos os antibióticos testados, pertencentes a essas classes (ceftazidima, cefixima, ceftriaxona, cefotaxima, cepefime e ceftarolina).

Muitos estudos destacam o papel do esgoto como reservatório ambiental de microrganismos AMR e ARG (FOUZ *et al.*, 2020). Um estudo prévio realizado por Dias *et al.* (2021) no mesmo hospital de Uberlândia, encontrou um total de 661 cepas bacterianas em fluidos cirúrgicos infectados ao longo de cinco anos (2015 a 2019). Mais da metade dessas bactérias foram classificadas como MDR (361 / 54,6%). As cinco espécies com maior número de cepas MDR foram *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *E. coli* e *E. cloacae* (119, 47, 33, 28 e 25 cepas, respectivamente). Vinte e seis antimicrobianos foram testados para bactérias presentes nos fluidos cirúrgicos e a porcentagem de cepas bacterianas resistentes em relação a antimicrobianos específicos pode ser comparada com os achados do nosso estudo. No estudo de Dias *et al.* (2021), 19,4% das cepas bacterianas foram resistentes à ciprofloxacina, 0,2%

norfloxacina, 19,2% cefepima, 13% ceftriaxona, 8,8% imipenem, 8,8% meropenem, 0,5% ertapenem, 12,6% gentamicina, 16,3% ampicilina - sulbactam e 7,4% piperacilina - tazobactam. Nos isolados do esgoto hospitalar de Uberlândia do nosso estudo, 69,2% ciprofloxacina, 23,1% norfloxacina, 23,1% cefepima, 7,7% ceftriaxona, 23,1% imipenem, 30% ampicilina-sulbactam, 38,5% piperacilina-tazobactam e nenhuma cepa bacteriana foi resistente a meropenem, ertapenem e gentamicina. Embora os dois estudos tenham sido realizados no mesmo hospital, é importante ressaltar que o estudo de Dias *et al.* (2021) analisou-se os prontuários de 1.658 cirurgias infectadas realizadas ao longo de cinco anos e, os resultados mostraram 661 cepas bacterianas distribuídas em 48 espécies diferentes. No presente estudo, a coleta realizada teve como foco a investigação de enterobactérias em uma única coleta de esgoto hospitalar, portanto, esperava-se um número menor de espécies bacterianas encontradas. Apesar das diferenças de amostragem, é evidente que cirurgias infectadas descarregadas diretamente no esgoto hospitalar, sem descontaminação prévia, podem contribuir para a presença e disseminação de cepas MDR. Além da contaminação direta do esgoto ao receber bactérias MDR presentes nos fluidos corporais coletados durante procedimentos cirúrgicos infectados, é provável que, as fezes e urina excretadas pelos pacientes hospitalares apresentem cepas MDR e grande concentração de antibióticos, que atuam favorecendo a pressão seletiva no esgoto hospitalar, contribuindo para o desenvolvimento de patógenos resistentes a antibióticos por meio de transferência horizontal de genes (ASFAW, 2018).

Além da AMR, outras características importantes são os fatores de virulência, especialmente a combinação de resistência e virulência. Essa combinação vem trazendo grande preocupação, particularmente em clones de *K. pneumoniae* de alto risco (TURTON *et al.*, 2019). De acordo com Nakamura-Silva *et al.* (2021) vários genes de virulência foram encontrados entre 13 cepas MDR e XDR de *K. pneumoniae* isoladas de diferentes pacientes internados em um hospital terciário na região nordeste do Brasil, com alta prevalência de genes de adesina (*fimH* e *mrkD*), sistema de aquisição de ferro (*entB*) e lipopolissacarídeo (*ycfM*). Em outro estudo brasileiro, prevalências semelhantes dos genes *fimH*, *mrkD* e *entB* foram encontradas entre as 21 cepas MDR de *K. pneumoniae* isoladas de pacientes internados em unidades de terapia intensiva de um hospital terciário no norte do Brasil (FERREIRA *et al.*, 2018). Além disso, Effah *et al.* (2020) publicaram um artigo de revisão onde são relatados

vários genes de virulência em seis estudos de *K. pneumoniae*. Os dados dos três estudos supracitados corroboram com nossos resultados.

O fenótipo de hipermucoviscosidade foi detectado em apenas duas cepas de *K. pneumoniae* (R58 e R60) isoladas do esgoto do hospital terciário de Uberlândia. Os genes *ycfM*, *fimH* e *mrkD* foram detectados no isolado R58, *ycfM*, *mrkD*, *kfu* e *entB* no isolado R60, os genes *rmpA* e *magA* não foram detectados em nenhum dos isolados (regulador mucóide do fenótipo A e gene A associado à mucoviscosidade, respectivamente). Embora esses genes estejam associados ao fenótipo de hipermucoviscosidade, muitos estudos relataram exceções a essa associação (CATALÁN-NÁJERA; GARZA-RAMOS; BARRIOS-CAMACHO, 2017; CHOBY; HOWARD-ANDERSON; WEISS, 2020). A bactéria HMV pode adquirir características vantajosas, como prevenção de fagocitose, anticorpos específicos e ação antimicrobiana, favorecendo a sua patogenicidade e evasão da resposta imunológica do hospedeiro (ZHU *et al.*, 2021). Além dos genes de virulência já mencionados, R58 foi classificada como MDR, sendo não-susceptível à 17 antibióticos (43,6%), incluindo, os classificados como criticamente importantes (OMS, 2019): ciprofloxacina, ceftazidima, cefixima, cefotaxima, cefepima, amoxicilina clavulanato, ampicilina sulbactam, piperacilina tazobactam e ticarcilina clavulanato. O isolado R60, entretanto, apresentou não-susceptibilidade apenas à cefuroxima e sulfonamida.

A *K. pneumoniae* R58 combina três características: multirresistência, fatores de virulência e hipermucoviscosidade. Infecções ou doenças bacterianas causadas por cepas que possuam essa preocupante combinação de características são severamente mais difíceis de tratar. Recentemente, Nakamura-Silva *et al.*, (2021) encontraram duas *K. pneumoniae* isoladas de urina e sangue de pacientes internados em um hospital terciário na região nordeste do Brasil, ambas possuíam essa combinação de características. No presente estudo, por sua vez, a cepa encontrada foi isolada do esgoto hospitalar, levantando a preocupação de sua possível disseminação para o meio ambiente.

O esgoto hospitalar pode ser um ponto de acesso para a resistência antimicrobiana, pois recebe bactérias multirresistentes, genes de resistência e diversas substâncias (*e. g.* antimicrobianos) que fornecem pressão seletiva às demais bactérias presentes no local (ROZMAN *et al.*, 2020). O esgoto hospitalar enviado para a rede municipal sem receber pré-tratamento pode levar à disseminação da

resistência antimicrobiana. Inclusive, o surgimento e a disseminação de ARG no meio ambiente representam uma grande ameaça à saúde global (FOUZ *et al.*, 2020).

7 CONCLUSÕES

Nossos resultados indicam que os esgotos dos hospitais analisados podem servir como reservatório para enterobactérias MDR. Embora o hospital secundário seja menos complexo, com menor circulação e internação de pacientes, o esgoto deste hospital apresentou maior índice de bactérias MDR quando comparado ao esgoto do hospital terciário. A presença de enterobactérias com resistência a algumas das classes de antimicrobianos de importância crítica e portadoras de genes de virulência, levanta um alerta para os riscos de contaminação e disseminação das mesmas no meio ambiente. Essa contaminação ambiental por esgoto hospitalar pode atingir humanos e animais, ameaçando a saúde pública pela presença de bactérias multirresistentes.

- Foram isoladas 28 bactérias da família *Enterobacteriaceae* no esgoto do hospital secundário (Ribeirão Preto, SP), incluindo as espécies *K. pneumoniae* (71,4%), *S. marcescens* (14,3%), *E. coli* (7,1%), *C. freundii* (7,1%) e *R. ornithinolytica* (3,6%). Foram isoladas 13 *Enterobacteriaceae* no esgoto do hospital terciário (Uberlândia, MG), incluindo *K. pneumoniae* (46,1%), *E. coli* (30,8%) e *C. freundii* (23,1%);
- Por meio do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos dos isolados bacterianos estudados, constatou-se que 100% das enterobactérias isoladas do esgoto do hospital secundário foram classificadas como MDR. A porcentagem de enterobactérias MDR para o hospital terciário foi de 76,9%;
- Foram detectados seis diferentes genes de virulências nas enterobactérias de ambos os esgotos hospitalares. O gene *ycfM* foi detectado em 56,1% das enterobactérias, *fimH* 51,2%, *mrkD* 39%, *kfu* 36,6%, *entB* 56,1 e *ybtS* 2,4%;
- Duas cepas de *K. pneumoniae* expressaram o fenótipo de hiper mucoviscosidade, ambas provenientes do esgoto do hospital terciário;
- O principal ponto de comparação entre os locais escolhidos para coletar as amostras de esgoto hospitalar, foi o nível de atenção à saúde, conseqüentemente, a quantidade de leitos. A priori, conjecturava-se encontrar maior quantidade de *Enterobacteriaceae* MDR no hospital terciário, entretanto, o esgoto do hospital secundário apresentou maior percentual de

enterobactérias MDR em relação ao esgoto do hospital terciário. Em contrapartida, características importantes como o fenótipo HMV foi encontrado somente em isolados do hospital terciário.

8 TRABALHOS FUTUROS

Atualmente, com a redução dos custos do sequenciamento e a rapidez com a qual as análises são realizadas, é possível sequenciar genomas bacterianos inteiros em um intervalo de tempo reduzido. Isso possibilita, além da identificação da bactéria isolada, a revelação de todo o seu conteúdo genético, o qual pode ser utilizado em diversas aplicações, desde a identificação de genes de resistência a antimicrobianos, genes de virulência, tipagem molecular e até estudos epidemiológicos e de genômica comparativa. Dessa forma, pretendemos dar continuidade neste estudo com a análise genômica das *Enterobacteriaceae* estudadas, principalmente das *K. pneumoniae* multirresistentes ou com o fenótipo de hipermucoviscosidade. O sequenciamento genômico proporcionará uma análise mais profunda sobre a resistência genotípica dos nossos isolados, assim como, seu entendimento epidemiológico em relação a grupos clonais internacionais.

REFERÊNCIAS

- AHMED, W. *et al.* First confirmed detection of SARS-CoV-2 in untreated wastewater in Australia: A proof of concept for the wastewater surveillance of COVID-19 in the community. **Science of the Total Environment**, v. 728, p. 138764, ago. 2020. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.138764
- ALMAKKI, A. *et al.* Antibiotic resistance in urban runoff. **Science of the Total Environment**, v. 667, p. 64-76, jun. 2019. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.02.183
- ASFAW, T. Review on hospital wastewater as a source of emerging drug resistance pathogens. **Journal of Research in Environmental Science and Toxicology**, v. 7, p. 47-52, dez. 2018. doi: <http://dx.doi.org/10.14303/jrest.2018.020>
- AZEVEDO, P. A. A. *et al.* Molecular characterisation of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* belonging to CC258 isolated from outpatients with urinary tract infection in Brazil, **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 18, p. 74-79, set. 2019. doi: 10.1016/j.jgar.2019.01.025
- BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Fármacos no meio ambiente. **Química Nova**, v. 26, p. 523-530. 2003. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422003000400015>
- BRASIL. Resolução CONAMA nº 430, de 13 de maio de 2011. **Ministério do Meio Ambiente**. Disponível em: <<http://conama.mma.gov.br/images/conteudo/LivroConama.pdf>>. Acesso em: 24 dez. 2021.
- BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC ANVISA nº 222, de 28 de março de 2018. **Ministério da Saúde**. Disponível em: <https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2018/rdc0222_28_03_2018.pdf>. Acesso em: 24 dez. 2021.
- BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC ANVISA nº 50, de 21 de fevereiro de 2002. **Ministério da Saúde**. Disponível em: <https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2002/rdc0050_21_02_2002.html>. Acesso em: 24 dez. 2021.
- BRASIL. Lei nº 12.305, de 2 de agosto de 2010. **Política Nacional de Resíduos Sólidos**. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2010/lei/l12305.htm>. Acesso em: 26 dez. 2021.
- CATALÁN-NÁJERA, J. C.; GARZA-RAMOS, U.; BARRIOS-CAMACHO, H. Hypervirulence and hypermucoviscosity: Two different but complementary *Klebsiella* spp. phenotypes? **Virulence**, v. 8, p. 1111-1123, abr. 2017. doi: 10.1080/21505594.2017.1317412
- CHOBY, J. E.; HOWARD-ANDERSON, J.; WEISS, D. S. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* - clinical and molecular perspectives. **Journal of Internal Medicine**, v. 287, p. 283-300, mar. 2020. doi: 10.1111/joim.13007

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**, M100. 30th ed. M02-M07. 2020

CNSAÚDE – Confederação Nacional de Saúde. **Cenário dos hospitais no Brasil 2021-2022**. 2022. Disponível em: < <http://cnsaude.org.br/publicacoes/cenario-dos-hospitais-no-brasil-2021-2022/>>. Acesso em: 14 set. 2022.

COLLIGNON, P. J.; MCEWEN, S. A. One Health-Its Importance in Helping to Better Control Antimicrobial Resistance. **Tropical Medicine Infectious Disease**, v. 4, p. 22, jan. 2019. doi: 10.3390/tropicalmed4010022

COVONE, M. G. *et al.* Levels of expression and immunogenicity of attenuated Salmonella enteric serovar *Typhimurium* strains expressing *Escherichia coli* mutant heat-labile enterotoxin. **Infection and Immunity**, v. 66, p. 224–231, jan. 1998. doi: 10.1128/IAI.66.1.224-231.1998.

DIAS, L. L. **Levantamento microbiológico de resíduos líquidos corpóreos provenientes de procedimentos cirúrgicos visando avaliar o potencial de contaminação da rede esgoto**. 2021. Dissertação de Mestrado (Tecnologia Ambiental) - Universidade de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2021.

DIAS, L. L. *et al.* Hospital liquid waste contaminated with multidrug-resistant bacteria raises a public health hazard alert in Brazil. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 193, p. 719, out. 2021. doi: 10.1007/s10661-021-09477-1

EFFAH, C. Y. *et al.* *Klebsiella pneumoniae*: an increasing threat to public health. **Annals of Clinical Microbiology Antimicrobials**, v. 19, p. 1, jan. 2020. doi: 10.1186/s12941-019-0343-8

FANG, C. T. *et al.* A novel virulence gene in *Klebsiella pneumoniae* strains causing primary liver abscess and septic metastatic complications. **Journal of Experimental Medicine**, v. 199, p. 697-705, mar. 2004. doi: 10.1084/jem.20030857

FERREIRA, R. L. *et al.* High Prevalence of Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Harboring Several Virulence and β -Lactamase Encoding Genes in a Brazilian Intensive Care Unit. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 3198, jan. 2019. doi: 10.3389/fmicb.2018.03198

FERTAS-AISSANI, R. *et al.* Virulence profiles and antibiotic susceptibility patterns of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from different clinical specimens. **Pathologie Biologie**, v. 61, p. 209-216, out. 2013. doi: 10.1016/j.patbio.2012.10.004. 2013

FOUZ, N. *et al.* The Contribution of Wastewater to the Transmission of Antimicrobial Resistance in the Environment: Implications of Mass Gathering Settings. **Tropical Medicine Infectious Disease Tropical Medicine Infectious Disease**, v. 5, p. 33, fev. 2020. doi: 10.3390/tropicalmed5010033

HAIJAR, R. *et al.* *Raoultella ornithinolytica*: Emergence and Resistance. **Infection and Drug Resistance**, v. 13, p. 1091-1104, abr. 2020. doi: 10.2147/IDR.S191387

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **População estimada Ribeirão Preto e Uberlândia em 2021**. 2021. Disponível em: < <https://www.ibge.gov.br/pt/inicio.html> >. Acesso em: 21 jan. 2022.

KARAS, M.; HILLENKAMP, F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. **Analytical Chemistry**, v. 15, p. 2299-2301, out. 1988. doi: 10.1021/ac00171a028

LIU, L. H. *et al.* *Citrobacter freundii* bacteremia: Risk factors of mortality and prevalence of resistance genes. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 51, p. 565-572, ago. 2018. doi: 10.1016/j.jmii.2016.08.016

MA, L. C. *et al.* Genomic heterogeneity in *Klebsiella pneumoniae* strains is associated with primary pyogenic liver abscess and metastatic infection. **Journal of Infectious Diseases**, v. 192, p. 117-128, jul. 2005. doi: 10.1086/430619

MADIGAN, M. T. *et al.* **Microbiologia de Brock**. 14. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.

MAGIORAKOS, A. P. *et al.* Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, p. 268-281, mar. 2012. 10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x

MAMLOUK, K. *et al.* Emergence and outbreaks of CTX-M beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains in a Tunisian hospital. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, p. 4049–4056, nov. 2006. doi: 10.1128/JCM.01076-06

Mara DD. **Bacteriology for Sanitary Engineers**. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1974.

MCEWEN, S. A.; COLLIGNON, P. J. Antimicrobial Resistance: a One Health Perspective. **Microbiology Spectrum**, v. 6, mar. 2018. doi: 10.1128/microbiolspec.ARBA-0009-2017

MEDEMA, G. *et al.* Presence of SARS-Coronavirus-2 in sewage and correlation with reported COVID-19 prevalence in the early stage of the epidemic in the Netherlands. **Environmental Science & Technology Letters**, v. 7, p. 511–516, ago. 2020. doi: 10.1021/acs.estlett.0c00357

MOROSINI, M. I.; CANTÓN, R. Changes in bacterial hospital epidemiology. **Revista Española de Quimioterapia**, v. 31, p. 23-26, set. 2018

NADDEO, V.; LIU, H. Editorial Perspectives: 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2): what is its fate in urban water cycle and how can the water research community respond? **Environmental Science: Water Research and Technology**, v. 6, p. 1213-1216, mar. 2020. <https://doi.org/10.1039/d0ew90015j>

NAKAMURA-SILVA, R. *et al.* Characterization of multidrug-resistant and virulent *Klebsiella pneumoniae* strains belonging to the high-risk clonal group 258 (CG258)

isolated from inpatients in northeastern Brazil. **Archives of Microbiology**, v. 203, p. 4351-4359, set. 2021. doi: 10.1007/s00203-021-02425-0

NASCIMENTO, T. C. *et al.* Ocorrência de bactérias clinicamente relevantes nos Resíduos de Serviços de Saúde em um aterro sanitário brasileiro e perfil de susceptibilidade a antimicrobianos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, ago. 2009. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822009000400011>

NORDMANN, P.; POIREL, L.; FREY, J. Crisis of emerging antibiotic resistances mirroring that of the COVID-19 in the age of globalisation. **Swiss Medical Wkly**, v. 150, nov. 2020. doi: 10.4414/smw.2020.20402

OMS - Organização Mundial da Saúde. World Health Organization. **Critically important antimicrobials for human medicine**. 2019. 6th revision 2018. Geneva. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Disponível em: <<https://www.who.int/publications/i/item/9789241515528>>. Acesso em: 27 dez. 2021.

OMS - Organização Mundial da Saúde. World Health Organization. **Report on Global Priority List of Antibiotic - Resistant Bacteria to Guide Research, Discovery, and Development of New Antibiotics**. 2017. Disponível em: <https://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf>. Acesso em: 27 dez. 2021.

O'NEILL, J. Tackling drug-resistant Infections globally: Final report and Recommendations. **Review on Antimicrobial Resistance**, dez. 2014. Disponível em: <https://iif.wellcomecollection.org/file/b28552179_AMR%20Tackling%20a%20crisis%20for%20the%20health%20and%20wealth%20of%20nations.pdf>. Acesso em: 27 nov. 2021.

PRADO, T. *et al.* Preliminary results of SARS-CoV-2 detection in sewerage system in Niterói municipality, Rio de Janeiro, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 115, p. e200196, jul. 2020; doi: 10.1590/0074-02760200196

PRASHAD, Y. A Critical Review of the Bacteria *Serratia marcescens* and its Impact on Human Health. **Webmed Central Bacteriology**, v. 10, jun. 2019. WMC00557. Disponível em: <https://www.webmedcentral.com/article_view/5573.%20>. Acesso em: 20 jan. 2022.

REDDY, P. R.; RAJU, N. Gel-Electrophoresis and Its Applications. **Gel Electrophoresis - Principles and Basics**, p. 16, abr. 2012. doi: 10.5772/38479

RESENDE, A. C. B. **Detecção de microrganismos presentes no efluente hospitalar e na estação de tratamento de esgoto de goiânia**: presença de bactérias gram-negativas resistentes aos antimicrobianos. 2009. Dissertação de Mestrado (Ciências da Saúde) - Pontifícia Universidade Católica de Goiás, goiânia, 2009.

ROZMAN, U. *et al.* Hospital wastewater effluent: Hot spot for antibiotic resistant bacteria. **Journal of Water, Sanitation and Hygiene for Development**, v. 10, fev. 2020. doi: 10.2166/washdev.2020.086

SAHLY, H. *et al.* Extended-spectrum beta-lactamase production is associated with an increase in cell invasion and expression of fimbrial adhesins in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 52, p. 3029-3034, jun. 2008.

SNIS - Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento. **Diagnóstico dos serviços de água e esgotos**. Site institucional. 2021. Disponível em: <http://www.snis.gov.br/downloads/diagnosticos/ae/2020/DIAGNOSTICO_TEMATICO_VISAO_GERAL_AE_SNIS_2021.pdf>. Acesso em: 14 mar. 2022.

SOUZA, F. E. A. *et al.* Atuação dos hospitais de pequeno porte de pequenos municípios nas redes de atenção à saúde. **Saúde e Sociedade**, v. 28, p. 143-156, set. 2019. doi: 10.1590/s0104-12902019181115

TAVARES, W. **Antibióticos e quimioterápicos para o clínico**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2014.

TEKIPPE, E. M. *et al.* Optimizing identification of clinically relevant Gram-positive organisms by use of the Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, p. 1421-1427, maio, 2013. doi: 10.1128/JCM.02680-12

TONUCI, L. R. S. **Desinfecção de Resíduos de Serviços de Saúde por aquecimento dielétrico do tipo microondas**. Dissertação de Mestrado (Tecnologia Ambiental) - Universidade de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2006.

TOOMBS-RUANE, L. *et al.* Multidrug resistant *Enterobacteriaceae* in New Zealand: a current perspective. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 65, p. 62-70, mar. 2017. doi: 10.1080/00480169.2016.1269621

TORTORA, G.J.; FUNKE, B. R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 6. ed. São Paulo: Atheneu, 2015.

TURTON, J. *et al.* Hybrid Resistance and Virulence Plasmids in "High-Risk" Clones of *Klebsiella pneumoniae*, Including Those Carrying *bla*_{NDM-5}. **Microorganisms**, v. 7, p. 326, set. 2019. doi: 10.3390/microorganisms7090326

VIEIRA, D.S.; RODRIGUES, S. S; PICOLI, R. L. Gestão ambiental e resíduos hospitalares: Uma análise sobre a legislação e a viabilidade de implantação dos ecocentros e ECTE no Distrito Federal. In: IV Congresso Brasileiro de Gestão Ambiental. Instituto Brasileiro de Estudos Ambientais, 2013, [Salvador, BA].

WISKUR, B. J.; HUNT, J. J.; CALLEGAN, M. C. Hypermucoviscosity as a virulence factor in experimental *Klebsiella pneumoniae* endophthalmitis. **Investigative**

Ophthalmology & Vision Science, v. 49, p. 4931-4938, nov. 2008.

WOOLHOUSE, M. E. J.; WARD, M. J. Microbiology. Sources of antimicrobial resistance. **Science**, v. 341, p. 1460-1461, set. 2013. doi: 10.1126/science.1243444

WOOLHOUSE, M. E. J.; GOWTAGE-SEQUERIA, S. Host range and emerging and reemerging pathogens. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, p.1842–1847, dez. 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3201/eid1112.050997>>. Acesso em: 20 jan. 2022.

WU, F. *et al.* SARS-CoV-2 Titers in Wastewater Are Higher than Expected from Clinically Confirmed Cases. **mSystems**, v. 5, p. e00614-20, jul. 2020. doi: 10.1128/mSystems.00614-20

WURTZER, S. *et al.* Evaluation of lockdown effect on SARS-CoV-2 dynamics through viral genome quantification in waste water, Greater Paris, France, 5 March to 23 April 2020. **Euro Surveillance**, v. 25, p. 2000776, dez. 2020. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.50.2000776

YU, V. L. *et al.* Virulence characteristics of *Klebsiella* and clinical manifestations of *K. pneumoniae* bloodstream infections. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, p. 986-993, jul. 2017. Disponível em: < <https://dx.doi.org/10.3201/eid1307.070187>. 2008>. Acesso em: 20 jan. 2022.

ZAGUI, G. S. *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, maio 2020. doi: 10.1007/s10661-020-08319-w

ZAGUI, G. S. *et al.* Tertiary hospital sewage as reservoir of bacteria expressing MDR phenotype in Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 82, p. e234471, mar. 2021. doi: 10.1590/1519-6984.234471

ZHU, J. *et al.* Virulence Factors in Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 642484, abr. 2021. doi: 10.3389/fmicb.2021.642484