

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE

**SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA EM ISOLADOS BACTERIANOS DE
AMOSTRAS DE ÁGUA DO SISTEMA DE ABASTECIMENTO DE ÁGUA E DOS
EFLUENTES LIQUIDOS EM HOSPITAIS DO VALE DOS SINOS**

Julyana Sthéfanie Simões Matos

Orientador(a): Prof^(a). Dr^(a). Gertrudes Corção

Porto Alegre

Março/2017

Matos, Julyana Sthéfanie Simões
Susceptibilidade Antimicrobiana em Isolados
Bacterianos de Amostras de Água do Sistema de
Abastecimento de Água e dos Efluentes Líquidos em
Hospitais do Vale dos Sinos / Julyana Sthéfanie
Simões Matos. -- 2017.

94 f.

Orientadora: Gertrudes Corção.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. Susceptibilidade antimicrobiana. 2. Água. 3.
Efluente hospitalar. 4. Genes de Resistência. 5.
Sistema de Abastecimento de Água. I. Corção,
Gertrudes, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE

**SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA EM ISOLADOS BACTERIANOS DE
AMOSTRAS DE ÁGUA DO SISTEMA DE ABASTECIMENTO DE ÁGUA E DOS
EFLUENTES LIQUIDOS EM HOSPITAIS DO VALE DOS SINOS**

Julyana Sthéfanie Simões Matos
Médica Veterinária

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola e do Ambiente da Universidade Federal
do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos
necessários à obtenção do título de Mestre em
Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Área de concentração: Microbiologia
Ambiental

Orientador(a): Prof^(a). Dr^(a). Gertrudes Corção

Porto Alegre, Rio Grande do Sul - Brasil

Março/2017

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Prof.^a Dr.^a Gertrudes Corção pela oportunidade em realizar o mestrado sob sua orientação. Agradeço imensamente sua disponibilidade, paciência, ensinamentos e dedicação. Jamais esquecerei a oportunidade concedida na concretização deste sonho.

A todos os colegas do laboratório 222 – F que de todas as formas contribuíram para que este trabalho fosse concluído, em especial às colegas Belize Leite e Karine Lena Meneghetti que dedicaram seu tempo em ensinamentos primordiais e esclarecimentos de dúvidas. Ambas foram essenciais à conclusão desta etapa.

Aos colegas Athos Tópor e Thais Hain que auxiliaram na execução desta pesquisa.

À Dr.^a Fernanda Eugênia Rodrigues Seibel, amiga e colega de profissão, que deu diversas sugestões para a execução das metodologias e em todos os momentos desta etapa me apoiou para prosseguir.

À minha madrinha, Elma Eunice Teixeira da Cruz, por ter acreditado em mim e me apoiado em tempo integral.

À minha irmã Kamila Francine Simões Matos, farmacêutica especialista em segurança do paciente e atenção farmacêutica, por ter colaborado nas descrições das rotinas hospitalares e informação dos procedimentos adotados em uma das unidades de saúde estudadas.

À minha mãe, Eloisa de Fátima Simões Matos, por estar comigo em todos os momentos da minha vida, em especial, neste.

SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA EM ISOLADOS BACTERIANOS DE AMOSTRAS DE ÁGUA DO SISTEMA DE ABASTECIMENTO DE ÁGUA E DOS EFLUENTES LÍQUIDOS EM HOSPITAIS DO VALE DOS SINOS¹

Autor: Julyana Sthéfanie Simões Matos

Orientador(a): Prof. Dr. Gertrudes Corção

RESUMO

A disseminação das infecções associadas aos cuidados da saúde é complexa e multifatorial. Neste sentido, a abordagem da participação do ambiente na disseminação de bactérias, avaliando-se os efluentes líquidos, visa contribuir para melhor compreensão e definição das recomendações e políticas de controle dentro dos estabelecimentos de saúde. O objetivo deste trabalho foi avaliar a presença de bactérias *E. coli*, *Pseudomonas sp.*, *Klebsiella sp.* e *Staphylococcus sp.* na água proveniente do Sistema de Abastecimento de Água (SAA) que chega aos hospitais localizados em um município da região do Vale dos Sinos e nos seus respectivos efluentes líquidos bem como a pesquisa dos genes *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}* e *bla_{CTX-M}* nos isolados encontrados no efluente. Os isolados foram triados por testes bioquímicos convencionais e posteriormente tiveram sua identificação confirmatória pela metodologia Maldi – TOF. A detecção dos genes *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}* e *bla_{CTX-M}* foi realizada nos isolados de *E. coli*, *Pseudomonas sp.* e *Klebsiella sp.* Obtiveram-se, nos efluentes pesquisados, 100 isolados. Destes isolados, 20/100 (20%) foram do gênero *Klebsiella sp.*, 09/100 (9%) do gênero *Staphylococcus sp.*, 05/100 (5%) do gênero *Pseudomonas sp.* e 09/100 (9%) foram *E. coli*. Evidenciou-se perfil de multirresistência em 70% dos isolados de *E. coli*, 41,66% dos isolados de *K. variicola*, 66,66% dos isolados de *K. pneumoniae* e 75% dos isolados de *Pseudomonas sp.* De 30 isolados avaliados para genes de resistência, quatro (04/30) apresentaram o gene *bla_{SHV}*, três (03/30) apresentaram os genes *bla_{SHV}* e *bla_{TEM}*, seis (06/30) apresentaram o gene *bla_{CTX-M}* e um isolado (01/30) apresentou os genes *bla_{SHV}* e *bla_{CTX-M}*. Na água do SAA foi encontrado um isolado do gênero *Staphylococcus sp.* sensível a todos os antimicrobianos testados. Nos efluentes dos pontos avaliados ocorreu a presença das bactérias potencialmente patogênicas e dos genes de resistência pesquisados. Portanto, este corpo d'água pode estar atuando na disseminação de fatores de resistência.

¹Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (99 p.) Março, 2017.

ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY IN BACTERIAL ISOLATES OF WATER SAMPLES FROM DRINKING WATER DISTRIBUTION SYSTEM AND LIQUID EFFLUENTS AT HOSPITALS OF THE SINOS VALLEY¹

Author: Julyana Sthéfanie Simões Matos

Advisor: Prof. Dr. Gertrudes Corção

ABSTRACT

The spread of infections associated with health care is complex and multifactorial. In this sense, to approach the role of the environment in the bacterial dissemination, evaluating liquid effluents, aims to contribute to a better understanding and definition of recommendations and control policies within health facilities. The aims of this study was to evaluate the presence of *E. coli*, *Pseudomonas sp.*, *Klebsiella sp.* and *Staphylococcus sp.* in the water samples from the Water Distribution System (WDS) that enter the hospitals located in a municipality in the Sinos Valley region and in their respective liquid effluents, as well as the *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM} and *bla*_{CTX-M} resistance genes in the effluent isolates. The isolates were screened by conventional biochemical tests and later confirmed by the Maldi - TOF methodology. Detection of the *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM} and *bla*_{CTX-M} genes was performed in *E. coli*, *Pseudomonas sp.* and *Klebsiella sp.* A hundred isolates were obtained at the effluents samples surveyed. Of these isolates, 20% were *Klebsiella sp.*, 9% were *Staphylococcus sp.*, 5% were *Pseudomonas sp.* and 9% were *E. coli*. A multidrug resistance profile was found in 70% of the *E. coli* isolates, 41.66% of the *K. variicola* isolates, 66.66% of the *K. pneumoniae* isolates and 75% of the *Pseudomonas sp.* isolates. In the 30 isolates evaluated for the resistance genes, four had the *bla*_{SHV} gene, three had the *bla*_{SHV} and *bla*_{TEM} genes, six had the *bla*_{CTX-M} gene and one isolate presented the *bla*_{SHV} and *bla*_{CTX-M} genes. In the WDS water, a *Staphylococcus sp.* was found and it was sensitive to all tested antimicrobials. At the effluent from the evaluated points, the presence of potencial patogenic bacteria and the resistance genes studied were observed. Therefore, it might be taking part in the dissemination of resistant factors in this environment.

¹Master of Science Thesis in Agricultural and Environmental Microbiology – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (99 p.) March, 2017.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	iv
RESUMO.....	v
ABSTRACT	vi
Sumário.....	vii
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE QUADROS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1 Objetivos Gerais:.....	3
2.2 Objetivos Específicos:	3
3.1 Microrganismos em água de sistema de abastecimento de água para consumo humano	4
3.2 Microrganismos em efluente hospitalar	9
3.2.1 Bastonetes Gram – negativos fermentadores	9
3.2.2 Bastonetes Gram – negativos não – fermentadores	12
3.2.3 Gênero <i>Staphylococcus sp.</i>	14
3.3 Problemática do efluente hospitalar	16
3.4 Disseminação da resistência pelo efluente hospitalar	17
4. MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1 Caracterização do município	21
4.2 Caracterização dos pontos de coleta	21
4.3 Coleta de amostras e identificação de isolados	23
4.4 Avaliação do Perfil de Susceptibilidade aos Antimicrobianos.....	25
4.5 Extração de DNA das amostras	25
4.6 Amplificação de genes	26
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
5.1 Bactérias encontradas e identificadas nos efluentes analisados.....	28
5.2 Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos entre os isolados bacterianos encontrados no efluente.....	33
5.3 Avaliação microbiológica da água proveniente do Sistema de Abastecimento de Água (SAA)	42
6. CONCLUSÃO.....	45
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
Anexo A - Meios de Cultura e Testes Bioquímicos utilizados	63
Anexo B - Resultados da realizada pela metodologia Identificação do Maldi – TOF	79
9. APÊNDICE	80
9.1 Apêndice A - Artigo tipo Short Communication	81

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 01: Perfil de resistência aos antimicrobianos por isolado, de acordo com os pontos de coleta de efluente. Re: Regina Efluente, Ue: Unimed Efluente, Me: Municipal Efluente.....	39
Tabela 02: Divisão dos isolados (n = 35) conforme presença dos genes de resistência.....	40
Tabela 03: Resultados das análises físico – químicas na água de Sistema de Abastecimento de Água dos pontos amostrais.....	42

LISTA DE QUADROS

	Página
Quadro 01: Descrição dos genes de resistência avaliados, com suas respectivas sequências e referências.....	26
Quadro 02: Condições dos reagentes para reação de PCR para os diferentes genes de resistencias analisados em um volume final de 25µL.....	27
Quadro 03: Condições para os ciclos da reação de PCR para os diferentes genes de resistencias analisados.....	27

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 01: Esquema simplificado de operações unitárias envolvidas no tratamento de água para consumo humano.....	04
Figura 02: Possíveis rotas de fármacos no meio ambiente.....	19
Figura 03: Mapa de localização dos hospitais estudados na cidade de Novo Hamburgo/RS, com seus respectivos pontos de localização georreferenciados. O Hospital Geral é tratado como Hospital Municipal, por ser administrado pelo município.....	22
Figura 04: Garrafa esterilizada utilizada para coleta das amostras.....	23
Figura 05: Testes TSI, MIO e Citrato de Simmons utilizados para triagem das colônias selecionadas	25
Figura 06: Gráfico da divisão (porcentagem) dos isolados de interesse encontrados nos efluentes dos hospitais avaliados em relação ao total (100 isolados).....	28
Figura 07: Gráfico da quantidade de isolados encontrados no Hospital Municipal, com n = 35.....	29
Figura 08: Gráfico da quantidade de isolados de interesse encontrados no Hospital Regina, com n= 28.....	29
Figura 09: Gráfico da quantidade de isolados de interesse encontrados no Hospital Unimed, com n = 37.....	30
Figura 10: Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos entre os isolados bacterianos de interesse deste trabalho encontrados no efluente. No Hospital Municipal foram avaliados 12 isolados, no Hospital Regina, 15 isolados e no Hospital Unimed, 17 isolados.....	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

% - Percentual
°C – Grau Celsius
µg – Micrograma
µL – Microlitro
µm – Micrometro
µM – Micromolar
AMC - Amoxicilina + Clavulanato
AMK – Amicacina
AMP - Ampicilina
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATP – Trifosfato de Adenosina
*bla*_{CTX-M} – gene que codifica a Enzima Cefotaximase
*bla*_{SHV} – gene que codifica a enzima Sulfidril Variável
*bla*_{TEM} - gene que codifica a enzima Temoniera
BR – Rodovia Brasil
CAZ - Ceftazidima
CCIH - Comissões de Controle de Infecção Hospitalar
CIP - Ciprofloxacina
cm – Centímetro
CPM - Cefepime
CTX - Cefotaxima
DATASUS - Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde
DNA – Ácido desoxirribonucleico
dNTP – Desoxirribonucleotídeo trifofato
EAS - Estabelecimentos de Assistência à Saúde
EMB – Ágar Eosina Azul de Metileno
ESBL - β - lactamases de espectro estendido
et al – e colaboradores
ETA – Estação de Tratamento de Água
ETP - Ertapenem
FOX - Cefoxitina
GEN - Gentamicina
IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IDH – Índice de Desenvolvimento Humano
IPM - Imipemem
ISO - Organização Internacional de Normalização
Km – Quilômetro
Km² – Quilômetro quadrado

L – Litro
LIA - Ágar Ferro Lisina
MBL - Metalo- β -lactamases
Me – Efluente do Hospital Municipal
mg – Miligrama
MIO - Ágar Motilidade Indol Ornitina
mL – mililitro
mm – Milímetro
mM – Milimolar
MRSA - *Staphylococcus aureus resistente à meticilina*
MS – Ministério da Saúde
NBR - Norma Brasileira de Regulamentação
NOR - Norfloxacin
Oligo – Oligonucleotídeo
OMS - Organização Mundial da Saúde
OXA – Oxacilina
PB - Polibutileno
PCA – Plate Count Ágar
PCR – Reação da polimerase em cadeia
PEAD – Polietileno de Alta Densidade
PEX - Polietileno reticulado
PNUD - Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento no Brasil
PVC – Policloreto de Vinila
Re – Efluente do Hospital Regina
SA – *Staphylococcus sp.* encontrado na água do Sistema de Abastecimento de Água
SAA - Sistema de Abastecimento de Água
TET – Tetraciclina
TIC - Ticarcilina + Clavulanato
TSA – Ágar Triptona de Soja
TSI - Ágar Tríplice Açúcar Ferro
Ue – Efluente do Hospital Unimed
V – Volt
 β – Beta

1. INTRODUÇÃO

Desde a introdução do mais antigo antimicrobiano até o mais recente, vem se registrando uma pressão seletiva sobre os microrganismos causada, principalmente, pelo uso indiscriminado dos mesmos, resultando no desenvolvimento de espécies resistentes nos mais diversos ambientes. A resistência bacteriana é considerada um problema de saúde pública mundial, realidade para a qual têm sido propostas diversas iniciativas de controle. Assim, a contínua emergência de microrganismos resistentes nas instituições de saúde constitui-se um grande desafio, mobilizando órgãos nacionais e internacionais de vigilância e controle epidemiológicos (Oliveira e Silva, 2008).

Nas últimas décadas, a ocorrência de pacientes hospitalizados colonizados ou infectados por microrganismos multirresistentes tem merecido atenção das Comissões de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH) e dos serviços de saúde, especialmente considerando a diversidade da condição clínica dos pacientes e a variedade de condutas profissionais. Vale acrescentar que o índice dessas infecções representa um dos indicadores de qualidade no cuidado à saúde (Ferrareze et al, 2006).

O esclarecimento do papel ambiental na aquisição de infecções causadas por bactérias multirresistentes se destaca pela necessidade de estratégias múltiplas de controle da disseminação de bactérias resistentes aos antimicrobianos; problema mundial que eleva tempo de internação, custos e morbimortalidade. Portanto, torna-se relevante avaliar o papel dos fatores ambientais nas infecções para proposição de estratégias que reduzam a contaminação e a disseminação de patógenos (Oliveira e Damasceno, 2010). Além das condições propiciadas pelo próprio ambiente hospitalar, no que tange os efluentes, é sabido que nas redes de canalização do sistema de abastecimento de água, em sua maioria, existe a formação de biofilmes que há bastante tempo já devem estar instalados nas mesmas, contribuindo para manutenção de populações bacterianas neste ambiente e propiciando a troca de material genético.

A disseminação das infecções associadas aos cuidados de saúde é complexa e multifatorial. A presença de bactérias multirresistentes serve como parâmetro de avaliação dos métodos e rotinas adotadas no tocante ao controle de infecções hospitalares, bem como do uso adequado de desinfetantes, antimicrobianos e métodos de esterilização permitidos em legislação vigente.

Neste sentido, a abordagem do ambiente na disseminação de bactérias, avaliando-se tanto a água do sistema de abastecimento de água quanto dos efluentes líquidos, visa contribuir para melhor compreensão e definição das recomendações e políticas de controle dentro dos estabelecimentos de saúde, bem como nortear a vigilância e monitoramento da qualidade da água para consumo humano.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais:

Avaliar a presença de bactérias na água proveniente do Sistema de Abastecimento de Água (SAA) que chega aos hospitais localizados em um município da região do Vale dos Sinos bem como de bactérias e genes de resistência nos seus respectivos efluentes líquidos.

2.2 Objetivos Específicos:

1. Avaliar se os efluentes hospitalares liberados para os corpos hídricos de um município do Vale dos Sinos apresentam bactérias multirresistentes que pertençam aos gêneros *Pseudomonas sp.*, *Klebsiella sp.*, *Staphylococcus sp.* e *E. coli*;
2. Avaliar a presença dos genes de resistência *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}* e *bla_{CTX-M}* nos isolados dos gêneros *Pseudomonas sp.*, *Klebsiella sp.* e *E. coli* oriundas dos efluentes líquidos liberados pelos hospitais nos corpos hídricos deste município;
3. Avaliar se a água tratada e enviada pelo Sistema de Abastecimento de Água (SAA) para os hospitais abastecidos por ele, neste município do Vale dos Sinos, encontra-se livre da presença de bactérias dos gêneros *Pseudomonas sp.*, *Klebsiella sp.*, *Staphylococcus sp.* e da espécie *E. coli*.
4. Avaliar se a água tratada do SAA que chega aos hospitais, neste município do Vale dos Sinos, apresentam bactérias multirresistentes que pertençam aos gêneros *Pseudomonas sp.*, *Klebsiella sp.*, *Staphylococcus sp.* e à espécie *E. coli*.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Microrganismos em água de sistema de abastecimento de água para consumo humano

O tratamento de água tem por objetivo adequar a água bruta, com o melhor custo – benefício possível, a um padrão de potabilidade para consumo humano, sempre estipulado por legislação vigente.

O critério de escolha para a tecnologia de tratamento considera as legislações vigentes, normas de padronização NBR/ISO e os aspectos econômicos. As estações de tratamento de água (ETA) utilizam a tecnologia de tratamento de água denominada ciclo completo e por isso são chamadas de “estações de tratamento convencional”. O ciclo completo inclui as seguintes operações unitárias, conforme figura 01 abaixo:

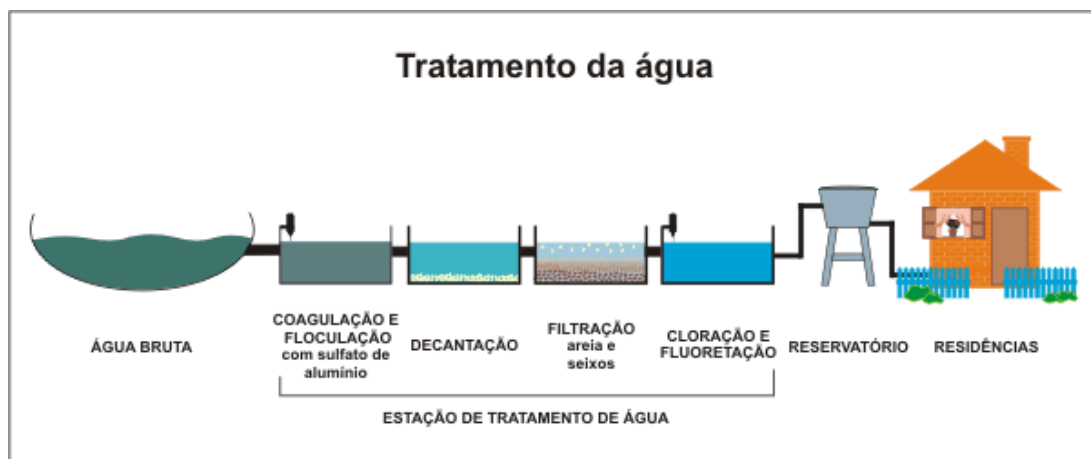


Figura 01: Esquema simplificado de operações unitárias envolvidas no tratamento de água para consumo humano.

A água para abastecimento das cidades segue critérios definidos para atender os requisitos de qualidade de água para um sistema de abastecimento de água (SAA), de acordo com as legislações vigentes. Segundo a Portaria MS n.º 2914/2011 água potável é aquela que atende aos padrões de potabilidade referidos na mesma e que não ofereça riscos à saúde humana. Ainda, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2006), a água que entra no sistema de distribuição do SAA deve ser microbiologicamente segura e deveria ser

biologicamente estável, mantendo-se a qualidade microbiológica da água desde o ponto de produção até o ponto de consumo.

Entretanto, mudanças indesejadas na qualidade microbiana da água potável nos sistemas de distribuição podem ocorrer causando efeitos adversos no próprio sistema e para os consumidores, haja vista que durante a distribuição pode ocorrer crescimento excessivo de bactérias que podem levar a deterioração da água potável em termos de segurança e percepção do consumidor (Sun et al, 2014).

A presença de bactérias por si só não é um problema, desde que nenhum organismo patogênico esteja presente. Existem bactérias na água potável proveniente do sistema de abastecimento de água mesmo em números relativamente altos (10^3 - 10^6 células/mL) sem grandes consequências para a saúde humana (Prest et al, 2016; Vital et al, 2012a). Porém, bactérias indesejadas ou o crescimento bacteriano excessivo em redes de sistemas de distribuição de água podem causar deterioração da qualidade microbiana durante o estoque e transporte desta água. Primeiramente, um número relevante de patógenos oportunistas como *Pseudomonas aeruginosa*, *Legionella pneumophila*, *Mycobacteria sp.*, *Aeromonas hydrophila*, *Klebsiella pneumoniae*, e *Campylobacter sp.* possuem a capacidade de crescer em baixas concentrações de nutrientes em redes de sistemas de distribuição de água (Szewzyk et al, 2000; Flemming et al, 2002; Vital et al., 2008, 2012b; Wang et al, 2013).

As mudanças na qualidade microbiológica da água são resultados de interações complexas entre vários microrganismos regulados por acesso aos nutrientes limitantes de crescimento disponíveis, resposta às condições ambientais (como temperatura da água, por exemplo), presença de desinfetante residual e outras substâncias inibitórias, adesão de bactérias às paredes do encanamento do sistema de distribuição, deposição de partículas, resuspensão de sedimentos e formação de biofilmes, entre outros fatores (Prest et al, 2016).

A composição e a concentração de substratos na água do sistema de abastecimento de água estão inerentemente relacionadas à estabilidade biológica, através da promoção ou limitação do crescimento bacteriano na água, pois as

concentrações dos nutrientes orgânicos e inorgânicos disponíveis são parâmetros essenciais nos processos que regulam a competição bacteriana (Prest et al, 2016).

Além da concentração de nutrientes, o tipo de material que compõe a rede de distribuição do SAA também influi na qualidade e estabilidade microbiológica da água, porque pode influir na formação de biofilmes nas superfícies internas dos encanamentos que compõe essa rede, que podem ser compostas por diversos materiais como metais (por exemplo, ferro fundido e aço inoxidável), cimento e polímeros sintéticos como PVC e PEAD. Ao longo destes encanamentos pode haver diversos níveis de crescimento microbiano, densidades e comunidades bacterianas (Yu et al, 2010; Wang et al, 2014).

Estudos têm demonstrado que os encanamentos compostos de ferro permitem densidades bacterianas maiores e que as suas corrosões levam à liberação de partículas e a formação de depósitos nos quais componentes orgânicos e inorgânicos são adsorvidos e que atuam como sítios de fixação, onde as bactérias ficam protegidas dos desinfetantes residuais (Niquette et al, 2000; Norton e LeChevallier, 2000; Morton et al, 2005; Prest et al, 2016).

Encanamentos compostos por polímeros sintéticos como PEX, PB ou PVC liberam substâncias orgânicas biodegradáveis modificando os nutrientes disponíveis para o crescimento bacteriano, então, mesmo que a água bruta seja transformada em água potável em uma ETA para posterior distribuição à população, a liberação de substâncias adicionais pode causar instabilidade bacteriana. Estudos demonstraram que um aumento de 200% na concentração de ATP depois da incubação da água em PVC. (Bucheli-Witschel et al, 2012; Van der Kooji e Veenendaal et al, 2001).

Além destes fatores, o material dos encanamentos influencia a comunidade bacteriana principalmente nos seus estágios iniciais de desenvolvimento. Assim sendo, a construção de novas redes de distribuição do SAA ou a troca de alguns segmentos do encanamento da rede do SAA afeta profundamente a estabilidade biológica da água distribuída por tais sistemas (Henne et al, 2012; Prest et al, 2016).

As mudanças nas condições hidráulicas da rede de distribuição do SAA são frequentes e desempenham um papel importante nas interações entre água, sedimento e fases de biofilmes. Períodos de baixo consumo de água resultam em fluxos de baixa velocidade ou mesmo estagnação da água em algumas partes do sistema de distribuição, permitindo a deposição de partículas, aumentando o tempo em que a água fica no sistema de distribuição e oferecendo condições favoráveis ao crescimento bacteriano. Por outro lado, em períodos de alto consumo de água, expurgos na rede de distribuição, ou mal funcionamento da rede de distribuição como vazamentos, inevitavelmente, provocam destacamento aumentado de biofilmes e possíveis resuspensões de sedimentos. (Liu et al, 2013a, Liu et al, 2013b, Boxall et al, 2007). Isto causa aumento na dispersão bacteriana e na composição da comunidade bacteriana na água encanada, afetando a estabilidade biológica (Prest et al, 2016).

As boas práticas de construção, manutenção e operação da rede de distribuição do SAA são igualmente essenciais na manutenção da estabilidade biológica da água. A manutenção de pressão suficiente na rede protege contra contaminações externas e, a boa manutenção dos encanamentos, mantendo a integridade física destes e limitando vazamentos, atuam no mesmo sentido (Prest et al, 2016, Smeets et al, 2009).

A temperatura da água é um fator de influência essencial na cinética de crescimento bacteriano e nos processos de competição. O aumento da temperatura da água está, geralmente, associado ao aumento da abundância bacteriana na água presente na rede de distribuição do SAA (Liu et al, 2013a).

Além disso, a temperatura da água também pode afetar a composição da comunidade bacteriana, provendo vantagens competitivas para espécies específicas de bactérias, em intervalos de temperatura definidos, incluindo espécies patogênicas (Vital et al, 2012b).

Portanto, há uma chance maior de problemas associados ao crescimento bacteriano nas redes de água nos períodos de verão (com temperaturas mais altas), tais como riscos sanitários, deterioração dos aspectos organolépticos, mau funcionamento das instalações da rede, extrapolação dos limites legais dos

parâmetros de qualidade de água definidos em legislação, como, por exemplo, contagem de bactérias heterotróficas (Prest et al, 2016).

A cloração tem por objetivo eliminar microrganismos indesejáveis que possam ter permanecido na água tratada, liberando nela, intencionalmente, teores de cloro residual ativos para manter a sua estabilidade biológica durante sua distribuição (Bezerra e Gutemberg, 2012). No Brasil, os teores de cloro livre residual na rede de distribuição do SAA varia de 0,2 mg/L até 2 mg/L (Brasil, 2011).

Apesar da presença do residual de desinfetante na rede de distribuição do SAA, os microrganismos podem aderir-se e colonizar, prontamente, a superfície interna nos encanamentos da rede de distribuição, formando biofilmes (Doutetelo et al, 2014). Chen et al (2015) estudaram o impacto da concentração de cloro como desinfetante na adesão microbiana para a formação de biofilmes em redes de distribuição de SAA e observaram que a cloração em níveis moderados promoveu a adesão microbiana, enquanto que com níveis mais altos a adesão microbiana ficou limitada.

Xie et al (2015) avaliando o impacto da desinfecção em comunidade bacteriana de biofilme na água para consumo humano observou que o impacto na comunidade bacteriana depende da dosagem do desinfetante e que a diversidade bacteriana pode ser promovida por baixas dosagens de desinfetantes, mas reduzida com dosagens mais altas. Assim sendo, o impacto do desinfetante nas redes de distribuição de SAA depende do tipo de desinfetante e da dosagem deste.

Botsaris et al (2015) avaliou a presença de bactérias cultiváveis na água da rede de distribuição do SAA da cidade de Limassol, no Chipre. Coliformes totais foram encontrados em 25% das amostras, além de *Pseudomonas sp.* e *Enterococcus sp.* Não foi evidenciada a presença de *E. coli* neste estudo. Através da identificação molecular do gene 16S rRNA foram encontradas as bactérias dos gêneros como *Delfitia sp.*, *Bacillus sp.*, *Enterococcus sp.*, *Aeromonas sp.*, *Corynebacterium sp.*, além da confirmação dos gêneros *Pseudomonas sp.* e *Enterococcus sp.*

Além do Brasil o gênero *Pseudomonas sp.* já foi isolado em amostras de água do SAA em países como Alemanha (Emtiazi et al, 2004), Coréia (Lee et al, 2006), África do Sul (September et al, 2007) e Portugal (Menaia et al, 2008).

A presença de *Aeromonas sp.* na água distribuída pelo SAA está associada à produção de dimetil polisulfitos que altera o odor da água. A identificação molecular de *Aeromonas sp.* revelou sua presença na Escócia (Gavriel et al., 1998), nos Estados Unidos, Austrália (Bomo et al, 2004), Coréia (Lee et al, 2006), África do Sul (September et al, 2007) e no Brasil (RAZZOLINI et al, 2008).

Em Araraquara/SP Gaspar – Grillo et al (2012) isolaram micobactérias em 69,89% das amostras de água tratada e justificaram o resultado encontrado pela resistência do gênero *Mycobacterium sp.* à cloração. Esta resistência é devida à parede celular complexa das espécies pertencentes ao gênero *Mycobacterium sp.* e a resistência deste gênero ao cloro dificulta o controle nos sistemas de distribuição do SAA, pois estes microrganismos podem ser isolados de diversos pontos da rede de distribuição (Santos et al, 2005). No norte do estado do Paraná encontrou-se em água proveniente do SAA bactérias da espécie *E. coli* do tipo enterotoxigênica contendo perfil genotípico para fatores de colonização em humanos e produção de toxinas (Cestari et al, 2016).

3.2 Microrganismos em efluente hospitalar

3.2.1 Bastonetes Gram – negativos fermentadores

Os bastonetes Gram - negativos fermentadores são microrganismos que pertencem a um grupo heterogêneo de bacilos fermentadores da glicose, constituído atualmente por 42 gêneros e mais de 100 espécies. Algumas destas são patogênicas, podendo causar enteroinfecções no homem e animais, outras são consideradas patógenos oportunistas, frequentemente relacionados a infecções associadas à assistência à saúde (Anvisa, 2017).

Caracterizam-se por serem bacilos anaeróbios facultativos, produzindo ácido a partir da glicose, catalase positivo, oxidase negativo e usualmente reduzem nitrato a nitrito. Alguns dos principais gêneros pertencentes a este grupo são a

Klebsiella sp., *Escherichia sp.*, e *Enterobacter sp.* todos da família *Enterobacteriaceae* (Clark et. al, 2010).

Como se sabe o gênero *Klebsiella sp.* é definido como bacilos Gram – negativos, não móveis, geralmente encapsuladas e em forma de bastão, que produzem lisina carboxilase mas não produzem ornitina carboxilase. (Moreira e Freire, 2011).

Além destes fatos, as espécies que compreendem o gênero *Klebsiella sp.* são ubíquas na natureza e estão presentes em três habitats comuns: o meio ambiente onde podem ser encontradas em água, solo e plantas; na superfície mucosa de mamíferos e em simbiose com insetos (Podschn e Ullmann, 2009; Pinto – Tomas et al, 2009).

Este gênero possui duas espécies principais *K. oxytoca* e *K. pneumoniae* que são frequentemente isoladas de materiais biológicos humanos (Trabulsi e Alterthum, 2008). A produção de indol a partir do triptofano pode ser utilizada para diferenciar as duas espécies, sendo *K. pneumoniae* indol negativa e *K. oxytoca* indol positiva.

K. pneumoniae constitui-se de um patógeno oportunista que pode ser encontrado no ambiente, assim como também coloniza a microbiota natural do intestino, faringe, boca, e pele em mamíferos (Mungloo-Rujubali et al, 2013). Em humanos, a *K. pneumoniae* pode colonizar o trato gastro-intestinal, bexiga, pele e faringe; o que pode causar várias doenças como, por exemplo, pneumonia, tromboflebite e infecção do trato urinário (Zhao et al, 2010).

Dentre as infecções causadas por enterobactérias, *K. pneumoniae* destaca-se entre os agentes infecciosos sendo causa de 35,7% de infecções do trato inferior respiratório de pacientes ventilados em unidades de terapia intensiva de um hospital no Brasil (Medell et al, 2012).

A *K. pneumoniae* pode ser encontrada em locais como água, solo, plantas e esgoto e, como já sugerido, sua colonização em humanos provavelmente ocorre por contato com diversas fontes ambientais.

Na última década uma nova variante hipermucoviscosa de *K. pneumoniae* foi descrita. A maioria dos isolados de *K. pneumoniae* é sensível a maioria dos

antimicrobianos, contudo, variantes hipervirulentas e multirresistentes também já foram descritas (Shon et al, 2013). A nova variante hipermucosa, conhecida hoje como *K. variicola*, é um bacilo Gram – negativo que foi descrito em 2004 (Rosenblueth et al, 2004). Atualmente, esta bactéria é conhecida como endofítica em plantas, simbiote em insetos e patógeno em humanos (Garza – Ramos et al, 2015b).

Atualmente, alguns dos correntes testes fenotípicos disponíveis são insuficientes para distinguir entre *K. variicola* e *K. pneumoniae*, como espécies (Berry et al, 2015; Garza – Ramos et al, 2015a), levando a uma subestimação das infecções por *K. variicola* e *K. quasipneumoniae*, já que são erroneamente identificadas como *K. pneumoniae* (Chen et al, 2016; Seki et al, 2013). De fato, não há teste bioquímico capaz de diferenciar concomitantemente estas espécies de *Klebsiella sp.* nas rotinas dos laboratórios de microbiologia, em especial, os de microbiologia clínica (Brisse et al, 2014; Rosenblueth et al, 2004).

Como exemplo, o teste de fermentação de adonitol distingue *K. pneumoniae* (adonitol positivo) de outras duas espécies, mas não consegue diferenciar entre *K. variicola* e *K. quasipneumoniae* (adonitol negativo) (Garza – Ramos et al, 2015a). Além disso, tais traços fenotípicos são características instáveis, pois já foram observados isolados de *K. variicola* adonitol positivo e *K. pneumoniae* adonitol negativo, promovendo-se, assim, identificações equivocadas (Alves et al, 2006).

A *Escherichia coli* (*E. coli*) é uma espécie que possui grande importância clínica, por se tratar de uma bactéria termotolerante de origem exclusivamente fecal (Cabral, 2010). Caracterizam-se como bactérias capazes de fermentar a lactose com produção de ácido e gás, são bastonetes aeróbios ou anaeróbios facultativos (de Oliveira et al, 2016). Possui por padrão não utilizarem o citrato como fonte única de carbono e por fermentarem a glicose, sendo denominadas fermentadoras e patógenas oportunistas (Ha, 2010). Está associado à infecção intestinal, tanto em adultos como em crianças, e sua proliferação está em grande parte vinculada com a água (Cestari et al, 2016). As bactérias *E. coli* são potencialmente resistentes a

múltiplos fármacos, isso devido a seu amplo contato com estes agentes químicos (Clark et al, 2010).

As bactérias do gênero *Enterobacter sp.* possuem como características motilidade, fermentadora de lactose, teste de vermelho de metila negativo e teste de Voges - Proskauer positivo (Kumar, 2012). Estas bactérias podem causar variados tipos de infecções hospitalares e adquiridas na comunidade tais como pneumonia, infecções urinárias, bacteremia e infecções em abscessos.

3.2.2 Bastonetes Gram – negativos não – fermentadores

Bacilos gram-negativos não fermentadores são microrganismos aeróbios e incapazes de utilizar carboidratos como fonte de energia através da fermentação. A maioria é oxidase positiva e móvel. As bactérias deste grupo são consideradas oportunistas, o que possui grande importância clínica principalmente em hospitais em unidades de terapia intensiva, em procedimentos invasivos. Dentre os principais gêneros deste grupo encontram-se *Acinetobacter* e *Pseudomonas* (Anvisa, 2017).

Acinetobacter e *Pseudomonas* estão presentes no meio ambiente, sendo considerados patógenos oportunistas possuindo grande importância clínica, principalmente em ambientes hospitalares, devido ao desenvolvimento recente de mecanismos de resistência aos antimicrobianos e a disseminação desses mecanismos (Anvisa, 2017).

O gênero *Acinetobacter* é um grupo bactérias Gram - negativas não fermentadoras e sem motilidade pertencentes à família *Moraxellaceae*. Possui como habitat natural a água e o solo; em humanos pode colonizar lesões na pele, o trato respiratório e o gastrointestinal. Está comumente associada aos pacientes que estão intubados (respiração artificial), possuem linha de monitoração intravenosa (cateteres venosos), ou sonda vesical de demora (sonda urinária) causando infecções nos respectivos sítios (Jaggi, 2013).

A. baumannii é um dos principais representantes deste gênero, sendo ele um patógeno oportunista que participa de uma gama de infecções hospitalares como bacteremia, meningite e infecções do trato urinário. Sua maior prevalência está relacionada a pneumonia associada à ventilação mecânica principalmente em

unidades de terapia intensiva. Os antimicrobianos carbapenêmicos foram utilizados para tratar infecção por este microrganismos. Entretanto, altas taxas de resistência a estes antimicrobianos têm sido relatadas limitando as opções terapêuticas (Martins e Barth, 2013). No gênero *Acinetobacter* spp., a resistência aos antimicrobianos carbapenêmicos está relacionada à perda de porinas, mas de forma mais significativa à produção de β - lactamases da classe D (OXA - Carbapenemases) e menos frequentemente à produção de β -lactamases de classe B (metalo- β -lactamases – MBL) (Poirel e Nordmann 2006).

O gênero *Pseudomonas* caracteriza-se por ser um grupo de bactérias aeróbias, não fermentadoras, Gram - negativas, móveis através de um flagelo polar. A maioria é encontrada na água e no solo, e no meio ambiente (Kumar, 2012). Como as bactérias do gênero *Pseudomonas* sp. são ubíquas, ou seja, onipresentes, podem ser encontradas em uma variedade de ambientes devido a sua mínima exigência nutricional, sendo capazes de utilizar diferentes compostos orgânicos como fonte de energia. Algumas espécies podem ser encontradas em águas superficiais e esgoto, inclusive (Arruda, 2013; Santos, 2016).

A *P. aeruginosa* é uma das mais prevalentes em hemoculturas do trato respiratório em pacientes internados em hospitais (Anvisa, 2017). O mecanismo mais importante de resistência desta bactéria é a produção de enzimas β - lactamases (Santos et al, 2015). A resistência a antimicrobianos se dá pela hiperexpressão de sistemas de efluxo, pela alteração na permeabilidade da membrana e pela síntese de proteínas de ligação à penicilina com baixa afinidade por β - lactâmicos. Em *P. aeruginosa* todos esses mecanismos podem existir simultaneamente (Strateva e Yordanov, 2009).

P. aeruginosa é a principal causa de infecções hospitalares dentre os bacilos Gram – negativos não – fermentadores de glicose, estando sob contínua pressão seletiva em ambientes hospitalares e é considerada pela comunidade científica internacional como um patógeno multirresistente (Santos et al, 2015).

P. mendocina foi isolada em Mendoza, Argentina, em amostras de solo e água. É uma bactéria ambiental e raramente é encontrada em espécimes clínicos ou reportada como patógeno humano (Nseir et al, 2011). Esta bactéria, além de casos

de doença em humanos também é descrita como utilizada na biorremediação de efluentes industriais (Kanekar et al, 2002), biorremediação de solos contaminados (Kao et al, 2014) e produção de biodiesel (Yao et al, 2016).

Referente aos achados de *P. mendocina* como patógeno em humanos tem – se como primeiro relato deste microrganismo causando endocardite infecciosa em humanos em 1992 (Aragone et al, 1992), sepse (Nseir et al, 2011) e espondilocistite (Wang et al, 2005). Em 2010 *P. mendocina* foi isolada da superfície de um sanitário feminino em hospital de Portugal e possuía o gene *bla_{IMP-8}* (Santos et al, 2010).

3.2.3 Gênero *Staphylococcus* sp.

Estafilococos são caracterizados como microrganismos Gram-positivos, imóveis, de formato esférico, com diâmetro variando de 0,5 a 1,5 μm . Apresentam-se isolados aos pares, em cadeias curtas ou agrupados com aspecto semelhante a um cacho de uvas. Possuem metabolismo respiratório e fermentativo, atuando sobre carboidratos com produção de ácidos. Podem crescer entre 7°C a 48 °C, com um ótimo entre 30°C a 37°C (Ferreira, 2015; Hennekinne et al, 2010). Formam colônias normalmente grandes (1 a 2 mm de diâmetro) e cremosas, com pigmentos que variam do branco a vários tons de amarelo, dependendo da espécie (Cordeiro, 2011).

São anaeróbios facultativos, produzem a enzima catalase (Martins, 2012). Os estafilococos são capazes de produzir enzimas e citotoxinas, tais como hemolisinas, nucleases, proteases, lipases, hialuronidases, collagenases, fibrolisina, coagulase e β – lactamases. Estas enzimas e toxinas são encontradas em elementos genéticos como plasmídeos, transposons e profagos (Ferreira, 2015). A atividade da coagulase é considerada um fator de virulência, pois o coágulo consiste em um acúmulo de fibrina ao redor das células bacterianas que isola a área infectada, o que dificulta o acesso das células do sistema imune do hospedeiro às bactérias.

O gênero *Staphylococcus* sp. está amplamente distribuído no ambiente, podendo ser encontrado em ar, poeira, esgoto, água, superfícies ambientais, em

seres humanos e animais (Hennekinne et al, 2010). É responsável por um grande número de infecções bacterianas no homem (Ferreira, 2015), sendo dividido em dois grandes grupos com base na produção da enzima coagulase. O primeiro grupo, conhecido como estafilococos coagulase - positiva, é representado, principalmente, pelo *S. aureus*. O segundo grupo, chamado estafilococos coagulase - negativa, é compreendido por várias espécies como *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus*, *S. lugdunensis*, *S. cohnii*, *S. schleiferi*, *S. simulans*, *S. hominis*, *S. warneri*, *S. capitis*, *S. caprae* e *S. xylosus* (Cunha e Pereira, 2009).

Staphylococcus aureus fermenta manitol e é coagulase positivo. É uma das principais bactérias responsáveis por várias infecções como dermatite, infecções pós – operatórias, síndrome da pele escaldada, infecções associadas a cateteres e síndrome do choque tóxico, em hospitais e comunidades (Kumar et al, 2014).

A habilidade de *S. aureus* multirresistente (*S. aureus* resistente à meticilina - MRSA) permanecer em diferentes ambientes recebeu atenção especial das autoridades em saúde pública. Várias investigações revelaram a habilidade deste patógeno em persistir em objetos inanimados e ambientes, tais como papel moeda e esgoto, resultando na transferência do patógeno a indivíduos susceptíveis através da exposição a estes objetos (Kumar et al, 2014).

MRSA causa mais de 80 mil infecções severas e em torno de 11 mil mortes por ano e é o líder de infecções hospitalares mundialmente (Barber et al, 2017). A bacteremia causada por MRSA tem mortalidade aproximada de 30%. Vancomicina e daptomicina são, atualmente, as escolhas principais para o tratamento de MRSA, contudo, cada um destes agentes tem suas limitações. A administração de doses mais elevadas de vancomicina, especialmente em tratamentos combinados com outros fármacos nefrotóxicos, exige monitoramento cuidadoso da função renal. (Murray et al, 2013; Bosso et al, 2011).

Daptomicina é uma alternativa mais cara à vancomicina e está associada à rhabdomiólise. Terapias mais duradouras com daptomicina estão associadas com o aumento nos níveis de creatina fosfoquinase (Bhavanni et al, 2010).

Barber et al (2017) avaliou o uso de ceftaroline, uma cefalosporina para tratamento de MRSA e concluiu que ela pode ser usada de forma eficiente no

tratamento de bacteremias causadas por MRSA, incluindo aqueles isolados com MIC aumentado para os tratamentos convencionais. De acordo com este autor, a ceftaroline pode ser usada sozinha ou em combinação com outros agentes antimicrobianos devendo, esta cefalosporina, ser considerada para tratamento de MRSA quando os agentes de primeira linha não foram eficientes no tratamento.

3.3 Problemática do efluente hospitalar

Nos Estabelecimentos de Assistência à Saúde (EAS), entre eles hospitais e postos de saúde, há constante geração de resíduos, consumo de água elevado e consequente descarte de efluentes que necessitam de uma destinação adequada (Prado et al, 2007). A geração de efluentes líquidos nos EAS provém de diversas atividades, como por exemplo: águas de lavagem de materiais contaminados, de objetos de uso pessoal, de procedimentos clínicos, dos funcionários de serviços de saúde, dos visitantes destes serviços e dos pacientes (Chagas, 2011).

Os EAS geram efluentes a partir das águas servidas de refeitórios, das águas dos dejetos de limpeza de superfícies e pisos misturada a soluções desinfetantes, das águas da lavanderia, dos resíduos de procedimentos do centro cirúrgico, dos ambulatórios, do laboratório de análises clínicas. (Chagas, 2011). EAS possuem diversas instalações que o ambiente de saúde contempla, às quais produzem efluentes líquidos gerando dessa forma dispersão de água acompanhado de resíduos de antibióticos para o meio ambiente, o qual é contaminado (de Faria, 2015).

Os antimicrobianos geram uma elevada pressão seletiva sobre as bactérias, eliminando as cepas sensíveis e consequentemente gerando a proliferação e disseminação de cepas resistentes (Berger-Bachi, 2002). Resíduos de antimicrobianos oriundos de efluentes hospitalares ou estabelecimentos de saúde em geral, contribuem para a permanência de populações com mecanismos de resistência intrínseca ou adquirida no ambiente. No segundo caso, são as principais responsáveis pela transferência horizontal de genes de resistência, o que proporciona a disseminação na população bacteriana (Cattoir et al, 2008).

Genes de resistência são sequências de DNA codificadas que conferem resistência. A pressão seletiva originada pela presença de resíduos de antimicrobianos no meio ambiente pode aumentar as populações de bactérias carreadoras destes genes (Pallecchi et al, 2008).

Um grave problema de resistência antimicrobiana envolvendo resíduos de EAS é que bactérias deste ambiente possuem a habilidade de transferir genes de resistência para outras espécies. Existem relatos de transferências de plasmídeos conjugativos e translacionais entre diferentes espécies de microorganismo resistentes aos antimicrobianos nesses ambientes (Nascimento e Araújo, 2014). Assim sendo, Pauwels e Verstraete (2006) propuseram em seu estudo que a liberação de resíduos oriundos de hospitais que continham bactérias sensíveis ou resistentes e antimicrobianos, deve ser reduzida ao máximo possível a fim de evitar a transferência de material genético. Outras medidas de controle também foram propostas, como a implementação de melhorias no tratamento da água, esgoto e resíduos contaminados em geral (Dolliver e Gupta, 2008).

3.4 Disseminação da resistência pelo efluente hospitalar

Os mecanismos de resistência bacterianos podem ser intrínsecos ou adquiridos (mutações genéticas, aquisição de plasmídeos ou outros mecanismos). A maior parte dos genes que codificam as enzimas responsáveis pela resistência antimicrobiana encontra-se em regiões móveis do DNA bacteriano, como plasmídeos e transposons, auxiliando assim a disseminação dos genes de resistência entre bactérias de igual ou diferente espécies (Strateva e Yordanov, 2009).

As β - lactamases de espectro estendido (ESBL) são enzimas produzidas pelas bactérias Gram - negativas. As ESBLs foram primeiramente encontradas em *K. pneumoniae* e posteriormente difundidas para diferentes gêneros de *Enterobacteriaceae*. A maior parte das ESBLs evoluiu a partir de mutações genéticas de β - lactamases clássicas (TEM-1, TEM-2 e SHV-1) gerando principalmente variantes de ESBLs do tipo TEM e SHV. Entretanto, em 1990, uma

nova família de ESBLs surgiu, principalmente em *E. coli* denominada CTX-M, tornou-se uma enzima prevalente em diversos países (Oliveira et al, 2009).

A SHV-1 (Sulphydril reagent variable) constitui-se de β - lactamase mediada por plasmídeos que foi descrita em cepas de *K. pneumoniae* e *E. coli*. Os plasmídeos que codificavam essa enzima foram isolados de *K. pneumoniae* na Alemanha e a β - lactamase isolada ficou conhecida como SHV-2 (Bradford, 2001).

A utilização de antimicrobianos em ambientes hospitalares causa multirresistência em determinadas populações bacterianas. A poluição é um agravante podendo aumentar a presença dessas populações na rede pública de esgoto. A composição bacteriana do efluente hospitalar é notadamente diferente do doméstico, e está em concentração suficiente para causar contaminações (Dremont e Hadjali, 2005). A contaminação ambiental com antimicrobianos contribui para o aumento da proporção de bactérias resistentes e a resistência pode, por sua vez, comprometer a eficácia da terapia antimicrobiana (Li et al, 2016).

Em EAS, grandes quantidades de fármacos antimicrobianos e bactérias resistentes são lançados em sistemas de tratamento de águas residuais. Estes antimicrobianos e as bactérias são frequentemente, detectados em lodos de estações de tratamento e águas residuais (Ding et al, 2011). As estações de tratamento de águas residuais constituem uma importante rota através da qual os genes de resistência a antimicrobianos se disseminam em ecossistemas naturais (Nölvak et al, 2013).

Após a manipulação e administração, os metabólitos são liberados no efluente por meio das excretas dos pacientes e algumas vezes os próprios antimicrobianos são dispostos diretamente nas instalações hidrossanitárias. No momento em que esses fármacos são liberados nos efluentes, e não são eliminados durante o tratamento do esgoto, pode ocorrer a incorporação destes ao ambiente aquático e, eventualmente, alcançarem a água potável. Caso as concentrações destes fármacos se encontrem muito elevadas, os efluentes dos hospitais, o esgoto municipal e as estações de tratamento de esgoto podem transformar-se em reservatórios para a seleção de bactérias resistentes (Li et al, 2016).

Os resíduos de antimicrobianos geram pressão seletiva para as bactérias que se encontram no ambiente, contribuindo para a proliferação de bactérias resistentes aos antibióticos (Akinbowale et al, 2007).

Em estações de tratamento de esgoto há três destinos possíveis para os fármacos (Figura 02)(Bila e Dezotti, 2003):

1°. podem ser biodegradáveis, ou seja, mineralizados a gás carbônico e água, como por exemplo, o ácido acetilsalicílico;

2°. podem passar por algum processo metabólico ou possuem degradação parcial;

3°. podem ser persistentes. Não há um conhecimento por completo sobre as rotas dos fármacos no meio ambiente. A Figura 02 apresenta um esquema que sugere possíveis caminhos, quando descartado no meio ambiente (Bila e Dezotti, 2003).

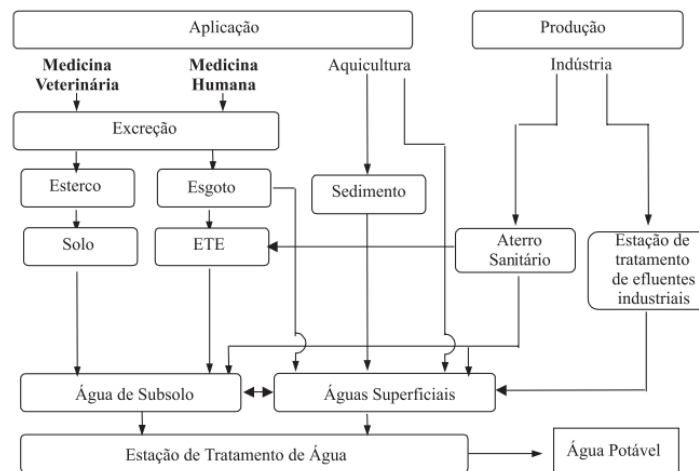


Figura 02: Possíveis rotas de fármacos no meio ambiente. Fonte: Bila e Dezotti, 2003

Os sistemas aquáticos representam um meio importante para a liberação, persistência e disseminação ambiental de bactérias multiresistentes e, conseqüentemente, genes de resistência associados a elementos genéticos transferíveis horizontalmente. Assim, devido à utilização de antimicrobianos, o acúmulo e abundância de outros poluentes, os mecanismos que conferem a resistência as bactérias podem evoluir em sistemas aquáticos. Estes sistemas possuem papel importante na condução e disseminação da resistência antimicrobiana (Taylor et al, 2011).

Desta forma os efluentes hospitalares, constituem uma fração significativa do esgoto sanitário, devendo-se considerar o risco dos componentes orgânicos, infecciosos e tóxicos (Rodriguez-Mozaz et al, 2015).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Caracterização do município

O município de Novo Hamburgo foi fundado em 05 de abril de 1927. Ocupa uma área de 223km², sendo que o acesso principal à cidade é via BR 116. Novo Hamburgo está situado no Vale do Rio dos Sinos, a cerca de 40Km da capital do estado. Pertence à Região Metropolitana de Porto Alegre (Novo Hamburgo, 2016).

Os limites do município são os municípios de Estância Velha, São Leopoldo, Campo Bom, Dois Irmãos, Gravataí, Ivoti, Sapiranga e Taquara. A população estimada pelo DATASUS/IBGE em 2012 é de 239.355 habitantes. O clima de Novo Hamburgo é subtropical, apresentando temperaturas entre -2°C e 40°C, com média anual de 20°C. O município é conhecido como "*Capital Nacional do Calçado*" (Novo Hamburgo, 2016).

O índice de desenvolvimento humano (IDH) do município é de 0,727 de acordo com o Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento no Brasil (PNUD) do ano de 2013. O índice de leitos em hospital geral por 1000 habitantes é de 1,78 (IBGE, 2015).

4.2 Caracterização dos pontos de coleta

As coletas foram realizadas nos três principais hospitais de Novo Hamburgo/RS: Hospital Municipal, Hospital Regina e Hospital Unimed.

O Hospital Municipal atualmente conta com 266 (duzentos e sessenta e seis) leitos, realizando uma média mensal de 1.000 internações hospitalares. Presta atendimento ininterrupto em urgência e emergência, na sua totalidade pelo Sistema Único de Saúde. É um Hospital geral focado no atendimento de Urgência e Emergência, oferece plantão 24 horas nas especialidades de Traumatologia, Clínica Geral, Gineco-obstetrícia, Cirurgia Geral, Cirurgia Vascular, Neurocirurgia, Anestesiologia, Neonatologia e Plantonista de UTI/Intensivista. Possui Unidades de Tratamento Intensivo - UTI Neonatal e UTI Adulto. Realiza internação nas seguintes especialidades: clínica geral, cirurgia torácica, cardiologia, traumatologia, cirurgia

geral, cirurgia vascular, neurologia clínica, neurocirurgia, psiquiatria, obstetrícia, mastologia, anestesiologia, cirurgia plástica, neonatologia, fisiologia.

O Hospital Regina possui ao total 199 leitos e possui como especialidades médicas os atendimentos de emergência adulto e pediátrica; internação de clínicas médica e cirúrgica; áreas de terapia intensiva neonatal, pediátrica, adulto e cardiológica; ala de transplante de medula óssea; centro cirúrgico; centro obstétrico; hospital dia e diagnóstico por imagem.

O Hospital Unimed possui um total de 69 leitos atende as especialidades médicas de obstetrícia, neonatologia, pediatria, clínica médica e clínica cirúrgica.

Os pontos de coleta caracterizaram-se por serem pontos da chegada da água do sistema de abastecimento de água (SAA) nos hospitais, antes de entrada desta no reservatório, e pontos da saída do esgotamento sanitário das unidades de saúde, que abrangiam o esgotamento de toda a planta da unidade, logo antes da dispersão deste no sistema público de esgotamento sanitário. Não houve tratamento prévio do efluente hospitalar, antes da saída para o sistema público de esgotamento sanitário, em nenhum dos pontos de coleta. A identificação de cada um dos hospitais, com seus georreferenciamento, encontram-se no mapa a seguir, conforme figura 03:

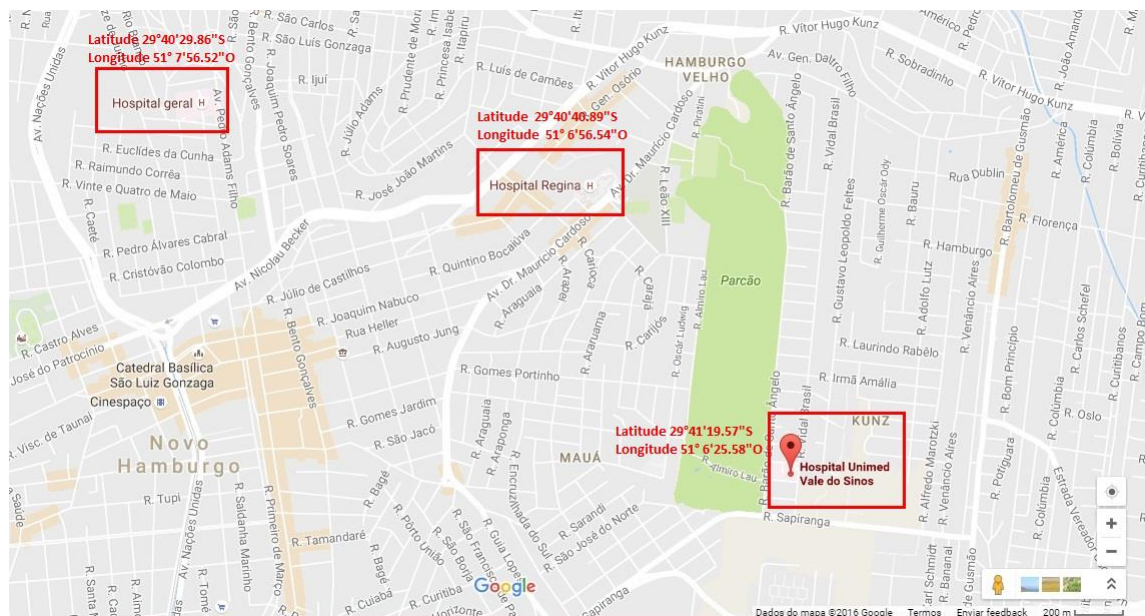


Figura 03: Mapa de localização dos hospitais estudados na cidade de Novo Hamburgo/RS, com seus respectivos pontos de localização georreferenciados. O Hospital Geral é tratado como Hospital Municipal, por ser administrado pelo município.

4.3 Coleta de amostras e identificação de isolados

Para realização do trabalho foram utilizadas amostras de água da rede de abastecimento e efluente coletadas de três hospitais na cidade de Novo Hamburgo/RS. Foram coletados um litro de água do Sistema de Abastecimento de Água (SAA) na torneira de entrada de cada um dos estabelecimentos, bem como um litro de efluente de cada um. As coletas foram realizadas em garrafas de plástico previamente higienizadas, enxaguadas com água destilada e esterilizadas em autoclave. As garrafas eram de polietileno de alta densidade, na cor branca, de primeiro uso e com tampa rosqueável, conforme figura 04.

O ponto de coleta de amostra de efluente, em cada um dos hospitais, correspondeu ao ponto antecedente à entrada dos mesmos no sistema público de esgotamento sanitário para onde toda a água residual final, contendo água residual de todos os setores dos hospitais, era canalizada. O ponto de coleta da água do SAA, em cada um dos estabelecimentos de saúde, foi na torneira junto ao hidrômetro de cada estabelecimento e correspondeu a água que entrava dentro dos hospitais, vindo diretamente do SAA.



Figura 04: Garrafa esterilizada utilizada para coleta das amostras.

Para avaliação microbiológica da água do SAA foi utilizada a técnica de membrana filtrante. Com auxílio de bomba a vácuo, foi filtrado 100mL de amostra através de uma membrana filtrante de 47mm de diâmetro e 0,45 μ m de porosidade estéril da marca SeS, utilizando-se equipamento de filtração à vácuo. A membrana foi removida assepticamente do equipamento de filtração e com auxílio de uma

pinça flambada, colocada sobre a superfície de placas de ágar MacConkey e ágar Sal Manitol. As placas foram incubadas por 24 horas a 37°C.

Para a água do SAA também foi realizada a contagem de bactérias heterotróficas através da técnica de “pour plate” em ágar PCA e avaliação de coliformes totais e *E. coli* pelo método do substrato cromogênico, com uso do kit Colilert® da marca Idexx. Igualmente, na água do sistema de abastecimento, foram realizados os testes físico – químicos cloro residual livre, fluoreto e turbidez.

O efluente foi diluído em água peptonada através da técnica de diluição seriada até a diluição 10^{-6} . Após, foram semeadas alíquotas de 100µL, de cada uma das diluições em ágar Macconkey e ágar Sal Manitol através da técnica de espalhamento em meio sólido, que foram incubadas por 24 horas a 37°C.

Colônias com características morfológicas distintas foram selecionadas de cada meio de cultura, para cada um dos tipos de amostra, e triadas por testes bioquímicos. Para as colônias selecionadas do ágar MacConkey foram realizados os testes de ágar ferro lisina (LIA), ágar tríplice açúcar Ferro (TSI), ágar citrato de simmons, ágar motilidade indol ornitina (MIO), teste de urease, ágar Cetrimide e ágar EMB e oxidase (Figura 05). Para identificação de bacilos Gram negativos não – fermentadores foi utilizado o kit comercial MINI KIT NF da NewProv.

Para as colônias selecionadas do ágar sal manitol foram realizados os testes bioquímicos catalase e coagulase em tubo.

Os testes bioquímicos e todos os meios de cultura utilizados estão descritos detalhadamente no Anexo A. Todos os isolados tiveram sua morfologia celular avaliada pela técnica de coloração de Gram.

Após a identificação bioquímica pelos métodos bioquímicos tradicionais citados, os isolados foram confirmados pelo método Maldi – TOF, equipamento Microflex da marca Bruker, conforme orientações do fabricante. A lista com a confirmação da identificação dos isolados encontra-se no Anexo B.

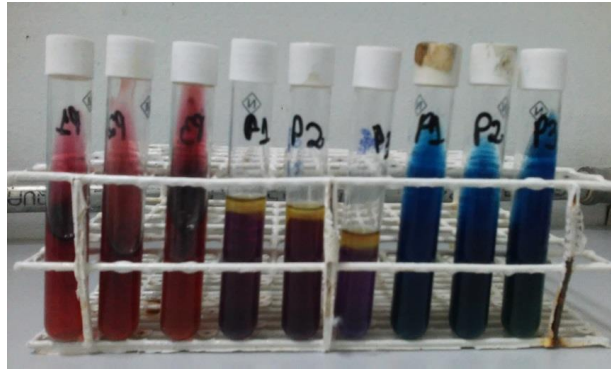


Figura 05: Testes TSI, MIO e Citrato de Simmons utilizados para triagem das colônias selecionadas.

4.4 Avaliação do Perfil de Susceptibilidade aos Antimicrobianos

Os isolados foram semeados em ágar TSA e incubados por 24 horas a 37°C. Após a incubação, uma alçada de colônia de cada isolado avaliado foi suspendida em solução salina estéril 0,85% com turvação correspondente a 0,5 da escala de McFarland. Após suspensão, com auxílio de suabe estéril, os respectivos isolados foram semeados em placas de Petri de 150mm contendo ágar Mueller – Hinton, de modo ao crescimento formar um tapete confluyente na placa.

A sensibilidade aos antimicrobianos foi avaliada pela técnica de disco difusão com os antibióticos gentamicina 10µg, amicacina 30µg, ampicilina 10µg, ciprofloxacina 5µg, ceftazidima 30µg, cefepime 30µg, cefotaxima 30µg, ticarcilina + clavulanato 85µg, imipemem 10µg, amoxicilina + clavulanato 30µg, norfloxacina 10µg, tetraciclina 30µg e ertapenem 10µg. Os discos de antimicrobianos utilizados neste trabalho para avaliação da sensibilidade aos antimicrobianos foram das marcas Oxoid e Sensifar.

O halo ao redor de cada disco de antimicrobiano foi interpretado conforme CLSI 2015 e classificados como sensíveis, sensibilidade reduzida e resistente.

4.5 Extração de DNA das amostras

Os isolados dos gêneros *Klebsiella sp.*, *Pseudomonas sp.* e da espécie *E. coli* tiveram seu DNA extraído com o auxílio da resina quelante Chelex 100 a 5%.

No primeiro dia foi feita a semeadura dos isolados em ágar TSA com incubação das placas a 37°C por 24 horas. No segundo, adicionou-se uma alçada (1

μL) do crescimento bacteriano em eppendorf contendo 200 μL de resina Chelex 100 a 5% (Marca BioRad) e 2 μL de Proteinase K 20mg/mL (Marca bioAmerica).

Os eppendors incubados em banho seco a 56°C (estufa marca DeLeo). Após incubação, homogeneizou-se cada eppendorf por 10s com auxílio de vortex e aqueceu-se cada eppendorf em banho de água a 96°C por 8 minutos (banho de água da marca DeLeo). Após este aquecimento, foram homogeneizados por 10s com auxílio de vórtex de mesa e centrifugados a 12.000 rpm por 3 minutos em centrífuga da Marca Eppendorff modelo Mini Spin.

Após centrifugação foi removido o sobrenadante contendo o DNA e o mesmo foi colocado em um novo eppendorff esterilizado que foi armazenado a – 20°C até sua utilização.

4.6 Amplificação de genes

Os genes de resistência avaliados nos isolados deste estudo foram *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX – M}, e *bla*_{SHV}. As sequências de cada um deles encontram-se no quadro abaixo:

Gene Avaliado	Oligo F	Oligo R	Tamanho produto	Referência
<i>bla</i> _{TEM}	TCGGGGAAATGTGCGCG	TGCTTAATCAGTGAGGACCC	850 pb	Talukdar et al, 2013
<i>bla</i> _{CTX – M}	ACCGCGATATCGTTGGT	CGCTTTGCGATGTGCAG	550 pb	Poirel et al, 2001.
<i>bla</i> _{SHV}	CACTCAAGGATGTATTGTG	TTAGCGTTGCCAGTGCTCG	861 pb	Talukdar et al, 2013

Quadro 01: Descrição dos genes de resistência avaliados, com suas respectivas sequências e referências.

As reações de amplificação dos genes *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX – M} e *bla*_{SHV} foram feitas para todos os isolados dos gêneros *Pseudomonas sp.*, *Klebsiella sp.*, e *E. coli*. O termociclador utilizado para tais reações de amplificação foi da marca Applied Biosystems modelo ProFlex PCR System. Os reagentes de PCR foram utilizados de formas diferentes para cada reação de cada gene de resistência, porém, o volume final foi de 25 μL em cada microtubo. As condições dos reagentes para a reação de PCR e as condições da reação de PCR encontram-se nos quadros 02 e 03.

Após as amplificações, os produtos de PCR corados com gel red foram analisados em gel de agarose 1,5%. A migração eletroforética foi de 6V/cm por

cerca de 45 minutos a uma hora e os produtos de PCR foram visualizados em transiluminador Loccus modelo LPIX TOUCH.

genes reagentes	<i>bla</i>_{TEM}	<i>bla</i>_{CTX-M}	<i>bla</i>_{SHV}	Marca do Reagente
Tampão	1X	1X	1X	Ludwig Biotec
Oligo F	1µM	1µM	1µM	Ludwig Biotec
Oligo R	1µM	1µM	1µM	Ludwig Biotec
dNTP	100µL	200µM	300µM	Ludwig Biotec
MgCl ₂	1,5mM	5,5mM	5 mM	Ludwig Biotec
Taq DNA polimerase	2 U	1 U	1 U	Ludwig Biotec
DNA bacteriano	2µL	2µL	2µL	-

Quadro 02: Condições dos reagentes para reação de PCR para os diferentes genes de resistências analisados em um volume final de 25µL.

Gene Avaliado	Desnaturação Inicial	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Ciclos	Extensão Final
<i>bla</i> _{TEM}	94°C/4min	94°C/60seg	54°C/45seg	72°C/60seg	35	72°C/7min
<i>bla</i> _{CTX-M}	94°C/7min	94°C/60seg	54°C/45seg	72°C/60seg	35	72°C/7min
<i>bla</i> _{SHV}	95°C/5min	95°C/60seg	59°C/45seg	72°C/60seg	35	72°C/7min

Quadro 03: Condições para os ciclos da reação de PCR para os diferentes genes de resistências analisados.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Bactérias encontradas e identificadas nos efluentes analisados

Dos três pontos de coleta de efluente avaliados, obtiveram-se 100 isolados, predominando o gênero *Klebsiella sp.* Os resultados confirmatórios obtidos no equipamento de Maldi – TOF encontram-se no Anexo B. A Figura 06 mostra o perfil dos isolados obtidos nas coletas. Cinco isolados perderam-se durante o trabalho e não foi possível recuperá-los.

A Figura 06 demonstra os gêneros de interesse encontrados neste trabalho, ao total. Assim sendo, obtiveram-se, ao todo, 20 isolados do gênero *Klebsiella sp.*, 09 isolados do gênero *Staphylococcus sp.*, 05 isolados do gênero *Pseudomonas sp.* e 10 isolados de *E. coli*.

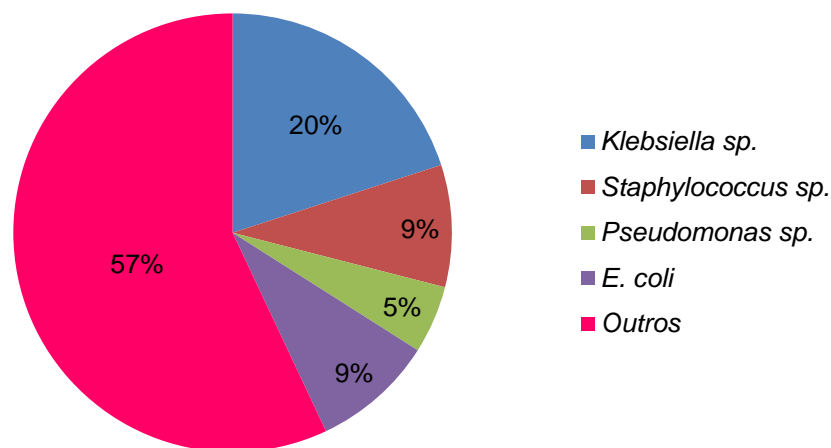


Figura 06: Gráfico da divisão (porcentagem) dos isolados de interesse encontrados nos efluentes dos hospitais avaliados em relação ao total (100 isolados).

No Hospital Municipal foram encontrados ao todo 35 isolados, quatro isolados do gênero *Klebsiella sp.*, cinco isolados do gênero *Staphylococcus sp.*, três isolados de *E. coli* e 23 isolados que compuseram um grupo com outros gêneros de bactérias que não eram de interesse neste trabalho, nomeado como “outros”. Não foram encontradas bactérias do gênero *Pseudomonas sp.* neste hospital. Ao total, encontraram-se 12 isolados de interesse neste hospital (Figura 07).

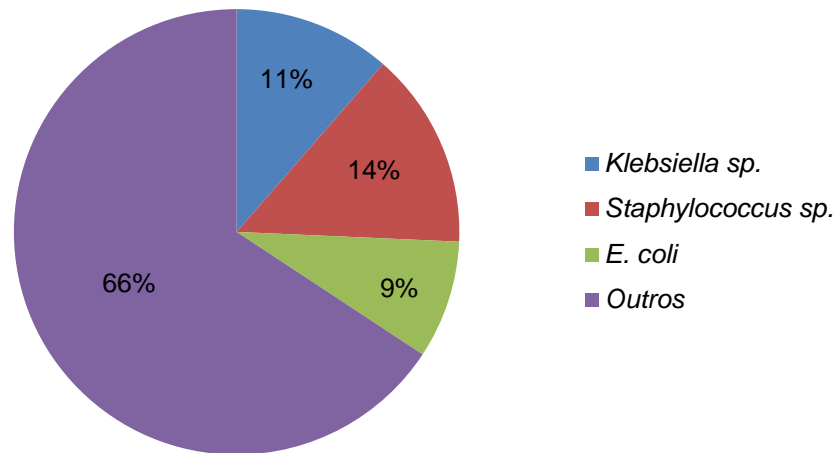


Figura 07: Gráfico da quantidade de isolados encontrados no Hospital Municipal, com n = 35.

No Hospital Regina foram encontrados ao todo 28 isolados, sendo nove isolados do gênero *Klebsiella sp.*, um isolado do gênero *Staphylococcus sp.*, dois isolados do gênero *Pseudomonas sp.*, 03 isolados de *E. coli* e 10 isolados que compuseram o grupo “outros”. Ao total, encontraram-se 15 isolados de interesse neste hospital (Figura 08).

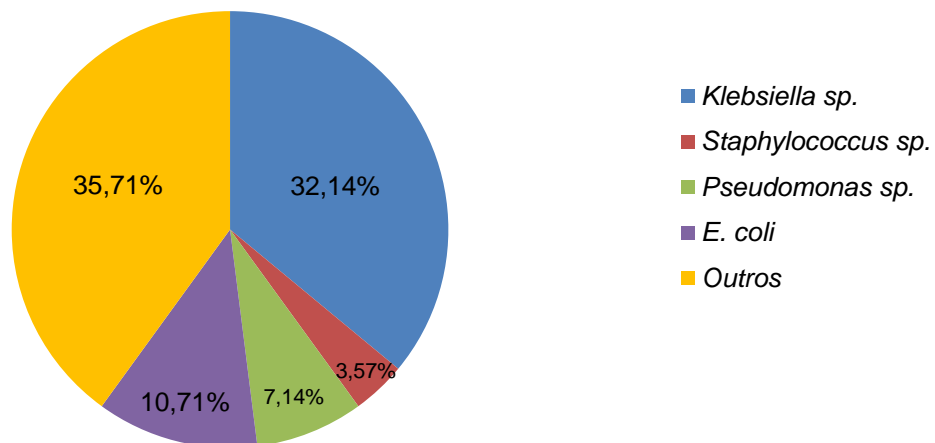


Figura 08: Gráfico da quantidade de isolados de interesse encontrados no Hospital Regina, com n= 28.

No Hospital Unimed foram encontrados ao todo 37 isolados, sendo sete isolados (07/37) do gênero *Klebsiella sp.*, três isolados (03/37) do gênero *Staphylococcus sp.*, três isolados (03/37) do gênero *Pseudomonas sp.*, quatro isolados (04/37) de *E. coli* e 20/37 isolados compuseram o grupo outros. Ao total, encontraram-se 17 isolados de interesse neste hospital (Figura 09).

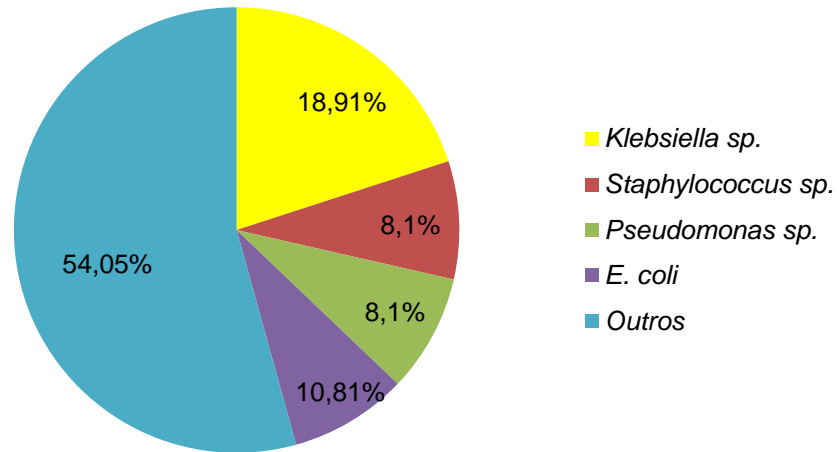


Figura 09: Gráfico da quantidade de isolados de interesse encontrados no Hospital Unimed, com n = 37.

Em estudo realizado no hospital de Palmas/TO por Baptista et al (2015), pesquisando-se bactérias ambientais, foram identificados 141 isolados ao total, predominando o gênero *Klebsiella sp.* (21,9%) seguido dos gêneros *Acinetobacter sp.* (13,8%), *Pseudomonas sp.* (12,2%), *E. coli* (10,6%) e *Staphylococcus sp.* (8,9%).

Ruiz (2010) avaliando a presença de bactérias no efluente hospitalar do Hospital Santa Casa no município de Votuparanga/SP encontrou 18 isolados de *Klebsiella sp.*, e destes, 14 eram de *K. pneumoniae* e quatro de *K. oxytoca*, equivalendo a 28,57% do total de isolados.

Estes resultados, quanto aos números totais, corroboram com os resultados encontrados no presente estudo, onde o gênero *Klebsiella sp.* foi predominante. Obtiveram-se também resultados semelhantes quanto à quantidade de *E. coli* e *Staphylococcus sp.* Um total de 9% de *Staphylococcus sp.* e 9% de *E. coli*, bastante semelhantes aos resultados encontrados por Baptista et al. (2015).

Sabendo-se que os efluentes hospitalares recebem os dejetos líquidos gerados dentro dos hospitais, e que estes dejetos provêm das mais diversas rotas como excreções e fluídos de pacientes que são escartadas em pias, águas de lavagens diversas, banhos de pacientes e acompanhantes, entre outras vias, pode-se afirmar que os resultados encontrados pelos autores recém-citados ratificam aqueles encontrados neste trabalho.

Resende (2009) avaliando o efluente hospitalar de dez hospitais em Goiânia/GO encontrou 65 isolados, sendo 59 bacilos Gram – negativos e seis cocos Gram - positivos. Deste total, 12 isolados eram do gênero *Klebsiella sp.*, oito isolados de *E. coli*, três isolados do gênero *Pseudomonas sp.*, um isolado do gênero *Acinetobacter sp.* e um isolado do gênero *Staphylococcus sp.*

Estudando a presença de bactérias Gram – negativas em efluente do Hospital Universitário e no Hemocentro de Maringá/PR, Abreu et al (2010) identificaram 39 isolados ao total, sendo 11 isolados do gênero *Klebsiella sp.*. No hospital universitário foram encontrados 19 isolados e destes, seis isolados eram de *Klebsiella sp.*, dois isolados de *E. coli*, dois isolados de *Yersinia sp.*; quatro isolados de *Serratia sp.*; dois isolados de *Hafnia sp.*; dois isolados de *Citrobacter sp.*

Koh et al (2015), Souhila et al (2014), Chernicharo (2007) e Reche (2005) afirmam que a variabilidade dos isolados de *Klebsiella pneumoniae*, pode estar relacionada a quantidade de pacientes contaminados no hospital ou mesmo a incidência da mesma no meio hospitalar ou ambiente externo.

Martins (2012) cita que em investigação realizada no norte de Portugal, em águas residuais coletadas em rede de esgotamento sanitário a jusante de quatro hospitais foram isolados 16 microrganismos da família *Enterobacteriaceae*, sendo destes, 11 *K. pneumoniae*, quatro *E. coli* e um *Enterobacter aerogenes*.

No presente estudo foram encontradas bactérias da espécie *K. pneumoniae* e *K. variicola*. De acordo com Garza – Ramos et al (2015a) os relatos correlacionando *K. variicola* como agente causador de infecções em humanos tem aumentado. Em 2014 foi publicado um estudo realizado na Suécia (Maatallah et al, 2014) onde foram analisadas as internações de pacientes adultos entre 2007 e 2009. Neste, *K. variicola* foi identificada em 24,4% das bacteremias e uma taxa de

mortalidade maior foi associada aos pacientes infectados com *K. variicola* do que aqueles infectados com *K. pneumoniae*.

Quanto à *K. pneumoniae*, ela tem sido identificada como a principal causa de pneumonia adquirida e é responsável por aproximadamente 10% de todas as infecções hospitalares adquiridas (Nordmann et al, 2009). *K. pneumoniae* com fenótipo de multirresistência já foi isolada em um hospital de emergência em Porto Alegre/RS (Meyer e Picoli, 2011). *K. variicola* já foi isolada das fezes de um paciente internado em hospital no Rio de Janeiro/RJ (Andrade et al, 2014).

Neste trabalho, foram encontradas duas espécies do gênero *Pseudomonas sp.*, num total de cinco isolados. Três delas eram *P. aeruginosa* isoladas no efluente do Hospital Unimed e dois isolados eram *P. mendocina* encontradas no efluente do Hospital Regina.

Silva Júnior (2014) cita que *P. aeruginosa* está entre os principais microrganismos encontrados em efluentes hospitalares e que é responsável por infecções em diversos sítios do corpo humano, especialmente em pacientes imunocomprometidos, podendo, esta espécie, de acordo com Meirelles-Pereira et al (2002) e Perron et al (2008) permanecer por longos períodos no ambiente aquático criando rotas de disseminação ambiental de resistência a antimicrobianos.

A origem de *Enterobacteriaceae* potencialmente patogênicas nos efluentes hospitalares deve-se ao fato destas estar presentes no ambiente hospitalar como um todo provindo de diversas fontes inanimadas como roupas, utensílios, mobiliários, camas e colchões, pisos, banheiros, pias, descarte inadequado de soluções, fluídos, e secreções. A diversidade de enterobactérias presente neste trabalho de ser explicada pela sua origem, conforme supracitado, haja vista que os efluentes hospitalares foram coletados na saída para a rede pública de esgotamento sanitário, recebendo todos os rejeitos líquidos dos hospitais.

Quanto às bactérias Gram – positivas, foi encontrado neste trabalho nove isolados de *Staphylococcus sp.*. Estes isolados compreendem as espécies *S. aureus*, *S. saprophyticus*, *S. equorum* e *S. epidermidis*.

S. epidermidis possivelmente esteja presente no efluente hospitalar devido ao banho dos pacientes e acompanhantes, haja vista este ser componente

da microflora da pele humana e, também, por descarte inadequado de materiais de uso único e individual, como cateter e *butterfly*. Além de ser comensal da pele humana, esta espécie também causa infecções hospitalares, através de cateteres, sondas (material de plástico), bem como próteses, devida sua capacidade de formar biofilme e foi reconhecido como patógeno oportunista (Pinheiro et al, 2014) e, igualmente, é encontrada em efluentes (Torres et al, 2016).

S. equorum foi originalmente encontrado em equinos saudáveis, leite, queijo, carne e outros animais de produção. Além de estar presente em alimentos e animais de produção, *S. equorum* já foi citado como agente causador de espondilocistite cervical (Bija et al, 2010), infecção de implantes ortopédicos (Arciola et al, 2006) e em diversos espécimes clínicos como sangue e exsudato (Novákova et al, 2006). Além de ser identificada em espécimes clínicos, Torres et al (2016) caracterizando estafilococos em uma planta de tratamento de efluente urbano na Espanha, encontraram sete isolados de *S. equorum* em 32 isolados de estafilococos coagulase - negativo.

Torres et al (2016) encontrou dois isolados de *S. saprophyticus* em estação de tratamento de efluente na Espanha. Na Alemanha, Gallert et al (2015) avaliando 26 isolados de *Staphylococcus sp.* em efluente encontraram 17 isolados de *S. saprophyticus*.

S. aureus foi encontrado em 11,42% dos 140 isolados avaliados em efluente hospitalar tratado em trabalho desenvolvido por Kalaiselvi et al (2016) na Índia. Hara et al (2016) encontraram 216 isolados desta bactéria em efluente hospitalar na Malásia e 100% dos isolados apresentaram fenótipo de multirresistência. Thompson et al (2012) também avaliaram a presença de *S. aureus* em efluente de dois hospitais na Austrália, e encontraram 224 isolados da espécie com diferentes perfis de resistência aos antimicrobianos.

5.2 Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos entre os isolados bacterianos encontrados no efluente

No Hospital Municipal encontrou-se ao todo 28 isolados, sendo, destes, 12 isolados de interesse neste trabalho. Destes 12 isolados observou-se resistência em maior número de isolados para o antimicrobiano ampicilina (50%), No Hospital

Regina encontrou-se ao todo 35 isolados, sendo, destes, 15 isolados de interesse neste trabalho. Destes 15 isolados observou-se resistência em maior número de isolados para o antimicrobiano ampicilina (80%). No Hospital Unimed encontrou-se ao todo 37 isolados, sendo, destes, 17 isolados de interesse neste trabalho. Destes 17 isolados observou-se resistência e maior número de isolados para os antimicrobianos ampicilina (29,41%), cefotaxima (29,41) e amoxicilina + clavulanato (29,41%) (Figura 10). Como se pode observar, houveram isolados com resistência a cada um dos antimicrobianos avaliados, exceto no ponto amostral do Hospital Municipal, onde se observou que nenhum isolado foi resistente aos antimicrobianos tetraciclina, gentamicina, norfloxacina, ciprofloxacina e imipenem (Figura 10).

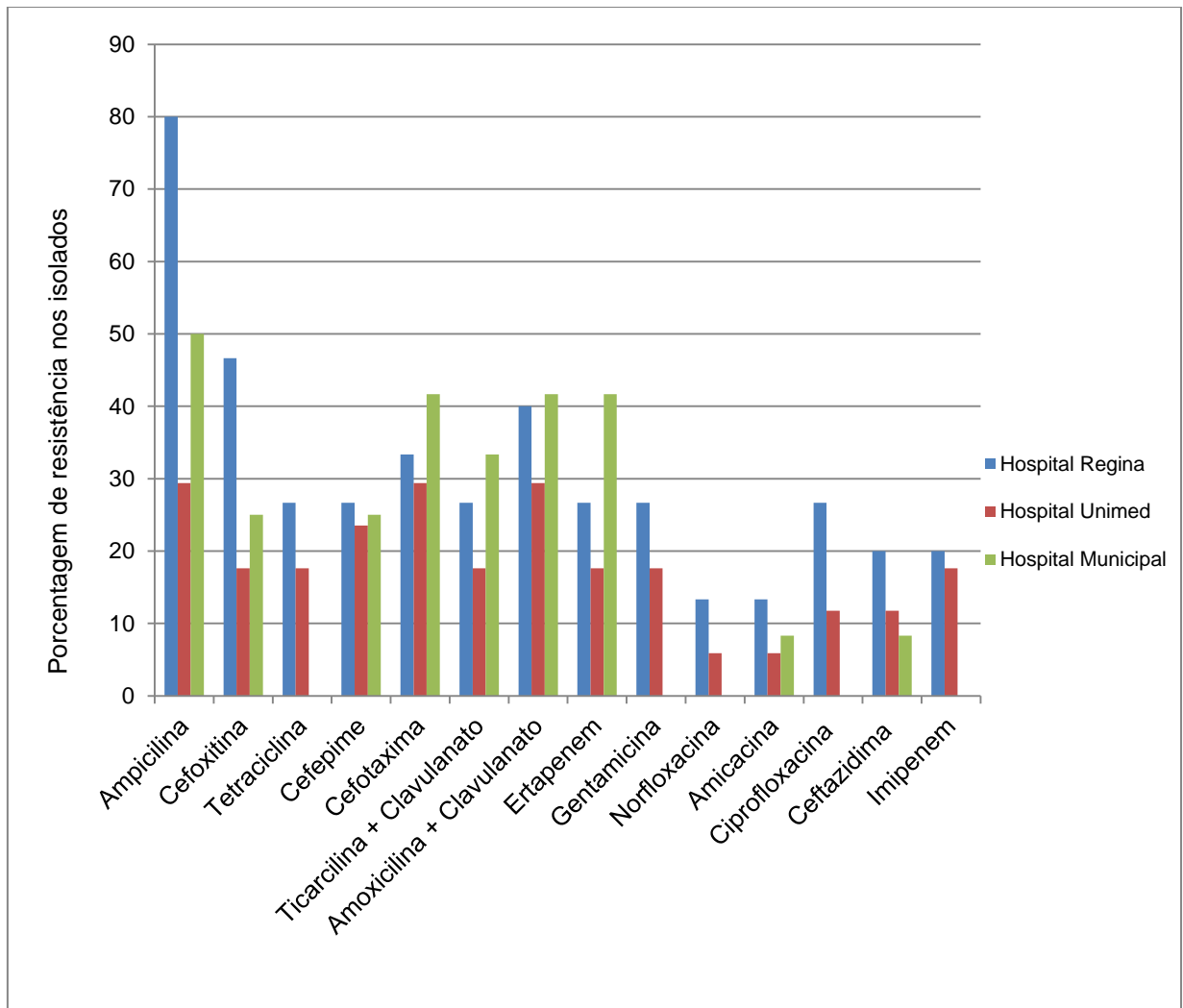


Figura 10: Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos entre os isolados bacterianos de interesse deste trabalho encontrados no efluente. No Hospital Municipal foram avaliados 12 isolados, no Hospital Regina, 15 isolados e no Hospital Unimed, 17 isolados.

O ambiente hospitalar seleciona bactérias resistentes em decorrência do uso indiscriminado de antimicrobianos da reunião de pessoas com diferentes vulnerabilidades à infecção. É sabido que o tratamento do paciente é condicionado ao grau de complexidade do quadro clínico e que, na maioria dos casos, o uso de antimicrobianos deve ser iniciado imediatamente à admissão, ressaltando-se que, o tratamento empírico pode contribuir para o aumento da resistência microbiana (Paula et al, 2016).

No meio ambiente aquático a resistência bacteriana pode ocorrer através de uma pressão seletiva, que é imposta muitas vezes pelos seres humanos ao contaminar esse ambiente com dejetos contendo metais pesados, bem como resquícios de antimicrobianos, que podem vir de descarte de esgotos ou aquicultura. Essa pressão seletiva, apesar de não ser tão intensa quanto em um ambiente hospitalar, também causa seus efeitos (Barcelos et al, 2016).

Em áreas urbanas uma grande quantidade de antimicrobianos é despejada e entra nos sistemas de esgotamento sanitário. Estes antimicrobianos e as bactérias resistentes a eles são frequentemente detectadas no esgoto (Chen et al, 2014). Hospitais e áreas residenciais contribuem para este despejo. Conseqüentemente, o esgotamento sanitário é uma rota para a disseminação de microrganismos resistentes aos antimicrobianos para os ecossistemas (Chen et al, 2014), haja vista que o efluente hospitalar que desemboca no esgotamento sanitário carrega tanto os microrganismos resistente quanto os antimicrobianos não – metabolizados (Hossaim et al, 2012).

Como se pode observar na Figura 10, no efluente de cada um dos hospitais, houve maior número de isolados resistentes à ampicilina. Magalhães (2013), avaliando a susceptibilidade de *P. aeruginosa* em efluente hospitalar em Manaus/AM, observaram a resistência à ampicilina em 100% dos isolados estudados. Ahmad et al (2013) avaliando a ocorrência de resistência aos antimicrobianos e a produção de β – lactamases em efluente hospitalar na cidade de Aligarh, na Índia, observaram a presença de resistência à ampicilina em 73,9% dos isolados estudados e Baptista (2013) afirmou que em *Klebsiella sp.* a resistência à

ampicilina é intrínseca devido à produção de β – lactamases que inativam o antimicrobiano.

Conforme se pode observar pela tabela 01, dos 44 isolados avaliados, houve resistência em 24 isolados para ampicilina (26/44, 59,1%), em 17 isolados para a combinação amoxicilina + clavulanato (17/44, 38,63%), em 15 isolados para o antimicrobiano cefoxitina (15/44, 34,09%) e em 15 isolados para o antimicrobiano cefotaxima (14/44, 31,82%).

Moges et al (2014), avaliando a resistência aos antimicrobianos em efluente hospitalar no norte da Etiópia, encontrou maior número de isolados resistentes aos antimicrobianos ampicilina (92%) e cefotaxima (33%). Estes dados são semelhantes aos deste trabalho onde houve resistência em maior número dos isolados avaliados à ampicilina e onde, similarmente ao estudo citado, houve 31,82% de isolados resistentes à cefotaxima.

Os isolados de *Klebsiella sp.* no Hospital Regina foram resistentes ou tiveram sensibilidade reduzida, em sua maioria, aos antimicrobianos ampicilina (100%) e ticarcilina + clavulanato (66,7%). No efluente do Hospital Unimed, das bactérias do gênero *Klebsiella sp.*, apenas dois isolados (Ue 33 e Ue 34) apresentaram fenótipo de resistência aos antimicrobianos, onde houve resistência aos antimicrobianos amicacina, ampicilina, ciprofloxacina, cefepime, cefotaxima, cefoxitina, ticarcilina + clavulanato, imipemem, amoxicilina + clavulanato e ertapenem no isolado Ue 34 e à tetraciclina no isolado Ue 33. No efluente do Hospital Municipal os microrganismos deste gênero foram resistentes ou tiveram sensibilidade reduzida, em maior número, aos antimicrobianos ampicilina, cefoxitina, amoxicilina + clavulanato, ticarcilina + clavulanato e ertapenem.

Quanto à espécie *E. coli*, nos isolados oriundos do efluente do Hospital Regina que apresentaram fenótipo de resistência aos antimicrobianos, verificou-se resistência em todos os isolados para os antimicrobianos cefepime, cefotaxima, cefoxitina, ticarcilina + clavulanato e amoxicilina + clavulanato. Nos isolados provenientes do Hospital Unimed houve, em todos os isolados, resistência aos antimicrobianos ampicilina, cefoxitina, amoxicilina + clavulanato e tetraciclina. E,

naqueles provenientes do efluente do Hospital Municipal ocorreu resistência em todos os isolados para os antimicrobianos ampicilina, cefepime e ertapenem.

As bactérias do gênero *Pseudomonas sp.* foram isoladas do efluente dos hospitais Regina (Re 2.2 e Re 09 – *P. mendocina*) e Unimed (Ue 12, Ue 16 e Ue 25 - *P. aeruginosa*). O isolado Re 2.2 (*P. mendocina*) foi resistente aos antimicrobianos gentamicina, ampicilina, ceftazidima e tetraciclina. Para os isolados de *P. aeruginosa*, oriundos do Hospital Unimed, verificou-se resistência em todos para os antimicrobianos ampicilina, cefotaxima e amoxicilina + clavulanato.

Os isolados do gênero *Staphylococcus sp.*, em sua maioria, foram sensíveis a todos os antimicrobianos testados, não apresentando perfil de resistência aos mesmos. Somente os isolados Re 12.1 (*S. aureus*), e Me 01 (*S. epidermidis*) apresentaram perfil de resistência às cefalosporinas, penicilinas com ou sem inibidor de β – lactamase (clavulanato) e fluoroquinolona.

Basso (2013) pesquisando o perfil de resistência em *Staphylococcus sp.* em ambiente aquático observou resistência às penicilinas e fluoroquinolona, como neste trabalho. Kumar et al (2015) encontraram resistência às cefalosporinas, com 100% dos isolados avaliados com fenótipo para β – lactamases.

Os isolados de *Pseudomonas sp.* foram considerados multirresistentes quando apresentaram resistência a pelo menos quatro classes diferentes de antimicrobianos (Fuentefria et al, 2008). Os isolados de *E. coli* e *Klebsiella sp.* foram considerados multirresistentes quando apresentaram resistência a mais de duas classes de antimicrobianos (Chagas, 2011). Os isolados de estafilococos foram considerados multirresistentes se apresentassem resistência a pelo menos três classes de antimicrobianos diferentes (Igbinosa et al, 2016).

Conforme a tabela 01 observa-se 70% (07/10) dos isolados de *E. coli* apresentaram perfil de multirresistência. De todos os isolados de *Klebsiella sp.*, 20% (04/20) apresentaram perfil de multirresistência. Nos isolados de *Pseudomonas sp.*, apenas dois isolado apresentaram perfil de multirresistência, correspondendo a 40% (02/05) dos isolados de *Pseudomonas sp.*

Entre todos os pontos amostrais avaliados o hospital com maior quantidade de isolados com perfil de multirresistência foi o Hospital Regina, seguido

por Hospital Municipal e Hospital Unimed. No Hospital Regina, sete isolados apresentaram perfil de multirresistência (07/15), correspondendo a 46,66% dos isolados testados. No Hospital Municipal, 33,33% (04/12) dos isolados avaliados foram multirresistentes. De todos os isolados do Hospital Unimed testados para perfil de resistência aos antimicrobianos, três isolados apresentaram fenótipo de multirresistência (03/17), correspondendo a 17,65% dos isolados testados.

Tabela 01: Perfil de resistência aos antimicrobianos dos isolados, de acordo com os pontos de coleta de efluente.

Ordem por hospital	Isolado	Identificação	Perfil de Resistência
01	Me 01	<i>S. epidermidis</i>	CAZ, CPM, CTX
02	Me 04	<i>E. coli</i>	AMP, CPM, CTX, TIC, AMC, ETP
03	Me 06	<i>E. coli</i>	AMP, CPM, CTX, ETP
04	Me 07	<i>K. pneumoniae</i>	AMP, FOX, TIC, AMC, ETP
05	Me 09	<i>K. variicola</i>	AMP, CPM, CTX, FOX
06	Me 18	<i>K. variicola</i>	AMP, AMC, ETP
07	Me 19	<i>K. variicola</i>	AMP, FOX, TIC, AMC
08	Me 27	<i>E. coli</i>	AMP, CPM, FOX, TIC, AMC, ETP
09	Me 29	<i>S. saprophyticus</i>	Sensível a todos os antimicrobianos testados
10	Me 30	<i>S. saprophyticus</i>	Sensível a todos os antimicrobianos testados
11	Me 31	<i>S. equorum</i>	Sensível a todos os antimicrobianos testados
12	Me 34	<i>S. aureus</i>	Sensível a todos os antimicrobianos testados
01	Re 2.2	<i>P. mendocina</i>	GEN, AMP, FOX, TET
02	Re 4.1	<i>E. coli</i>	GEN, AMK, CIP, CAZ, CPM, CTX, FOX, TIC, IMP, AMC, NOR, ETP
03	Re 4.2	<i>E. coli</i>	AMK, AMP, CIP, CPM, CTX, FOX, TIC, IPM, AMC, ETP
04	Re 05	<i>K. pneumoniae</i>	GEN, AMP, CIP, CAZ, CPM, CTX, FOX, TIC, IPM, AMC, ETP
05	Re 06	<i>E. coli</i>	GEN, AMP, CAZ, CPM, CTX, FOX, TIC, AMC, TET, ETP
06	Re 7.1	<i>K. variicola</i>	AMP, FOX, TET
07	Re 7.2	<i>K. variicola</i>	AMP
08	Re 08	<i>K. pneumoniae</i>	AMP
09	Re 11.1	<i>K. variicola</i>	AMP
10	Re 11.2	<i>K. variicola</i>	AMP
11	Re 12.1	<i>S. aureus</i>	AMP, FOX, AMC, NOR
12	Re 14	<i>K. variicola</i>	AMP, CTX
13	Re 19	<i>K. variicola</i>	AMP, AMC
14	Re 09	<i>P. mendocina</i>	Sensível a todos os antimicrobianos testados
15	Re 0	<i>K. variicola</i>	Sensível a todos os antimicrobianos testados
01	Ue 01	<i>S. aureus</i>	Sensível a todos os antimicrobianos testados
02	Ue 02	<i>S. saprophyticus</i>	Sensível a todos os antimicrobianos testados
03	Ue 03	<i>S. saprophyticus</i>	Sensível a todos os antimicrobianos testados
04	Ue 04	<i>K. variicola</i>	Sensível a todos os antimicrobianos testados
05	Ue 05	<i>K. pneumoniae</i>	Sensível a todos os antimicrobianos testados
06	Ue 06	<i>K. variicola</i>	Sensível a todos os antimicrobianos testados
07	Ue 09	<i>E. coli</i>	AMP, FOX, AMC
08	Ue 12	<i>P. aeruginosa</i>	GEN, AMP, CIP, CAZ, CPM, CTX, IPM, AMC, NOR, ETP
09	Ue 16	<i>P. aeruginosa</i>	AMP, CTX, FOX, AMC
10	Ue 25	<i>P. aeruginosa</i>	GEN, AMP, CPM, CTX, TIC, AMC
11	Ue 26	<i>E. coli</i>	GEN, AMP, CAZ, CPM, CTX, FOX, TIC, AMC, TET, ETP
12	Ue 27	<i>E. coli</i>	AMP
13	Ue 29	<i>E. coli</i>	TET
14	Ue 30	<i>K. variicola</i>	Sensível a todos os antimicrobianos testados
15	Ue 31	<i>K. variicola</i>	Sensível a todos os antimicrobianos testados
16	Ue 33	<i>K. variicola</i>	TET
17	Ue 34	<i>K. variicola</i>	AMK, AMP, CIP, CPM, CTX, FOX, TIC, IPM, AMC, ETP

Nota: Re: Efluente do Hospital Regina, Ue: Efluente do Hospital Unimed, Me: Efluente do Hospital Municipal. AMC: amoxicilina + clavulanato, AMK: amicacina, AMP: ampicilina, CAZ: ceftazidima, CIP: ciprofloxacina, CPM: cefepime, CTX: cefotaxima, ETP: ertapenem, FOX: cefoxitina, GEN: gentamicina, IMP: imipenem, NOR: norfloxacina, TET: tetraciclina. TIC: ticarcilina + clavulanato.

Para a pesquisa de genes de resistência, neste trabalho, foram avaliados os genes *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M} e *bla*_{TEM}. Estes genes foram pesquisados para os gêneros *Klebsiella sp.*, *Pseudomonas sp.* e para *E. coli*, em um total de 35 isolados. Entre todos os isolados avaliados para presença de genes de resistência 62,85% (22/35) não apresentaram nenhum dos gene de resistência testados, 22,85% (08/35) apresentaram somente um gene e 11,43% (04/35) tiveram dois genes. Nos isolados de *E. coli* predominou a presença do gene *bla*_{SHV}, nos isolados de *Pseudomonas sp.* e *Klebsiella sp.* o gene *bla*_{CTX-M} (Tabela 2).

No efluente do Hospital Regina 21,43% (03/14) de isolados tiveram o gene *bla*_{SHV} e 14,28% (02/14) dos isolados com o gene *bla*_{TEM}. No Hospital Unimed, 7,14%(01/14) dos isolados tiveram o gene *bla*_{SHV} e 21,43% (03/14) o gene *bla*_{CTX-M}. No Hospital Municipal, 42,85% (03/07) dos isolados avaliados apresentaram o gene *bla*_{SHV} e 14,29% (01/07) o gene *bla*_{TEM} (Tabela 2).

Tabela 02: Divisão dos isolados (n = 35) conforme presença dos genes de resistência.

Ponto Amostral	Isolado	Identificação	<i>bla</i> _{SHV}	<i>bla</i> _{TEM}	<i>bla</i> _{CTX-M}
Hospital Regina (n = 14)	Re 4.1	<i>E. coli</i>	+	+	-
	Re 4.2	<i>E. coli</i>	+	+	-
	Re 06	<i>E. coli</i>	+	-	-
	Re 08	<i>K. pneumoniae</i>	-	-	+
	Re 11.1	<i>K. variicola</i>	-	-	+
	Re 11.2	<i>K. variicola</i>	-	-	+
	Re 2.2	<i>P. mendocina</i>	-	-	+
Hospital Unimed (n = 14)	Ue 26	<i>E. coli</i>	+	-	+
	Ue 12	<i>P. aeruginosa</i>	-	-	+
	Ue 25	<i>P. aeruginosa</i>	-	-	+
Hospital Municipal (n = 07)	Me 04	<i>E. coli</i>	+	-	-
	Me 06	<i>E. coli</i>	+	-	-
	Me 27	<i>E. coli</i>	+	+	-

Entre todos os isolados avaliados para presença de genes de resistência 62,85% (22/35) não apresentaram nenhum dos gene de resistência testados, 22,85% (08/35) apresentaram somente um gene e 11,43% (04/35) tiveram dois genes. Nos isolados de *E. coli* predominou a presença do gene *bla*_{SHV}, nos isolados de *Pseudomonas sp.* e *Klebsiella sp.* o gene *bla*_{CTX-M}.

Nos isolados que apresentaram dois genes simultaneamente, 8,57% (03/35) foram positivos para *bla*_{SHV} e *bla*_{TEM} e 2,86% (01/35) dos isolados apresentaram os genes *bla*_{SHV} e *bla*_{CTX-M}. Chagas (2011) avaliando os mesmos

genes em *Enterobacteriaceae* proveniente de efluente hospitalar, encontrou em 16% dos isolados avaliados a presença simultânea dos genes *bla_{SHV}* e *bla_{TEM}* e um isolado positivo para *bla_{SHV}* e *bla_{CTX-M}*.

Todos os isolados identificados como *E. coli* possuíram o gene *bla_{SHV}*. Em três isolados desta espécie foi detectado o gene *bla_{TEM}* e em um isolado o gene *bla_{CTX-M}*. A presença destes genes nestes isolados justifica a presença do fenótipo de resistência às cefalosporinas e penicilinas testadas, através da produção de β – lactamases.

O isolado Re 2.2, *P. mendocina*, foi resistente a cefoxitina e apresentou sensibilidade reduzida à cefotaxima, ticarcilina + clavulanato e ampicilina + clavulanato e apresentou o gene *bla_{CTX-M}*, o que pode explicar os fenótipos de resistência anteriormente citados para este isolado.

P. mendocina é uma bactéria predominantemente ambiental e patógeno oportunista em humanos. Contudo, já há relatos na literatura desta espécie apresentando genes de resistência. Santos et al (2010) encontraram o gene *bla_{IMP-8}*, um gene codificador de metalo – β – lactamases, porém, não avaliaram mais nenhum outro gene no trabalho reportado. Não há relatos na literatura pesquisada de que esta espécie foi encontrada em efluente hospitalar. Nseir et al (2011) relataram que, avaliando a susceptibilidade aos antimicrobianos para tratar a sepse causada por *P. mendocina* em um homem adulto, a bactéria foi sensível a amicacina, gentamicina, tobramicina, ceftazidima, cirpofloxacina, ofloxacina, piperacilina e resistente a ceftriaxona e aztreonam. O isolado de *P. mendocina* encontrado neste trabalho também apresentou resistência à cefalosporinas, mas divergiu destes autores, pois apresentou resistência às penicilinas. Johansen et al (2001) reportando uma endocardite crônica em uma paciente relatou que a cepa estudada não possuía fenótipo de β – lactamases. Os isolados Ue 12 e Ue 25 (*P. aeruginosa*), apresentaram resistência a quase todos os antimicrobianos testados e a presença de *bla_{CTX-M}*. A presença do genótipo *bla_{CTX-M}* pode explicar o fenótipo de resistência às cefalosporinas

O isolado Re 08 (*K. pneumoniae*) apresentou o gene de resistência *bla_{CTX-M}*, e apresentou resistência somente a ampicilina. Os isolados Re 11.1 e Re

11.2 (*K. variicola*) apresentaram o gene bla_{CTX-M} com resistência à ampicilina e sensibilidade reduzida a cefotaxima, ticarcilina + clavulanato, ampicilina + clavulanato e tetraciclina. A presença do gene de resistência em questão pode ser o determinante para o fenótipo apresentado em relação às penicilinas e cefalosporinas. A disseminação global de bla_{CTX-M} é frequentemente associada à “plasmídeos de resistência epidêmicos” que carregam bla_{CTX-M} , outros genes de resistência aos β – lactâmicos, genes de resistência às quinolonas ou metilases que degradam os aminoglicosídeos (Dalla – Costa et al, 2017).

Como já comentado anteriormente, as bactérias presentes neste trabalho podem ser explicadas pela sua origem, haja vista os pontos amostrais. Assim sendo, existe uma grande possibilidade das bactérias com fenótipo de multirresistência advirem dos diversos setores hospitalares, em especial as unidades de tratamento intensivo.

Neste trabalho verificou-se a presença dos genes bla_{TEM} , bla_{CTX-M} , e bla_{SHV} nos gêneros *Pseudomas sp.* e *Klebsiella sp.* e na espécie *E. coli*, encontrados nos efluentes hospitalares avaliados. Já que estes efluentes hospitalares seguem para a rede de esgotamento sanitário público, e este segue para os corpos hídricos, ocorre à disseminação destes genes de resistência para o meio ambiente através da via aquática.

5.3 Avaliação microbiológica da água proveniente do Sistema de Abastecimento de Água (SAA)

Quanto à avaliação microbiológica da qualidade da água proveniente do SAA que chega a cada um dos hospitais foram realizados testes microbiológicos e físico – químicos. Os resultados dos parâmetros físico – químicos encontram-se conforme tabela 03.

Tabela 03: Resultados das análises físico – químicas na água de Sistema de Abastecimento de Água dos pontos amostrais.

Ponto Amostral	Cloro residual livre (mg/L)	Turbidez (uT)	Fluoreto (mg/L)
Hospital Regina	1,07	0,8	0,7
Hospital Unimed	1,17	0,8	0,7
Hospital Municipal	0,78	1,5	0,7

Quanto à avaliação microbiológica da qualidade da água proveniente do SAA que chegava a cada um dos hospitais, em nenhum dos pontos avaliados foi detectada a presença de coliformes totais nem de *E. coli*.

A utilização do parâmetro coliformes totais e *E. coli* para avaliação de água de SAA é aceita internacionalmente por ser uma metodologia rápida e de baixo custo para avaliação da salubridade de água proveniente de SAA.

Quanto aos parâmetros físico – químicos avaliados, observa-se que todos estão de acordo com a Portaria MS 2914/2011, contudo, o parâmetro cloro residual livre, para todos os pontos amostrais, encontrava-se abaixo do parâmetro seguro para redução de até 90% das células bacterianas na água do SAA (Chen et al, 2015; Xie et al, 2015).

Quanto ao parâmetro bactérias heterotróficas, no ponto de coleta do Hospital Regina, o resultado foi 08 UFC/mL. No ponto de coleta do Hospital Unimed o resultado foi 01 UFC/mL e no ponto de coleta do Hospital Municipal o resultado foi de 20 UFC/mL.

Igualmente, o parâmetro de bactérias heterotróficas está conforme a Portaria MS 2914/2011, com maior valor encontrado no ponto amostral do Hospital Municipal. Entretanto, a contagem de bactérias heterotróficas, definidas como microrganismos que requerem carbono orgânico como fonte de nutrientes, fornece informações sobre a qualidade bacteriológica da água de uma forma ampla. O teste inclui a detecção, inespecífica, de bactérias ou esporos de bactérias, sejam de origem fecal, componentes da microbiota natural da água ou resultantes da formação de biofilmes no sistema de distribuição. Servindo, portanto, de indicador auxiliar da qualidade da água, fornecendo informações sobre possível colonização e formação de biofilmes no sistema de distribuição (Domingues et al, 2007).

Quanto à avaliação do crescimento em ágar MacConkey, após filtração da água proveniente do SAA, não se observou crescimento de bactérias após 24 horas de incubação em nenhum dos pontos amostrais. Quanto a avaliação do crescimento em ágar Sal Manitol observou-se, após 24 horas de incubação, o crescimento de colônias amareladas, no ponto amostral do Hospital Municipal,

características de *Staphylococcus sp.*, as quais foram confirmadas pelos testes bioquímicos citados, coloração de Gram e Maldi – TOF.

Conforme se pode observar no anexo B, o valor de score para o isolado encontrado (SA1) não é suficiente para a confirmação da espécie, porém, pode-se com esse resultado, de acordo com as orientações do fabricante, ter-se certeza para a confirmação do gênero encontrado.

Botsaris et al (2015) avaliando a água de SAA de Limassol no Chipre, dentre outras bactérias, identificou o gênero *Staphylococcus sp.* na água da rede de abastecimento. Assim como em nosso trabalho, a identificação molecular do isolado de *Staphylococcus sp.*, também foi confiável para o nível de gênero e não de espécie. Os autores comentam que a provável espécie encontrada no estudo citado seja *Staphylococcus warnerii*.

O isolado de *Staphylococcus sp.* encontrado na água de SAA não apresentou fenótipo de resistência à nenhum dos antimicrobianos avaliados. Este isolado de *Staphylococcus sp.* possivelmente esteja relacionado à formação de biofilmes em rede de abastecimento, haja vista o nível de cloro abaixo do propício para redução eficaz do maior número de células bacterianas no ponto amostral e a própria capacidade das bactérias deste gênero formarem biofilmes.

6. CONCLUSÃO

1. Os efluentes hospitalares avaliados, e que são liberados para os corpos hídricos no município do Vale dos Sinos em pauta, apresentaram bactérias multirresistentes pertencentes aos gêneros *Pseudomonas sp.*, *Klebsiella sp.*, e à espécie *E. coli*;
2. Ocorreu presença dos genes de resistência *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}* e *bla_{CTX-M}* nos isolados dos gêneros *Pseudomonas sp.*, *Klebsiella sp.* e da espécie *E. coli* oriundas dos efluentes líquidos liberados pelos hospitais nos corpos hídricos do município em pauta;
3. Na água tratada e enviada pelo Sistema de Abastecimento de Água (SAA) para os hospitais, no ponto de coleta do Hospital Municipal, ocorreu um isolado de *Staphylococcus sp.* Os demais pontos estudados não apresentaram nenhuma bactéria.
4. A água tratada do SAA que chega aos hospitais, no município em pauta, não apresentou bactérias multirresistentes. O isolado de *Staphylococcus sp.* encontrado no ponto de coleta do Hospital Municipal foi sensível a todos os antimicrobianos avaliados.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abreu ET, Pretto JA, Caleare, AO, Tavares CR, Nakamura, CV. 2010. Avaliação da resistência a antibióticos de bactérias isoladas de efluente hospitalar. *Acta Scientiarum Technology*. 32(1):1-5.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. **Curso de Boas Práticas, Módulo 3**. 2017. Brasília, DF:ANVISA; 2017. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/boas_praticas/modulo3/introducao.htm>. Acesso em: 04 fev. 2017.
- Ahmad S, Alam M. Z., Aquil F, Ahmad I. 2013. Incidence and transferability of antibiotic resistance in the enteric bacteria isolated from hospital wastewater. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(3):799-806.
- Akinbowale OL, Peng H, Barton, MD. Diversity of tetracycline resistance genes in bacteria from aquaculture sources in Australia. 2007. *J Appl Microbiol* 103(5):2016–25.
- Alves MS, Dias RCS, Moreira, BM. 2006. Identification of clinical isolates of indole-positive and indole-negative *Klebsiella spp.* *J Clin Microbiol*, 44(10) 3640-46.
- Andrade BG, de Veiga RN, Abanto MF, Fonseca EL, Vicente AC. 2014. The genome of a clinical *K. variicola* strain reveals virulence associated traits and a pl9-like plasmid. *FEMS Microbiol Lett*. 360(1):13-16.
- Aragone, MR, Maurizi DM, Clara LO, Estrada, JLN, Ascione, A. 1992. *Pseudomonas mendocina*, an environmental bacterium isolated from a patient with human infective endocarditis. *J. Clin. Microbiol*. 30(6)1583-84.
- Arciola CR, Campoccia D, An YH, Baldassarri L, Donati ME, Pegreff F, Montanaro L. 2006. Prevalence and antibiotic resistance of 15 minor staphylococcal species colonizing orthopedic implants. 29:(4)395-401.
- Arruda KLS. 2013. **Resistência das *Pseudomonas* à ciprofloxacina e sua relação com a saúde ambiental**. Trabalho de conclusão de curso (Engenharia Sanitária e Ambiental) – Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- Aust MO, Godlinski F, Travis GR, Hao X, McAllister T.A, Leinweber P, Thiele-Bruhn S. 2008. Distribution of sulfamethazine, chlortetracycline and tylosin in manure and soil of Canadian feedlots after subtherapeutic use in cattle. *Environ. Pollut*. 156(3):1243-51.

- Baptista AB, Ramos JMM, Neves RR, Souza DF, Pimenta RS. 2015. Diversidade de bactérias ambientais e de pacientes no Hospital Geral de Palmas-TO. *Journal of Bioenergy and Food Science*. 2(4):160-64
- Baptista, MGF. **Mecanismos de Resistência aos Antibióticos**. 2013. Dissertação (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia, Lisboa.
- Barber KE, White BP, Stover, KR. 2017. Ceftaroline for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Am. J. Health-Syst. Pharm.* 74(4):201-8.
- Barcelos DHF, Knidel C, Mattos RO, Castro APF, Kaiser TDL. 2016. Pesquisa de enterobactérias resistentes a antimicrobianos isolados em poços tubulares na região serrana do Espírito Santo (Brasil). *Revista Águas Subterrâneas*. 30(1):53-61.
- Basso AP. 2013. **Resistência a antimicrobianos, genes de enterotoxinas e formação de biofilme em *Staphylococcus spp.* isolados do Arroio Dilúvio**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Berger-Bachi B. 2002. Resistance mechanisms of gram-positive bacteria. *Int J Med Microbiol.* 292(1):27–35.
- Berry GJ, Loeffelholz M, Williams-Bouyer N. 2015. An investigation into laboratory misidentification of a bloodstream *Klebsiella variicola* infection. *J. Clin.Microbiol.* 53(8):2793-94.
- Bezerra GS, Gutemberg FR. 2012. Avaliação do teor de cloro ativo na água tratada pela CAESC no município de Coari. *Revista de educação, ciência e tecnologia do IFAM*. 03(1):10-12.
- Bhavnani SM, Rubino CM, Ambrose PG, Drusano GL. 2010. Daptomycin exposure and the probability of elevations in the creatine phosphokinase level: data from a randomized trial of patients with bacteremia and endocarditis. *Clin Infect Dis*.50(12):1568-74.
- Bila DM, Dezzotti M. 2003. Fármacos no meio ambiente. *Química Nova*. 26(4):523-30.

- Bomo AM, Storey MV, Ashbolt NJ. 2004. Detection, integration and persistence of *Aeromonas* in water distribution pipe biofilm. *Journal of Water and Health*. 2(2):83–96.
- Bosso JA, Haines ML, Gomez J. 2011. Stable susceptibility to aminoglycosides in an age of low level, institutional use. *Infect Dis Ther*. 2(2):209-15.
- Botsaris G, Kanetis L, Slaný M, Parpouna C, Konstantinos CM. 2015. Microbial quality and molecular identification of cultivable microorganisms isolated from an urban drinking water distribution system (Limassol, Cyprus). *Environ. Monit. Assess*. 187(12):739-44.
- Boxall JB, Vreeburg JHG. 2007. Discoloration in potable water distribution systems: a review. *Water Res*. 41(3):519–29.
- Bradford PA. 2001. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clinical microbiology reviews*. 14(4):933-51.
- BRASIL. Ministério da Saúde (MS). 2011. **Portaria n.º 2914 de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade.** DOU, Página 39, Seção 1, 14/12/2011.
- Brisse S, Passet V, Grimont PA. 2014. Description of *Klebsiella quasipneumoniae* sp. nov., isolated from human infections, with two subspecies, *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae* subsp. nov. and *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *Similipneumoniae* subsp. nov., and demonstration that *Klebsiella singaporensis* is a junior heterotypic synonym of *Klebsiella variicola*. *Int J Syst Evol Microbiol*. 64(9):3146-52.
- Brody T, Yavatkar AS, Lin Y, Ross J, Kuzin A, Kundu M, Fann Y, Odenwald WF. 2008. Horizontal gene transfers link a human MRSA pathogen to contagious bovine mastitis bacteria. *PLoS ONE*. 3(8):3074-81.
- Bucheli-Witschel M, Kötzsch S, Darr S, Widler R, Egli T. 2012. A new method to assess the influence of migration from polymeric materials on the biostability of drinking water. *Water Res*. 46(13):4246–60.
- Cabral JPS. 2010. Water microbiology: bacterial pathogens and water. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 7(10): 3657-3703.

- Cattoir V, Poirel L, Aubert C, Soussy CJ, Nordmann P. 2008. Unexpected Occurrence of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Determinants in Environmental *Aeromonas spp.* Emerging Infectious Disease journal 14(2):231 – 237.
- Cestari SE, Schuroff PA, Lima NR, Burgos TN, Dambrosio AML, Pelayo JS. 2016. Caracterização genotípica de fatores de virulência de *Escherichia Coli* enterotoxigênica isoladas de água para consumo humano. Revista de Ciências Médicas e Biológicas. 15(2):139 – 43.
- Chagas TGP, Seki LM, Cury JC, Oliveira JÁ, Dávila AM, Silva DM, Asensi MD. 2011. Multiresistance, beta-lactamase-encoding genes and bacterial diversity in hospital wastewater in Rio de Janeiro, Brazil. Journal of Applied Microbiology. 111(3):572 – 81.
- Chagas TGP. 2011. **Detecção de bactérias multirresistentes aos antimicrobianos em esgoto hospitalar no Rio de Janeiro.** Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical) - Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.
- Chandra V, Goswami PN. 2014 Detection of TEM and SHV Genes in Extended Spectrum Beta Lactamase (ESBL) Producing *E. coli* and *Klebsiella pneumoniae* Isolated From a Tertiary Care Cancer Hospital. National journal of medical research.4(3):201-04.
- Chen G, Liu L, Yang L, Juliang G. 2015. Chlorine stress mediates microbial surface attachment in drinking water systems. Appl Microbiol Biotechnol. 99(6):2861–69.
- Chen M, Yuanyuan L, Shuying L, Lie L, Jingwu Z, Qianli A. 2016. Genomic identification of nitrogen-fixing *Klebsiella variicola*, *K. pneumoniae* and *K. quasipneumoniae*. J. Basic Microb. 56(1):78-84.
- Chen WY, Wu JH, Lin YY, Huang HJ, Chang JE. 2014. Bioremediation potential of soil contaminated with highly substituted polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans: microcosm study and microbial community analysis. J.Hazard. Mater. 261(15):351–61.
- Chernicharo CAL. 2007. **Reatores Anaeróbios. Princípios do tratamento biológico de águas residuárias.** 2. Ed. V.5. DESA, UFMG. 380p.
- Clark DP, Madigam MT, Martinko JM, Dunlap PV. 2010. **Microbiologia de Brock.** Artmed/São Paulo. 380p.

- Bija MD, Luma HM, Mbida PA, Nguenkam CT, Ebongue CO. 2010. Cervical spondylodiscitis due to *Staphylococcus equorum*. *Médecine et Maladies Infectieuses*. 43(6):255-57.
- Cordeiro MM. 2011. Caracterização molecular de cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas no Hospital Municipal de Ipatinga – MG. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto.
- Cunha MLRS, Pereira EPI. Avaliação da colonização nasal por *Staphylococcus* spp. resistente à oxacilina em alunos de enfermagem. *J Bras Patol Med Lab*, v. 45, n. 5, p. 361-369, 2009.
- Dalla – Costa LM, Conte D, Palmeiro JK, Nogueira KS, Lima TMR, Cardoso MA, Pontarolo R, Pontes FLD. 2017. Characterization of CTX-M enzymes, quinolone resistance determinants, and antimicrobial residues from hospital sewage, wastewater treatment plant, and river water. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 136(1):62–69.
- De Faria ASP. 2015. **Resistência de *Staphylococcus* sp. a antibióticos e metais nas águas do rio Douro**. 2015. Dissertação (Mestrado Integrado em Engenharia Química). Universidade do Porto, Portugal.
- De Oliveira AJ, Santos MCHG, Itaya MN, Calil RM. 2016. Coliformes Termotolerantes: bioindicadores da qualidade da água destinada ao consumo humano. *Atas de Saúde Ambiental*. 3(2):24-29.
- Ding Y, Zhang W, Gu, C, Xagorarakis I, Li H. 2011. Determination of pharmaceuticals in biosolids using accelerated solvent extraction and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 1218(1):10-16.
- Dolliver H, Gupta S. 2008. Antibiotic losses in leaching and surface runoff from manure-amended agricultural land. *Journal of environmental quality*. 37(3):1227-37.
- Domingues VO, Tavares G.D, Stüker F, Michelot TM, Reetz LGB, Bertoncheli CM, Hörner R. 2007. Contagem de bactérias heterotróficas na água para consumo humano: comparação entre duas metodologias. *Saúde*, 33(1):15-19.

- Douterelo I, Boxall JB, Deines P, Sekar R, Fish KE, Biggs CA. 2014. Methodological approaches for studying the microbial ecology of drinking water distribution systems. *Water Res.* 65(1):134–156.
- Dremont C, Hadjali R. **La gestion des effluents liquides en milieu hospitalier.** 2005. Cedex, França: 2005. Disponível em: <http://www.utc.fr/~farges/DESS_TBH/96-97/Projets/EL/EL.htm>. Acesso em: 03 jan. 2017.
- Emtiazi F, Schwarts T, Marten SM, Krolla – Sidenstein P, Obst U. 2004. Investigation of natural biofilms formed during the production of drinking water from surface water embankment filtration. *Water Research.* 38(5):1197-206.
- Ferrareze MVG, Leopoldo VC, Andrade D, Issac MF, Haas VJ. 2007. *Pseudomonas aeruginosa* multiresistente em unidade de cuidados intensivos: desafios que procedem? *Acta Paul Enferm.* 20(1):7-11.
- Ferreira JC. 2015. **Bactérias potencialmente resistentes a antibióticos, desinfetantes e radiação ultravioleta, isoladas de esgoto hospitalar e esgoto sanitário.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina.
- Flemming, HC, Percival SL, Walker JT. 2002. Contamination potential of biofilms in water distribution systems. *Water Sci Technol.* 2(1):271–80.
- Flemming, HC, Percival SL, Walker JT. 2015. Removal of micropollutants, facultative pathogenic and antibiotic resistant bacteria in a full-scale retention soil filter receiving combined sewer overflow. 17(1):186-96.
- Fuentefria DB, Ferreira AE, Gráf T, Corção G. 2008. *Pseudomonas aeruginosa*: disseminação de resistência antimicrobiana em efluente hospitalar e água superficial. *Rev Soc Bras Med Tropical* 41(5):470-473.
- Gallert C, Wendlandt S, Heß S, Li J, Feßler AT, Wang Y, Kadlec K, Schwartz Z. 2015. Detection of the macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance gene *erm(44)* and a novel *erm(44)* variant in staphylococci from aquatic environments. *FEMS Microb Ecol.* 91(8):1-6.
- Garza-Ramos U, Silva-Sanchez J, Barrios, H. et al. 2015b. Development of a Multiplex-PCR probe system for the proper identification of *Klebsiella variicola*. *BMC Microbiology.* 15(64):1-14

- Garza-Ramos U, Silva-Sanchez J, Barrios H. et al. 2015a. Draft genome sequence of the first Hypermucoviscous *Klebsiella variicola* clinical isolate. *Genome Announc.* 3(2):1352-135.
- Gaspar - Grillo JA, Farache Filho A, Santos ACB, Leite CQF. 2012. Isolamento e identificação de micobactérias em águas tratadas provenientes do sistema de abastecimento de água de Araraquara-SP. *Alim.* 23(1):147-55.
- Gavriel AA, Landre JPB, Lamb AJ. 1998. Incidence of mesophilic *Aeromonas* within a public drinking water supply in north-east Scotland. *Journal of Applied Microbiology*, 84(3):383–92.
- Hauser AR. 2010. **Antibióticos na prática clínica: fundamentos para escolha do agente antibacteriano correto.** Porto Alegre/Artmed. 328p.
- Hara H, Zulkeflla SNM, Yusaimi YA, Sugiura N, Iwamoto K, Goto M, Utsumi M, Othman NAB, Zakaria Z. 2016. Phenotypic and genetic characterization of multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* in the tropics of Southeast Asia. *Microbiology.* 162(2016)2064-74.
- Henne K, Kahlisch L, Höfle MG. 2012. Analysis of structure and composition of bacterial core communities in mature drinking water biofilms and bulk water of a city wide network in Germany. *Appl .Environ. Microbiol.* 78(10):3530–38.
- Hennekinne JA, Ostyn A, Guillier F, Herbin S, Prufer AL., Dragacci S. 2010. How should staphylococcal food poisoning outbreaks be characterized? *Toxins (Basel).* 2(8):2106-16.
- Hossaim MA, Farhima A, Amin R, Khan TO, Anwar NM, Karim MM. 2012. Ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* in hospital wastewater of Bangladesh and prediction of its mechanism of resistance. *World J Microbiol Biotechnol.* 28(3):827–34.
- Igbinosa EO, Beshiru A, Ahporehe LU, Oviasogie FE, Igbinosa OO. Prevalence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and Other *Staphylococcus* Species in Raw Meat Samples Intended for Human Consumption in Benin City, Nigeria: Implications for Public Health. 2016. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 13(949):1-11.
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **O seu município em números 2016: Novo Hamburgo.** 2016. Brasília, DF: IBGE, 2016. Disponível em:

<<http://cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?codmun=431340>>. Acesso em 24 mar.2017.

Talukdar PK, Rahman M, Rahman M, Nabi A, Islam Z, Hoque MM, Endtz HP, Islam MA. 2013. Antimicrobial Resistance, Virulence Factors and Genetic Diversity of *Escherichia coli* Isolates from Household Water Supply in Dhaka, Bangladesh. PLOS ONE.8(4):1-8.

Jaggi N. **Microbiology Theory for MLT (Medical Laboratory Technology)**. 2013. Londres/Jaypee.416p.

Johansen HK, Kjeldsen K, Heiby N. *Pseudomonas mendocina* as a cause of chronic infective endocarditis in a patient with situs inversus. 2001. Clin Microbiol Infect. 7(11) 650 – 52.

Kalaiselvi K, Mangayarkarasi V, Balakrishnan D, Chitrleka V. Survival of antibacterial resistance microbes in hospital-generated recycled wastewater. 2016. 14(6):942-49.

Kanekar PP, Baharati JB, Sarnaik SS. Bioremediation of an Industrial Effluent Containing Monocrotophos. 2002.Current Microbiology, 45(5):346–49.

Kao CM, Tu YT, Liu JK, Lin WC, Lin JL. 2014. Enhanced anaerobic biodegradation of OCDD-contaminated soils by *Pseudomonas mendocina* NSYSU: Microcosm, pilot-scale, and gene studies. Journal of Hazardous Materials 278(2014):433–443.

Koh TH, Ko K, Jureen R, Deepak RN, Tee N, Tan TY, Tay MR, Lee VJM, Barkham T. 2015. High Counts of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae in Hospital Sewage. Infection Control & Hospital Epidemiology, 36(5)619-21.

Kumar H, Palaha R, Kaur N, Ratnakar WS, Sodi A, Kaur M, Katiyar R, Sharma M, Kaur C, Kumar V. Prevalence of multidrug-resistant, coagulase-positive *Staphylococcus aureus* in nasal carriage, food, wastewater and paper currency in Jalandhar city (north-western), an Indian state of Punjab. 2014. Environ. Monit. Assess., 187(1):4134-38.

Kumar H, Palaha R, Kaur N, Ratnakar WS, Sodi A, Kaur M, Katiyar R, Sharma M, Kaur C, Kumar V. 2015. *Staphylococcus aureus* in nasal carriage, food, wastewater and paper currency in Jalandhar city (north-western), an Indian state of Punjab. Environ. Monit. Assess. 187(1):4134-38.

- Kumar S. 2012. **Textbook of microbiology**. Jaypee/Londres. 763p.
- Lee, DG, Lee JH, Kim SJ. 2006. Diversity and dynamics of bacterial species in a biofilm at the end of the Seoul water distribution system. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 21(2):155–62.
- Li C, Lu J, Zhang G, Tong Y, Ma N. 2016. Exploring the correlations between antibiotics and antibiotic resistance genes in the wastewater treatment plants of hospitals in Xinjiang, China. *Environmental Science and Pollution Research.* 23(15):15111-121.
- Liu G, Verberk JQJC, Van Dijk JC. 2013a. Bacteriology of drinking water distribution systems: an integral and multidimensional review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97(21):9265–76.
- Liu G, Lut MC, Verberk JQJC, Van Dijk JC. 2013b. A comparison of additional treatment processes to limit particle accumulation and microbial growth during drinking water distribution. *Water Res.* 47(8):2719–28.
- Loureiro M, De Moraes BA, Mendonça VLF, Quadra MRR, Pinheiro GS, Asensi MD. 2002. *Pseudomonas aeruginosa*: Study of antibiotic resistance and molecular typing in hospital infection cases in a neonatal intensive care unit from Rio de Janeiro city, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97(1):387-94.
- Maatalah M, Vading M, Kabir MH, Bakhrouf A, Kalin M, Nauc ler P, Brisse S, Giske CG. 2014. *Klebsiella variicola* is a frequent cause of bloodstream infection in the Stockholm area, and associated with higher mortality compared to *K. pneumoniae*. *PLOS ONE.* 9(11):1135-39.
- Magalhães MJTL. 2013. **Caracterização fenot pica e similaridade genética de *Pseudomonas aeruginosa* provenientes de efluentes hospitalares e água superficial do igarap  do Mindu/Manaus – AM**. Mestrado em Saúde, Sociedade e Endemias na Amazônia) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus.
- Magarifuchi H, Koji K, Yamakuchi H, Hamada Y, Urakami T, Aoki Y. 2015. *Staphylococcus saprophyticus* native valve endocarditis in a diabetic patient with neurogenic bladder: A case report. 21(9):695 – 699.
- Manaia CM, Faria C, Vaz – Moreira I, Serapicos E, Nunes O. Antibiotic resistance in coagulase negative staphylococci isolated from wastewater and drinking water. 2009. *Science of the Total Environment.*, 407(12):3876–82.

- Martins A. 2012. **Prevalência de resistência a antimicrobianos em isolados ambientais de *Escherichia coli* e enterococos**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Bioquímica em Saúde). Instituto Politécnico do Porto. Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto.
- Martins AF, Barth AL. Acinetobacter multirresistente—um desafio para a saúde pública. 2013. Sci Med. 23(1):56-62.
- Medell M, Hart M, Marrero O, Espinosa F, Oca Z, Vales R. 2012. Clinical and microbiological characterization of pneumonia in mechanically ventilated patients. Braz. J. Infect. Dis. 16(5):442 – 47.
- Meirelles-Pereira F, Pereira AMS, Silva MCG, Gonçalves VD, Brum PR, Castro EAR, Pereira AA, Pereira JAA. 2002. Ecological Aspects of the Antimicrobial Resistance in Bacteria of Importance to Human Infections. Brazilian Journal of Microbiology. 33: 287 – 93.
- Menaia J, Benoliel M, Lopes A, Neto C, Ferreira E, Mesquita E, Paiva J. 2008. Assessment of Lisbon drinking water distribution network biofilm colonization and associated hazards. Water Science and Technology, 8(4): 421–26.
- Meyer G, Picoli SU. 2011. Fenótipos de betalactamases em *Klebsiella pneumoniae* de hospital de emergência de Porto Alegre. J Bras Patol Med Lab. 47(1):25-31.
- Moges F, Endris M, Belyhun Y, Worku W. 2014. Isolation and characterization of multiple drug resistance bacterial pathogens from waste water in hospital and non-hospital environments, Northwest Ethiopia. BMC Research Notes. 7(1):215-21.
- Moore JE, Moore PJA, Millar C, Goldsmith CE, Loughrey A, Rooney JP, Rao JR. 2010. The presence of antibiotic resistant bacteria along the River Lagan. Agricultural Water Management. 98(1):217-21.
- Moreira VC, Freire D. 2011. *Klebsiella pneumoniae* e sua resistência a antibióticos. Goiás, GO: PUC, 2011. Disponível em:< <http://www.cpgls.pucgoias.edu.br/6mostra/artigos/SAUDE/VANESSA%20CARVALHO%20MOREIRA.pdf>>. Acesso em 10 de janeiro de 2017.
- Morton SC, Zhang Y, Edwards MA. 2005. Implications of nutrient release from iron metal for microbial regrowth in water distribution systems. Water Res. 39(13):2883–2892.

- Mungloo-Rujubali SK, Issack MI, Jaufeerally-Fakim Y. 2013. Study of *Klebsiella pneumoniae* isolates with ESBL activity, from ICU and nurseries, on the island of Mauritius. *J Cell Mol Biol.* 10(1):39-51.
- Murray L, Marti R, Scott A, Tien YC, Sabourin L, Zhang Y, Topp E. 2013. Impact of manure fertilization on the abundance of antibiotic-resistant bacteria and frequency of detection of antibiotic resistance genes in soil and on vegetables at harvest. *Appl. Environ. Microbiol.* 70(18):5701-09.
- Nascimento ED, Araújo MFF. 2014. Antimicrobial resistance in bacteria isolated from aquatic environments in Brazil: a systematic review. *Revista Ambiente & Água.* 9(2):239-49.
- Niquette P, Servais P, Savoie R. 2000. Impacts of pipe materials on densities of fixed bacterial biomass in a drinking water distribution system. *Water Res.* 34(6):1952–56.
- Novo Hamburgo. **Plano de ação e aplicação de recursos da Vigilância Ambiental em Saúde.** 2016. Secretaria Municipal de Saúde – Vigilância em Saúde.
- Nõlvak H, Truu M, Tiirik K, Oopkaup O, Sildvee T, Kaasik A, Mander ÜTJ. 2013. Dynamics of antibiotic resistance genes and their relationships with system treatment efficiency in a horizontal subsurface flow constructed wetland. *Sci Total Environ.* 461(462):636-44.
- Nordmann P, Giske CG, Sundsfjord AS, Kahlmeter G, Woodford N, Paterson DL, Cantón R, Walsh TR. 2009. Redefining extended – spectrum beta lactamases: balancing science and clinical need. *Journal of Antimicrobial and Chemotherapy.* 63(1):1-4.
- Norton CD, LeChevallier MW. 200. A pilot study of bacteriological population changes through potable water treatment and distribution. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(1):268–76.
- Nováková, D. et al. *Staphylococcus equorum* and *Staphylococcus succinus* isolated from human clinical specimens. 2006. *Journal of Medical Microbiology.* 55(1):523–528.
- Nseir W, Taha H, Khateeb J. 2011. *Pseudomonas mendocina* sepsis in a healthy man. *Isr Med Assoc J.* 13(6):375-6.

- Oliveira AC, Silva RS. 2008. Desafios do cuidar em saúde frente à resistência bacteriana: uma revisão. *Rev. Eletr. Enf.* 10(1):189-19.
- Oliveira AC, Damasceno QS. Superfícies do ambiente hospitalar como possíveis reservatórios de bactérias resistentes: uma revisão. 2010. *Rev Esc Enferm USP.* 44(4):1118-23.
- Oliveira CF, Dal Forno NLF, Alves IA, Horta JÁ, Rieger A, Alves SH. 2009. Prevalência das famílias TEM, SHV e CTX-M de β lactamases de espectro estendido em *Escherichia coli* e *Klebsiella spp.* no Hospital Universitário de Santa Maria, Estado do Rio Grande do Sul. *Rev Soc Bras Med Trop.* 42(5):556-60.
- OMS - Organização Mundial de Saúde. **Guidelines for Drinking Water Quality: Incorporating First Addendum.** 2006. Genebra, Suíça:OMS, 2006.
- Pallecchi L, Bartoloni A, Paradisi F, Rossolini GM. 2008. Antibiotic resistance in the absence of antimicrobial use: mechanisms and implications. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 6(5):725-32.
- Paula DM, Rodrigues SC, Matos SS, Ferraz AF, Donoso MTV, Borges EL, Silqueira SMF, Matia AD. 2016. Pós-operatório de pacientes com câncer colorretal estomizados: uma análise compreensiva. *Revista SOBECC* 21(2):90-96.
- Pauwels B, Verstraete W. 2006. The treatment of hospital wastewater: an appraisal. *J. Water Health.* 4(4):405-16.
- Perron GG, Quessy S, Bell G. 2008. A reservoir of drug-resistant pathogenic bacteria in asymptomatic hosts. *PLOS ONE.* 3(11):3749-53.
- Pinheiro L, Brito C, Pereira VC, Oliveira A, Camargo CH, Cunha M. 2014. Reduced susceptibility to vancomycin and biofilm formation in methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* isolated from blood cultures. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.* 109(7):871-8.
- Pinto – Tomas AA, Anderson MA, Suen G, Stevenson DM, Chu FS, Cleland WW, et al. 2009. Symbiotic nitrogen fixation in the fungus gardens of leaf-cutter ants. *Science.* 326(5956):1120-23.

Podschun R, Ullmann U. 2009. *Klebsiella spp.* as Nosocomial Pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods and Pathogenicity Factors. Clin Microbiol Rev. 11(4): 589-603.

Poirel L, Naas T, Thomas I, Karim A, Bingen E, Nordmann P. 2001. CTX-M-Type Extended-Spectrum-Lactamase That Hydrolyzes Ceftazidime through a Single Amino Acid. Antim agents and chemot. 45(12):3355-3361.

Substitution in the Omega Loop

Poirel L, Lartigue MF, Decousser JW, Nordmann P. 2005. ISEcp1 mediated transposition of bla_{CTX-M} in *Escherichia coli*. Antimicrobials Agents and Chemotherapy. 49(1):447-50.

Poirel L, Nordmann P. 2006. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. Clinical Microbiology and Infection, 12(9):826-36.

Prado T, Pereira WC, Silva DM, Seki LM, Carvalho AP, Asensi MD, 2007. Detection of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in effluents and sludge of a hospital sewage treatment plant. Letters in applied microbiology. 46(1):136-41.

Prest EI, Hammes F, van Loosdrecht MCM, Vrouwenvelder JS. 2016. Biological Stability of Drinking Water: Controlling Factors, Methods, and Challenges. Frontiers in Microbiology. 7(45):1-24.

Razzolini MTP, Di Bari M, Sanchez PS, Sato MIZ. 2008. *Aeromonas* detection and their toxins in drinking water from reservoirs and drinking fountains. Journal of Water and Health. 6(1):117–123.

Reche A. 2005. orbifloxacina no tratamento das cistites bacterianas. Ciência Rural. 35(6):4325-30.

Resende ACB. **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 (Mestrado em Ciências Ambientais e Saúde) - Universidade Católica de Goiás, Goiânia, Goiás.

Rodrigues - Mozaz S, Chamorro S, Marti E, Huerta B, Gros M, Sanchez-Melsio A, Borrego CMB, Damiá B, Balcazar JB. 2015. Occurrence of antibiotic and

antibiotic resistance genes in hospital and urban wastewaters and their impact on the receiving river. *Water Research*. 6(1):234-42.

Rosenblueth M, Martinez L. 2004. *Klebsiella variicola*, a novel species with clinical and plant-associated isolates. *Syst.Appl.Microbiol*. 27(1):27–35.

Ruiz LGP. 2010. **Resistência aos beta-lactâmicos e detecção dos genes bla_{SHV}, bla_{TEM}, bla_{CTX-M} e bla_{GES} em Enterobacteriaceae isoladas de efluentes hospitalar e comunitário em um município do noroeste paulista**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto.

Santos C, Caetano T, Ferreira S, Mendo S. 2010. First description of bla_{IMP-8} in a *Pseudomonas mendocina* isolated at the Hospital Infante D. Pedro, Aveiro, Portugal. *Research in Microbiology*. 161(4):305-307.

Santos IAL, Nogueira JMR, Mendonça FCR. 2015. Mecanismos de resistência antimicrobiana em *Pseudomonas aeruginosa*. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*. 47(1-2) 5-12.

Santos JM dos. 2016. Presença de bombas de efluxo em *Pseudomonas sp.* isoladas de efluente hospitalar não tratado. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente). Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

Santos LHMLM, Gros M, Rodrigues - Mozaz S, Delerue - Matos C, Pena A, Barceló D. 2013. Contribution of hospital effluents to the load of pharmaceuticals in urban wastewaters: identification of ecologically relevant pharmaceuticals. *Science Total Environment*. 461(462):302-316.

Santos R, Oliveira F, Fernandes J, Gonçalves S, Cadete M. 2005. Detection and identification of mycobacteria in the Lisbon water distribution system. *Water sci tech*. 52(8):177-180.

Seki LM, Pereira PS, Souza MDP, Conceição MDS, Marques EA, Porto CO, Colnago EM, Alves CDF, Gomes D, Assef AP, Samuelsen O, Asensi MD. 2013. Molecular epidemiology of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Brazil: the predominance of sequence type 437. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 70(2):274-77.

September S, Brozel VS, Venter SN. 2007. Diversity of nontuberculous *Mycobacterium* species in biofilms of urban and semi urban drinking water

- distribution systems. *Applied and Environmental Microbiology*. 70(12):7571-73.
- Shon AS., Bajwa RP, Russo TA. 2013. Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*: a new and dangerous breed. *Virulence* 4(2):107–18.
- Silva Junior AA da. 2014. **Epidemiologia das infecções hospitalares causadas por *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* em um hospital de Salvador**. Trabalho de conclusão de curso. Faculdade de Medicina. Universidade Federal da Bahia, Salvador.
- Smeets PWMH, Medema GJ, van Dijk JC. 2009. The Dutch secret: how to provide safe drinking water without chlorine in the Netherlands. *Drink. Water Eng.Sci.* 2(1):1–14.
- Souhila A, Estepa V, Messai Y, Ruiz E, Torres C, Bakour R. 2014. Characterization of ESBLs and Associated Quinolone Resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Isolates from urban wastewater treatment plant in Algeria. *Microbial Drug Resistance*. 20(1):30-8.
- Strateva T, Yordanov D. 2009. *Pseudomonas aeruginosa*—a phenomenon of bacterial resistance. *Journal of medical microbiology*. 58(9):1133-48.
- Sun H, Shi B, Lytle DA, Wang D. 2014. Formation and release behavior of iron corrosion products under the influence of bacterial communities in a simulated water distribution system. *Environ.Sci.Process Impacts*. 16(3): 576–85.
- Szewzyk U, Szewzyk R, Manz W, Schleifer KH. 2000. Microbiological safety of drinking water. *Annu.Rev.Microbiol.* 54(1):81-127.
- Taylor NGH, Verner-Jeffreys DW, Baker-Austin C. 2011. Aquatic systems: maintaining, mixing and mobilising antimicrobial resistance. *Trends in ecology & evolution*. 26(6):278-84.
- Thompson JM, Gundogdu A, Stratton HM, Katouli M. 2012. wastewaters and sewage treatment plants with special reference to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *J App Microb.* 114(1):44-54.
- Torres C, Gomez P, Lozano C, Benito D, Estepa V, Tenorio C, Zarazaga M. Characterization of staphylococci in urban wastewater treatment plants in

- Spain, with detection of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* ST398. *Environ Pollut.* 212(1):71-76.
- Tortora GJ, Funke BR, Case CL. 2012. **Microbiologia.** Artmed/São Paulo. 894p.
- Trabulsi LR, Alterthum, F. 2008. **Microbiologia.** Atheneu/São Paulo. 780p.
- van der Kooji D, Veenendaal HR. 2001. Biomass production potential of materials in contact with drinking water: method and practical importance. *Water Science Technol.* 1(3):39–45.
- Vital M, Hammes F, Egli T. 2008. *Escherichia coli* O157 can grow in natural fresh water at low carbon concentrations. *Environ. Microbiol.* 10(9):2387–96.
- Vital M, Dignum Magic-Knezev, Ross P, Rietveld L, Hammes F. 2012a. Flow cytometry and adenosine tri-phosphate analysis: alternative possibilities to evaluate major bacteriological changes in drinking water treatment and distribution systems. *Water Res.* 46(15):4665–76.
- Vital M, Hammes F, Egli T. 2012b. Competition of *Escherichia coli* O157 with a drinking water bacterial community at low nutrient concentrations. *Water Res.* 46(19):6279-90.
- Wang JH, Chi CY, Lai CH, Fung CP. *Pseudomonas mendocina* spondylodiscitis: A case report and literature review. *Infectious Diseases.* 37(11-12):950-3.
- Wang H, Edwards MA, Falkinham JO, Pruden A. 2013. A Probiotic approach to pathogen control in premise plumbing systems: A review. *Environ. Sci. Technol.* 47(18):10117–128.
- Wang H, Masters S, Edwards MA, Falkinham JO, Pruden. 2014. Effect of disinfectant, water age, and pipe materials on bacterial and eukaryotic community structure in drinking water biofilm. *Environ. Sci. Technol.* 48(3):1426–35.
- Xie S, Zilong M, Dai Y, Chen C, Zhang X. 2015. Impact of disinfection on drinking water biofilm bacterial community. *Journal of Environmental Sciences.* 37(1):200-05.
- Yao J, Chen G, Liu J, Qi Y, Yan B. 2016. Biodiesel production using magnetic whole-cell biocatalysts by immobilization of *Pseudomonas mendocina* on

Fe₃O₄-chitosan microspheres. *Biochemical Engineering Journal*. 113(2016):86–92.

Yu J, Kim D, Lee T. 2010. Microbial diversity in biofilms on water distribution pipes of different materials. *Water Sci .Technol*. 61(1):163–171.

Zhao JZ, Chen Z, Chen S, Deng Y, Tian W, Huang X, Wu C, Sun Y, Zeng Z, Liu JH. 2010. Prevalence and disseminations of oqxAB in *Escherichia coli* isolates from animals, farmworkers and the environment. *Antimicrobials Agents Chemotherapy*. 54(10):4219-24.

8. ANEXOS

Anexo A - Meios de Cultura e Testes Bioquímicos utilizados

ÁGAR MAC CONKEY

- Princípio

- O cristal violeta inibe o crescimento de microrganismos Gram - positivos especialmente enterococos e estafilococos.
- A concentração de sais de bile é relativamente baixa em comparação com outros meios, por isso não é tão seletivo para Gram - negativos.

- Utilidade

- Isolar bacilos Gram negativos (enterobactérias e não fermentadores) e verificar a fermentação ou não da lactose.

- Fórmula (por litro de água purificada)

- Peptona de Caseína - 1,5 g/L
- Peptona de Carne - 1,5 g
- Peptona de Gelatina - 17,0 g
- Sais biliares (mistura) - 1,5 g
- Lactose - 10,0 g
- Cloreto de Sódio - 5,0 g
- Vermelho Neutro - 0,03
- Cristal Violeta - 0,001g
- Ágar - 13,5g

- Procedimentos

- Pesar e hidratar o meio;
- Aquecer sob agitação até fundir o ágar completamente;
- Esterilizar em autoclave;
- Resfriar até 50°C e distribuir 20 a 25 ml em placas de Petri 90 mm estéreis;
- Deixar em temperatura ambiente até resfriar;

- Embalar as placas com plástico PVC transparente e guardar em geladeira de 4 a 8°C.

- Inoculação

- Inocular as placas e incubar por 18 a 24 horas;
- Se negativo após 24 horas, reincubar por mais 24 horas.

- Interpretação

- Cor original do meio: rosa avermelhado.
- Colônias cor de rosa: fermentadoras de lactose.
- Colônias incolores: não fermentadoras de lactose.
- Não há crescimento de cocos Gram - positivos.

ÁGAR CITRATO SIMMONS

- Princípio

- Verifica a capacidade da bactéria de utilizar o citrato de sódio como única fonte de carbono, com sais de amônia, alcalinizando o meio.

- Utilidade

- Diferenciar gêneros e espécies de enterobactérias e não fermentadores.

- Fórmula (por litro de água purificada):

- Fosfato monobásico de amônio – 1,0g
- Fosfato dipotássico – 1,0g
- Cloreto de Sódio – 5,0g
- Citrato de Sódio – 2,0g
- Sulfato de Magnésio – 0,2g
- Azul de Bromotimol – 0,08g
- Ágar 15,0g

- Procedimentos

- Pesar e hidratar o meio;

- Aquecer sob agitação até fundir o ágar;
- Distribuir em tubos com tampas de rosca;
- Esterilizar em autoclave;
- Retirar os tubos da autoclave e incliná-los ainda quentes, para que solidifiquem com a superfície em forma de bico de flauta (ângulo de 45°). Deixar solidificar em temperatura ambiente.

- Inoculação

- Com o auxílio de um fio bacteriológico, inocular na superfície a colônia, não furar a base;
- Realizar o teste com colônias puras de 18 a 24 horas.

- Interpretação

- Cor original do meio: verde
- Positivo: cor azul ou crescimento no local do inóculo.
- Negativo: não há crescimento e a cor permanece inalterada.
- Se houver crescimento visual na área do inóculo sem mudança de cor, o teste pode ser considerado positivo, reincubar por 24 até 72 horas, a incubação poderá mudar a cor do meio para alcalino (azul).

Leitura inicial com 24 horas:

- Se resultado positivo: encerrar o teste.
- Se resultado negativo ou houver dúvida: reincubar por mais 24/48 horas.

Leitura com 48 horas:

- Se houver crescimento visível na área do inóculo sem mudança de cor, o teste pode ser considerado positivo, (encerrar o teste).
- Se resultado negativo ou houver dúvida, reincubar por 24 até 72 horas, a incubação poderá mudar a cor do meio para alcalino(azul).

- Recomendações

- Manter a tampa do tubo frouxa, o meio necessita de oxigênio.
- Não se devem transportar colônias de meios que contenham glicose ou outros nutrientes/substratos, pois podem entrar em contato com o meio de citrato, podendo dar um resultado falso positivo.
- Deixar o tubo em temperatura ambiente antes de inocular a bactéria.
- Para fazer o inóculo flambar o fio bacteriológico.
- Não fazer inóculo muito denso (pode acidificar o meio deixando-o amarelo).

ÁGAR TSI – TRIPLO AÇÚCAR FERRO

- Princípio

- Este meio contém três açúcares: 0,1%glicose, 1,0% lactose, 1,0% sacarose, vermelho de fenol para detecção da fermentação de carboidratos e sulfato de ferro para detecção da produção de sulfato de hidrogênio (indicado pela cor preta na base do tubo).
- A fermentação é indicada pela mudança da cor do indicador de pH de vermelho para amarelo. O ágar fundido é deixado solidificar, formando uma superfície inclinada.
- Essa configuração origina duas câmaras de reação dentro do mesmo tubo. A porção inclinada ou bico, exposta em toda sua superfície ao oxigênio atmosférico, é aeróbia. A porção inferior, denominada profundidade ou fundo, está protegida do ar e é relativamente anaeróbia.
- Quando se prepara o meio, é importante que a rampa e a profundidade tenham o comprimento igual ao redor de 3 cm cada um, de modo que o efeito das duas câmaras seja conservado.

- Utilidade

Diferenciar bacilos Gram - negativos com base na fermentação de carboidratos, produção de sulfato de hidrogênio e gás.

- Fórmula (por litro de água purificada):

- Peptona de caseína – 10g
- Peptona de Carne – 10g
- Glicose – 1,0g
- Lactose – 10,0g
- Sacarose – 10,0g
- Cloreto de sódio – 5,0g
- Sulfato férrico amoniacal – 0,2g
- Tiosulfato de sódio – 0,2g
- Vermelho de fenol – 0,025g
- Ágar – 13,0g

- Procedimentos

- Pesar o TSI;
- Distribuir em tubos com tampas de rosca;
- Esterilizar em autoclave;
- Retirar os tubos da autoclave e incliná-los ainda quentes para que solidifiquem com a superfície em forma de bico de flauta (ângulo de 45°).
- Deixar solidificar em temperatura ambiente.

- Inoculação

- Inocular colônia pura de 18 a 24 horas;
- Semear por picada até o fundo e na superfície do meio;
- Incubar 24 h a 35°C, com a tampa semi – aberta.

- Interpretação

- Cor original do meio: vermelho laranja, levemente opalescente.
- Leitura: entre 18 e 24hs.
- Cor púrpura = alcalino.
- Cor amarelo = ácido.

Reações ápice/base:

- Púrpura/amarelo = fermentação apenas da glicose (lactose e sacarose negativos).
- Amarelo/amarelo = fermentação da glicose + lactose e/ou sacarose (2 ou 3 açúcares).
- Presença de gás (CO²) = bolhas ou meio fragmentado.
- H₂S positivo = presença de precipitado negro.

ÁPICE	BASE	H ₂ S	GÁS	INTERPRETAÇÃO MAIS PROVÁVEL
Vermelho	Vermelho	neg	neg	Sem crescimento = bactéria exigente
Vermelho	Vermelho	neg	neg	Crescimento na superfície = Não fermentador ou Gram (+)
Amarelo	Vermelho	neg	neg	Crescimento na superfície = Gram (+) ou esquecimento de picar a base
Amarelo	Amarelo	neg	varia	Enterobactérias ou <i>Aeromonas</i> Lac (neg)
Amarelo	Amarelo	+	varia	<i>Samonella, Proteus/Morganella/Providencia e Citrobacter</i>

- Recomendações

- Quando há produção de H₂S significa que a base é sempre ácida.
- Não realizar leitura com menos de 18 ou mais de 24 horas, podendo resultar em falsas reações.
- Não utilizar alças bacteriológicas para não fragmentar o meio, ocasionando falsa reação de gás, utilizar fio bacteriológico.
- Qualquer traço de escurecimento no meio deve ser indicado com H₂S positivo.

PROVA DE CATALASE

- Princípio

- A catalase é uma enzima que decompõe o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água e oxigênio.

- Utilidade

- Para *Staphylococcus sp.*, *Streptococcus sp.*, *Enterococcus sp.*, *Listeria sp.*, *Corynebacterium sp.*, *Micrococcus sp.*, *Bacillus sp.*, *Moraxella catarrhalis*.

- Fórmula/Produto

- Peróxido de Hidrogênio 20 volumes

- Inoculação

- Colocar uma gota de peróxido de hidrogênio (água oxigenada) 3% sobre uma lâmina;
- Com auxílio de fio bacteriológico, agregar a colônia em estudo na gota de peróxido de hidrogênio.

- Interpretação

- Positivo: Presença imediata de bolhas - a produção de efervescência indica a conversão do H_2O_2 em água e oxigênio gasoso.
- Negativo: Ausência de bolhas ou efervescência.

PROVA DE COAGULASE

- Princípio

- Verificar a capacidade de microrganismos reagirem com o plasma e formarem um coágulo, uma vez que a coagulase é uma proteína com atividade similar à protrombina, capaz de converter o fibrinogênio em fibrina, que resulta na formação de um coágulo visível.

- Pode ser encontrada em duas formas que possuem diferentes propriedades: coagulase conjugada e coagulase livre.
- **A coagulase livre** (prova em tubo), é uma substância similar à trombina e está presente em filtrados de cultivos. É secretada extra - celularmente e reage com uma substância presente no plasma denominado Fator de Reação com a Coagulase – CRF, para formar um complexo que, por sua vez, reage com fibrinogênio, formando fibrina (coágulos).
- Quando uma suspensão em plasma do microrganismo produtor de coagulase é preparada em tubo de ensaio, forma-se um coágulo visível após o período de incubação.

- Utilidade

- Separar as espécies de *Staphylococcus sp.* de importância clínica, *S. aureus* – coagulase positiva, das demais espécies – coagulase negativa.

- Fórmula/Produto

- Plasma de coelho com EDTA liofilizado.

- Inoculação

Coagulase livre:

- Com auxílio do fio bacteriológico, suspender colônias em estudo em caldo BHI e colocar em estufa à 37°C até que turve;
- Se necessário, acertar a turbidez até 0,5 da escala de MacFarland;
- Em um tubo de ensaio estéril, colocar 0,5 ml de plasma reconstituído e 0,5 ml do caldo BHI com crescimento bacteriano recém-turvado;
- Incubar em estufa à 35°C;
- Verificar se há presença de coágulo;

- Se não houver presença de coágulo, incubar o tubo em temperatura ambiente e repetir as leituras com 18 e 24 horas de incubação.

- Interpretação

Coagulase livre:

- Positiva: presença de qualquer grau de coágulo.
- Negativa: ausência de coágulo.

ÁGAR MUELLER HINTON

- Princípio

- Ágar padronizado por Kirby e Bauer e pelo NCCLS que oferece condições de crescimento das principais bactérias.

- Utilidade

- Meio utilizado para a realização do teste de avaliação da resistência aos antimicrobianos pelos métodos de difusão em disco e E-test para enterobactérias, não fermentadores, *Staphylococcus sp.* , *Enterococcus sp.*

- Fórmula (por litro de água purificada)

- Peptona de caseína 17,5 g
- Peptona de carne 2,0 g
- Amido 1,5 g
- Ágar 17,0 g

- Procedimentos

- Pesar e hidratar o meio;;
- Autoclavar o meio hidrolisado;
- Distribuir 60 ml em cada placa de 140 mm;.
- Deixar esfriar em temperatura ambiente;

- Embalar as placas com plástico PVC transparente e guardar em geladeira (4 a 8°C).

- Inoculação

- Preparar uma suspensão da bactéria a ser testada em salina 0,85% ou caldo TSB na escala 0,5 de MacFarland;
- Embeber o “swab” na suspensão;
- Acrescentar os discos a serem testados;
- Incubar a placa de acordo com instruções do NCCLS para a bactéria a ser testada.

- Interpretação

- Cor original do meio: amarelo palha.
- A zona do diâmetro é particular para cada droga e organismo, sendo comparado com diâmetros padronizados, que determina cada microrganismo sendo sensível, intermediário ou resistente.

ÁGAR EOSINA AZUL DE METILENO (EMB)

- Fórmula (por litro de água purificada)

- Peptona de Gelatina – 10,0g
- Lactose – 5,0g
- Sacarose – 5,0g
- Fosfato dipotássico – 2,0g
- Eosina Y – 0,4g
- Azul de Metileno – 0,065g
- Ágar – 13,5g

- Princípio:

Usado como meio clássico para o isolamento e diferenciação de enterobactérias. Neste meio a combinação de eosina e azul de metileno como um

indicador promove uma diferenciação distinta entre as colônias de organismos fermentadores da lactose e os que não fermentam a lactose. A sacarose é incluída neste meio para detectar os membros do grupo coliforme que fermentam este carboidrato mais rápido que a lactose. As colônias lactose positivas são negras ou possuem centros negros com a periferia transparente, ao passo que as lactose ou sacarose negativas são incolores. O meio é ligeiramente inibidor para organismos Gram – positivos e as colônias de *E. coli* ficam verde brilhante neste meio.

ÁGAR FERRO – LISINA

- Fórmula (por litro de água purificada):

- Peptona de gelatina – 5,0g
- Extrato de Levedura – 3,0g
- Glicose – 1,0g
- L – lisina – 10,0g
- Citrato férrico amoniacal – 0,5g
- Tiosulfato de sódio – 0,04g
- Púrpura de bromocresol – 0,02g
- Ágar - 13,5g

- Princípio:

- O Ágar ferro lisina é um meio diferencial para a identificação de bacilos entéricos. O Ágar ferro lisina é utilizado para diferenciação de microrganismos entéricos com base na sua capacidade de descarboxilação ou desaminação da lisina, formando ácido sulfídrico.
- A dextrose serve como uma fonte de hidratos de carbono fermentáveis. O indicador de pH, púrpura de bromocresol, muda para cor amarela num pH inferior ou igual a 5,2 e tem cor púrpura num pH igual ou superior a 6,8.

- O citrato de amônio férrico e o tiosulfato de sódio são indicadores da formação de ácido sulfídrico. A lisina é o substrato utilizado para detectar as enzimas lisina descarboxilase e lisina desaminase.
- As culturas de bacilos entéricos que produzem ácido sulfídrico causam o escurecimento do meio devido à produção de sulfuretos férricos. As culturas que produzem lisina descarboxilase originam uma reação alcalina (cor púrpura) ou neutra no fundo do meio. Os microrganismos que causam a desaminação da lisina originam o desenvolvimento de uma superfície inclinada vermelha sobre um fundo ácido. Poderá ocorrer a formação de gás, que é muitas vezes irregular ou suprimida.

ÁGAR SAL MANITOL

- Utilidade:

- Ágar Sal manitol é um meio de cultura, usado para o isolamento de *Staphylococcus sp.*. Pode ser utilizado para identificação de *S. aureus* de amostras biológicas como urina, secreções, feridas e exudatos. Também usado na indústria alimentícia para o isolamento e identificação de estafilococos em líquidos e produtos lácteos, carnes e derivados, incluindo conservas e pescados.

- Princípio:

- A degradação do manitol com a produção de ácido, muda a cor do meio de rosado a amarelo. Devido ao seu alto conteúdo de cloreto de sódio, pode-se fazer uma inoculação maciça da amostra em estudo. Geralmente se incubadas as placas por mais ou menos 36 horas, aparecendo as colônias de estafilococos não-patogênicos de tamanho pequeno e rodeadas de uma zona

vermelha. As colônias de *Staphylococcus aureus* fermentadores do manitol são maiores e rodeadas de uma zona amarela.

- Fórmula (por litro de água purificada):

- Peptona de caseína 5,0 g
- Peptona de carne 5,0 g
- Extrato de carne 1,0 g
- D-manitol 10,0 g
- Cloreto de sódio 75,0 g
- Vermelho de fenol 0,025 g
- Ágar 15,0 g

Meio MIO (Motilidade Indol Ornitina)

- Princípio e Utilidade:

- Testes para a produção de indol, motilidade e atividade da ornitina descarboxilase são importantes para a identificação de *Enterobacteriaceae*. O nitrogênio, carbono e aminoácidos são fornecidos pela Gelatina e Caseína. O Extrato de Levedura fornece vitaminas e cofatores necessários para o crescimento assim como fornece nitrogênio e carbono, igualmente.
- A dextrose é uma fonte de energia. A pequena concentração de ágar é adicionada para demonstrar a motilidade. Toda a família *Enterobacteriaceae* fermenta dextrose.
- A fermentação abaixa o pH, causando uma mudança na coloração do meio MIO de roxo para amarelo. Quando o organismo possui a ornitina descarboxilase, L-Ornitina é descarboxilada para putrescina, causando um aumento do pH e mudança de cor de amarelo para roxo. O indicador de pH Púrpura de Bromocresol facilita a detecção da atividade da descarboxilase.

- Fórmula (por litro de água purificada):

- Peptona de caseína – 10,0 g
- Peptona de gelatina – 10,0 g
- Extrato de Levedura – 3,0 g

- Glicose – 1,0 g
- L – ornitina – 5,0 g
- Púrpura de bromocresol – 0,02 g
- Ágar 2,0 g

- Interpretação:

- A motilidade é indicada pela turvação do meio ou o crescimento que se estende a partir da linha de inoculação. A reação positiva para ornitina é indicada pela coloração roxa em todo o meio (a intensidade da cor pode variar).
- Se o organismo for negativo para ornitina o meio é amarelo. Indol é detectado pela adição do Reagente de Kovac's na superfície do meio. Uma coloração rosa ou vermelha indica uma cultura positiva para indol. Indol é produzido a partir da presença de triptofano no meio.

CALDO URÉIA (TESTE DA UREASE)

- Princípio e Interpretação:

- O caldo ureia tem por finalidade a diferenciação de *Enterobacteriaceae* com base na capacidade de hidrólise da ureia, por meio da enzima urease;
- A ureia presente no meio é degradada pela enzima urease em duas moléculas de amônia. A amônia formada alcaliniza o pH e esta é indicada pelo vermelho de fenol, fazendo com que o meio antes palha torne-se rosa;

- Fórmula (para um litro de água purificada):

- Peptona de gelatina 1,0 g
- Glicose 1,0g
- Cloreto de sódio 5,0 g
- Fosfato potássico 2,0g
- Uréia 20,0 g

- Vermelho de fenol 0,012 g

- Interpretação:

- Prova POSITIVA: Desenvolvimento de reação alcalina (coloração vermelha).
- Prova NEGATIVA: Ausência de alteração de coloração (amarela).

ÁGAR CETRIMIDE

- Princípio e Utilidade:

- O Ágar Cetrimide é um meio seletivo para o isolamento e contagem de *Pseudomonas aeruginosa*. A cetrimida (brometo de cetiltrimetilamônio) é um composto quaternário de amônio que inibe um grande número de bactérias incluindo espécies de *Pseudomonas sp.*, exceto *Pseudomonas aeruginosa*.
- A produção de piocianina (um pigmento azul, não-fluorescente, solúvel em água e clorofórmio) é estimulada pelo cloreto de magnésio e sulfato de potássio. O meio também favorece a produção de pigmentos fluorescente (pioverdinas) por algumas cepas de *Pseudomonas aeruginosa*.

- Preparo:

- Suspender 46,7 g do meio base desidratado em 1 litro de água destilada;
- Adicionar 10 mL de glicerina;
- Levar lentamente a ebulição, com agitação constante até dissolução completa;
- Dispensar em tubos ou frascos;
- Esterilizar em um autoclave a 121°C por 15 minutos;

- Interpretação:

São considerados **resultados positivos**:

- Colônias com uma pigmentação característica azul ou azul esverdeada rodeando as colônias e que tornam-se fluorescente sob a luz ultravioleta de 254 nm;
- Colônias mucosas acinzentadas, pigmentadas ou não;
- A presença da piocianina pode ser confirmada por extração com clorofórmio. *Pseudomonas aeruginosa* tipicamente produz ambos piocianina e fluoresceína.

- Fórmula do meio base (para um litro de água purificada):

- Peptona pancreática de gelatina - 20,0 g
- Cetrimida - 0,3 g
- Cloreto de magnésio - 1,4 g
- Sulfato de potássio - 10,0 g
- Ágar Bacteriológico - 15,0 g

ÁGAR PCA

- Este meio não contém nenhum inibidor ou indicadores, é principalmente usado para determinar o conteúdo total de microrganismos no leite, produtos lácteos, água e outros materiais.

- Composição típica (g/litro):

- Peptona de caseína 5.0;
- Extrato de levedura 2.5;
- D(+)glucose 1.0;
- agar-agar 14.0

- Preparo:

Hidratar o meio e autoclavar. Suspender o meio autoclavado em placas de petry de 90mm. As placas são claras e amarelada.

Anexo B - Resultados da realizada pela metodologia Identificação do Maldi – TOF

Numeração Isolado	Organismo (identificação mais provável)	Valor de Score	Organismo(segunda identificação mais provável)	Valor de Score
Re 0	<i>Klebsiella variicola</i>	2.317	<i>Klebsiella variicola</i>	2.308
Re 2.2	<i>Pseudomonas mendocina</i>	2.064	<i>Pseudomonas oleovorans</i>	1.866
Re 4.1	<i>Escherichia coli</i>	2.423	<i>Escherichia coli</i>	2.403
Re 4.2	<i>Escherichia coli</i>	2.273	<i>Escherichia coli</i>	2.233
Re 05	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2.41	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2.343
Re 06	<i>Escherichia coli</i>	2.145	<i>Escherichia coli</i>	2.082
Re 7.1	<i>Klebsiella variicola</i>	2.469	<i>Klebsiella variicola</i>	2.413
Re 7.2	<i>Klebsiella variicola</i>	2.461	<i>Klebsiella variicola</i>	2.461
Re 08	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2.399	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2.319
Re 09	<i>Pseudomonas mendocina</i>	2.044	<i>Pseudomonas oleovorans</i>	1.989
Re 11.1	<i>Klebsiella variicola</i>	2.515	<i>Klebsiella variicola</i>	2.454
Re 11.2	<i>Klebsiella variicola</i>	2.427	<i>Klebsiella variicola</i>	2.313
Re 12.1	<i>Staphylococcus aureus</i>	2.307	<i>Staphylococcus aureus</i>	2.263
Re 14	<i>Klebsiella variicola</i>	2.408	<i>Klebsiella variicola</i>	2.376
Re 19	<i>Klebsiella variicola</i>	2.465	<i>Klebsiella variicola</i>	2.447
Ue 01	<i>Staphylococcus aureus</i>	1.787	<i>Staphylococcus aureus</i>	1.772
Ue 02	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	2.173	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	2.154
Ue 03	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	2.106	<i>Staphylococcus equorum</i>	2.091
Ue 04	<i>Klebsiella variicola</i>	2.442	<i>Klebsiella variicola</i>	2.429
Ue 05	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1.803	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1.793
Ue 06	<i>Klebsiella variicola</i>	2.471	<i>Klebsiella variicola</i>	2.447
Ue 09	<i>Escherichia coli</i>	2.222	<i>E. coli</i>	2.153
Ue 12 (P1)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.465	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.404

Ue 16 (P2)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.532	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.521
Ue 25 (P3)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.395	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.387
Ue 26	<i>Escherichia coli</i>	2.503	<i>Escherichia coli</i>	2.452
Ue 27	<i>Escherichia coli</i>	2.33	<i>Escherichia coli</i>	2.256
Ue 29	<i>Escherichia coli</i>	2.354	<i>Escherichia coli</i>	2.281
Ue 30	<i>Klebsiella variicola</i>	2.502	<i>Klebsiella variicola</i>	2.375
Ue 31	<i>Klebsiella variicola</i>	2.556	<i>Klebsiella variicola</i>	2.524
Ue 33	<i>Klebsiella variicola</i>	2.282	<i>Klebsiella variicola</i>	2.247
Ue 34	<i>Klebsiella variicola</i>	2.17	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2.066
Me 01	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2.101	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1.902
Me 04	<i>Escherichia coli</i>	2.459	<i>Escherichia coli</i>	2.423
Me 06	<i>Escherichia coli</i>	2.556	<i>Escherichia coli</i>	2.256
Me 07	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2.53	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2.482
Me 09	<i>Klebsiella variicola</i>	2.45	<i>Klebsiella variicola</i>	2.441
Me 18	<i>Klebsiella variicola</i>	2.472	<i>Klebsiella variicola</i>	2.458
Me 19	<i>Klebsiella variicola</i>		<i>Klebsiella variicola</i>	
Me 27	<i>Escherichia coli</i>	2.406	<i>Escherichia coli</i>	2.296
Me 29	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	2.056	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	1.901
Me 30	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	2.176	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	1.752
Me 31	<i>Staphylococcus equorum</i>	2.131	<i>Staphylococcus equorum</i>	1.909
Me 34	<i>Staphylococcus aureus</i>	2.22	<i>Staphylococcus aureus</i>	2.217
SA1	<i>Staphylococcus hominis</i>	1.184	<i>Staphylococcus hominis</i>	1.754

9. APÊNDICE

9.1 Apêndice A - Artigo tipo Short Communication

Pesquisa de genes de *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM} e *bla*_{CTX-M} em amostras de efluentes líquidos dos hospitais de um município do Vale dos Sinos no Rio Grande do Sul

Introdução

A resistência bacteriana é considerada um problema de saúde pública mundial, realidade para a qual têm sido propostas diversas iniciativas de controle. Assim, a contínua emergência de microrganismos resistentes nas instituições de saúde constitui-se um grande desafio, mobilizando órgãos nacionais e internacionais de vigilância e controle epidemiológicos.

Nas últimas décadas, a ocorrência de pacientes hospitalizados colonizados ou infectados por microrganismos multirresistentes tem merecido atenção das Comissões de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH) e dos serviços de saúde, especialmente considerando a diversidade da condição clínica dos pacientes e a variedade de condutas profissionais. Vale acrescentar que o índice dessas infecções representa um dos indicadores de qualidade no cuidado à saúde.

A disseminação das infecções associadas aos cuidados de saúde é complexa e multifatorial. A presença de bactérias multirresistentes serve como parâmetro de avaliação dos métodos e rotinas adotadas no tocante ao controle de infecções hospitalares, bem como do uso adequado de desinfetantes, antimicrobianos e métodos de esterilização permitidos em legislação vigente.

Neste sentido, a abordagem do ambiente na disseminação de bactérias, avaliando-se os efluentes líquidos, visa contribuir para melhor compreensão e definição das recomendações e políticas de controle dentro dos estabelecimentos de saúde, bem como nortear a vigilância e monitoramento da qualidade da água para consumo humano.

O objetivo deste trabalho é pesquisar a presença dos genes de resistência *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM} e *bla*_{CTX-M} em bactérias do gênero *Pseudomonas sp.*, *Klebsiella sp.* e

da espécie *E. coli* em efluentes hospitalares de três hospitais de um município do Vale dos Sinos/RS.

Materiais e Métodos

As coletas de efluente foram realizadas em três hospitais de um município do Vale dos Sinos/RS. Os pontos de coleta caracterizaram-se por serem pontos de saída do esgotamento sanitário das unidades de saúde, que abrangiam o esgotamento de toda a planta da unidade, logo antes da dispersão deste no sistema público de esgotamento sanitário.

O efluente foi diluído em água peptonada através da técnica de diluição seriada até a diluição 10^{-6} . Após, foram semeadas alíquotas de 100µL, de cada uma das diluições, ágar Macconkey através da técnica de espalhamento em meio sólido, que foram incubadas por 24 horas a 37°C.

Colônias com características morfológicas distintas foram selecionadas de cada meio de cultura, para cada um dos tipos de amostra, e triadas por testes bioquímicos convencionais. Após a identificação bioquímica pelos métodos bioquímicos tradicionais citados, os isolados foram confirmados pelo método Maldi – TOF, equipamento Microflex da marca Bruker, conforme orientações do fabricante.

Os isolados testados para susceptibilidade aos antimicrobianos foram semeados em ágar TSA e incubados por 24 horas a 37°C. Após a incubação, uma alçada de colônia de cada isolado avaliado foi suspensa em solução salina estéril 0,85% com turvação correspondente a 0,5 da escala de McFarland. Após suspensão, com auxílio de suabe estéril, os respectivos isolados foram semeados em placas de Petry de 150mm contendo Ágar Mueller – Hinton, de modo ao crescimento formar um tapete confluyente na placa.

A sensibilidade aos antimicrobianos foi avaliada pela técnica de disco difusão com os antibióticos gentamicina 10µg, amicacina 30µg, ampicilina 10µg, ciprofloxacina 5µg, ceftazidima 30µg, cefepime 30µg, cefotaxima 30µg, ticarcilina + clavulanato 85µg, imipemem 10µg, amoxicilina + clavulanato 30µg, norfloxacina 10µg, tetraciclina 30µg e ertapenem 10µg.

Os isolados identificados como sendo dos gêneros *Klebsiella sp.*, *Pseudomonas sp.* e da espécie *E. coli* tiveram seu DNA extraído com o auxílio da resina quelante Chelex 100 (Marca BioRad) a 5% e Proteinase K 20mg/mL (Marca bioAmerica) conforme Giraffa et al (2000).

Os genes de resistência avaliados nos isolados deste estudo foram *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M}, e *bla*_{SHV} cujas reações de amplificação foram conforme Talukdar et al, 2013.

Resultados e Discussão

Obtiveram-se, após a identificação de todos os isolados, 20% *Klebsiella sp.*, 9% *E. coli* e 5% *Pseudomonas sp.* Em estudo realizado no hospital de Palmas/TO por Baptista et al (2015), pesquisando-se bactérias ambientais e de pacientes, foram identificados 141 isolados ao total, predominando o gênero *Klebsiella sp.* (21,9%) seguido dos gêneros *Acinetobacter sp.* (13,8%), *Pseudomonas sp.* (12,2%), *E. coli* (10,6%) e *Staphylococcus sp.* (8,9%).

Ruiz (2010) avaliando a presença de bactérias no efluente hospitalar do Hospital Santa Casa no município de Votuparanga/SP encontrou 18 isolados de *Klebsiella sp.*, destes quais 14 eram de *K. pneumoniae* e quatro de *K. oxytoca*, equivalendo estes isolados a 28,57% do total de isolados. Estes resultados, quanto aos números totais, corroboram com os resultados encontrados neste trabalho, onde o gênero *Klebsiella sp.* foi predominante.

No Hospital A, houve resistência em maior número de isolados para o antimicrobiano ampicilina. No Hospital B houve resistência em maior número de isolados para os antimicrobianos ampicilina, cefotaxima e amoxicilina + clavulanato e no Hospital C houve maior número de isolados resistentes ao antimicrobiano ampicilina. Evidenciou-se multirresistência em 70% (7/10) dos isolados de *E. coli* 41,66% (5/12) dos isolados de *K. variicola* e 66,66% (2/3) dos isolados de *K. pneumoniae*. Quanto aos isolados de *Pseudomonas sp.*, constatou-se que 75% (3/4).

De 35 isolados para presença de genes de resistência, 62,85% não apresentaram nenhum gene de resistência, 22,85% apresentaram somente um gene de resistência testado e 11,43% tiveram dois genes de resistência testados. Nos isolados de *E. coli* predominou a presença do gene *bla*_{SHV}, nos isolados de *Pseudomonas sp.* e *Klebsiella sp.* o gene *bla*_{CTX-M}.

Nos isolados que apresentaram dois genes simultaneamente, 8,75% (03/35) positivaram *bla*_{SHV} e *bla*_{TEM} e 2,86% (02/35) apresentaram os genes *bla*_{SHV} e *bla*_{CTX-M}. Chagas (2011) encontrou em 16% dos isolados avaliados em seu trabalho a presença simultânea dos genes *bla*_{SHV} e *bla*_{TEM} e um isolado positivo para *bla*_{SHV} e *bla*_{CTX-M}. Estes resultados encontrados pelo autor recém citado são similares aos encontrados neste trabalho.

Um isolado de *Klebsiella pneumoniae* apresentou o gene de resistência *bla*_{CTX-M}, porém não apresentou nenhum fenótipo de resistência em relação aos antimicrobianos testados. Possivelmente, este isolado é um isolado oriundo do ambiente que adquiriu o gene de resistência por transferência horizontal de outras bactérias que estavam no ambiente aquático do efluente deste hospital.

Quanto ao gênero *Pseudomonas sp.*, neste trabalho, identificaram-se as espécies *P. aeruginosa* e *P. mendocina* e ambos apresentaram o gene *bla*_{CTX-M}. A disseminação global de *bla*_{CTX-M} é frequentemente associada à “plasmídeos de resistência epidêmicos” que carregam *bla*_{CTX-M}, outros genes de resistência aos β – lactâmicos, genes de resistência às quinolonas ou metilases que degradam os aminoglicosídeos.

Conclusão

Foram encontradas bactérias multirresistentes dos gêneros *Klebsiella sp.*, *Pseudomonas sp.* e da espécie *E. coli* nos efluentes dos hospitais avaliados. Foram encontrados nos isolados avaliados neste trabalho os genes de resistência *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM} e *bla*_{CTX-M}. Está ocorrendo a disseminação de genes de resistência e bactérias resistentes a antimicrobianos através dos efluentes estudados, para os corpos hídricos regionais.

Referências Bibliográficas

Chagas TGP. 2011. **Detecção de bactérias multirresistentes aos antimicrobianos em esgoto hospitalar no Rio de Janeiro**. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical) - Fundação Osvaldo Cruz, Rio de Janeiro.

Giraffa G. et al. An evaluation of chelex-based DNA purification protocols for the typing of lactic acid bacteria. *Journal of Microbiological Methods* 42 (2000) 175–184.

Talukdar PK, Rahman M, Rahman M, Nabi A, Islam Z, Hoque MM, Endtz HP, Islam MA. 2013. Antimicrobial Resistance, Virulence Factors and Genetic Diversity of *Escherichia coli* Isolates from Household Water Supply in Dhaka, Bangladesh. *PLOS ONE*.8(4):1-8.