IDENTIFICAÇÃO DE BACILOS GRAM-NEGATIVOS PRODUTORES DE GENES CODIFICADORES DE BETA-LACTAMASES DE ESPECTRO ESTENDIDO EM AMOSTRAS DE EFLUENTE SANITÁRIO NA ESTAÇÃO DE TRATAMENTO DE ESGOTO – ETE ESPINHEIROS JOINVILLE/SC

Julia Haubricht[1]
Engenheira Ambiental e Sanitarista. Mestranda em Engenharia Civil na linha de pesquisa de Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental

Endereço[1]**:** Rua Herbert Hoppe, 139 – Glória - Joinville - SC - CEP: 89216-540 - Brasil - Tel: +55 (47) 99655-7051 - e-mail: julia.haubricht@aguasdejoinville.com.br

RESUMO

Com o avanço da medicina moderna, muitas doenças podem ser devidamente tratadas com medicamentos antimicrobianos, mas seu uso desenfreado por décadas começa a mostrar as consequências com a formação de microrganismos multirresistentes, gerando grande preocupação na saúde pública. Este trabalho objetivou investigar e identificar as bactérias gram-negativas produtoras de ESBL em uma estação de tratamento de esgoto no bairro Espinheiros, em Joinville/SC. Foram realizadas amostragens em diferentes etapas do tratamento de efluente sanitário e as bactérias foram identificadas através de testes fenotípicos convencionais. Foi realizado o método de disco-difusão para determinação da sensibilidade das colônias aos antimicrobianos. Das 24 bactérias identificadas, 83,33% correspondem às amostragens realizadas nos períodos mais frios do ano, nos quais predominaram as bactérias *Escherichia sp e Klebsiella sp*, ambas associadas à microbiota intestinal de animais homeotérmicos. Todas as bactérias identificadas tiveram alguma resistência aos cinco antimicrobianos testados, sendo 91,66% das amostras resistentes ao antimicrobiano *Ceftriaxona*, seguido de 70,83% de resistência ao antimicrobiano *Cefepime*, e 62,5% ao *Ceftadizima*. Amostras do efluente tratado após a etapa de desinfecção não tiveram crescimento de colônias de bactérias, atestando a efetividade deste processo na remoção dos patógenos remanescentes do efluente sanitário.

PALAVRAS-CHAVE: Resistência bacteriana, Estação de tratamento, Saúde pública.

INTRODUÇÃO

A resistência a antimicrobianos é uma das principais e mais crescentes preocupações de saúde pública. Desde a descoberta do primeiro antimicrobiano, houve um grande avanço gerado, porém especialmente nas últimas décadas foi observada uma vulnerabilidade cada vez maior dos humanos aos desafios contemporâneos de saúde global, como doenças infecciosas emergentes e reemergentes conforme demonstrado pela pandemia de coronavírus (COVID-19), gripe aviária, epidemias virais de Ebola e Zika, aumento da resistência antimicrobiana e o fardo crescente de doenças não transmissíveis (KOBS, 2021).

O uso indiscriminado dos antimicrobianos no ambiente hospitalar, pecuário, alimentos e doméstico ocasionou o surgimento das primeiras cepas resistentes. Em um panorama mundial, a aplicação incorreta de antimicrobianos está entre os problemas mais urgentes de saúde pública do século XXI, sendo estimado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) que em 2050 a principal causa de mortes será a resistência bacteriana, o que ultrapassaria as mortes atribuídas ao câncer. A mesma organização anunciou recentemente que a resistência a antimicrobianos está nos deixando sem opções de tratamento (LEPESOVA et al., 2020; FERREIRA; OLIVEIRA, 2021).

O ambiente hospitalar foi o primeiro espaço para a identificação das bactérias resistentes a antimicrobianos que além dos pacientes infectados atingiram também o sistema de esgotamento sanitário. Este último proporciona uma maior e constante pressão e seleção de manutenção de populações de cepas resistentes em todos os ambientes (LEPESOVA et al, 2020). Em seu estudo, Chagas (2011) investigou a presença bactérias resistentes aos antimicrobianos em efluentes de uma estação de tratamento de esgoto no Rio de Janeiro e indicou que, mesmo após o tratamento, o esgoto pode ser considerado um veículo ambiental de disseminação de bactérias multirresistentes.

Esta emergência de mecanismos bacterianos de resistência contribui para a diminuição da eficácia dos antibióticos, estando associados ao agravamento progressivo da morbidade e mortalidade e, eles também têm um grande impacto econômico nos sistemas de saúde devido ao aumento dos custos decorrentes de internações prolongadas (BESSA; LARANJEIRA, 2020; CERCEO et al., 2016). Entretanto, a análise acerca da expansão dos mecanismos de resistência no meio ambiente é limitada, e com isto tem se tornado um grande reservatório de bactérias multirresistentes (VECCHIA, 2021).

A crescente expressão de genes de resistência promove falha no mecanismo de ação do antibiótico. As principais enzimas que inativam os antibióticos são denominadas beta-lactamases, e atuam catalisando a hidrólise do anel beta-lactâmico, levando à perda da ação do antimicrobiano sobre a bactéria (QIN et al., 2020). As Enterobacterales produtoras de genes codificadores de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) também ocupam a “Lista de patógenos prioritários" da Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma preocupação de “Prioridade 1” (WHO, 2021).

OBJETIVO

Diante da necessidade de melhorias das estratégias de promoção da saúde, sanitárias e ambientais, o presente trabalho teve como objetivo identificar a presença de bactérias patogênicas portadoras de genes de resistência a antimicrobianos em amostras de uma estação de tratamento de esgoto em Joinville/SC.

METODOLOGIA UTILIZADA

No total, foram estabelecidos os três pontos de coleta de amostras. Os pontos de coleta estão ilustrados na Figura 1 e são os seguintes: P1 – Esgoto bruto - Chegada do esgoto bruto na ETE, P2 – Reator biológico – Coleta de amostra líquida do lodo biológico, P3 – Esgoto tratado – Coleta do efluente tratado antes de receber a desinfecção por hipoclorito de sódio. A Figura 2 mostra o fluxograma da metodologia de amostragens e análises.

Para amostragem microbiológica de efluentes líquidos foi coletada uma amostra de 1 litro a cada hora durante 24 horas. Para maior representatividade na coleta da amostra do esgoto bruto foi realizada uma amostragem composta com essas alíquotas coletadas de hora em hora durante 24 horas no dia da amostragem, devido a variação diária da vazão da estação. Um equipamento amostrador automático foi utilizado para coleta, sendo instalado logo na chegada de esgoto bruto da estação. Para as coletas do lodo ativado e esgoto tratado da estação foi realizada amostragem manual composta em todos as bateladas que o reator realiza no dia, diretamente nos colares de tomada e registros localizados na estação.

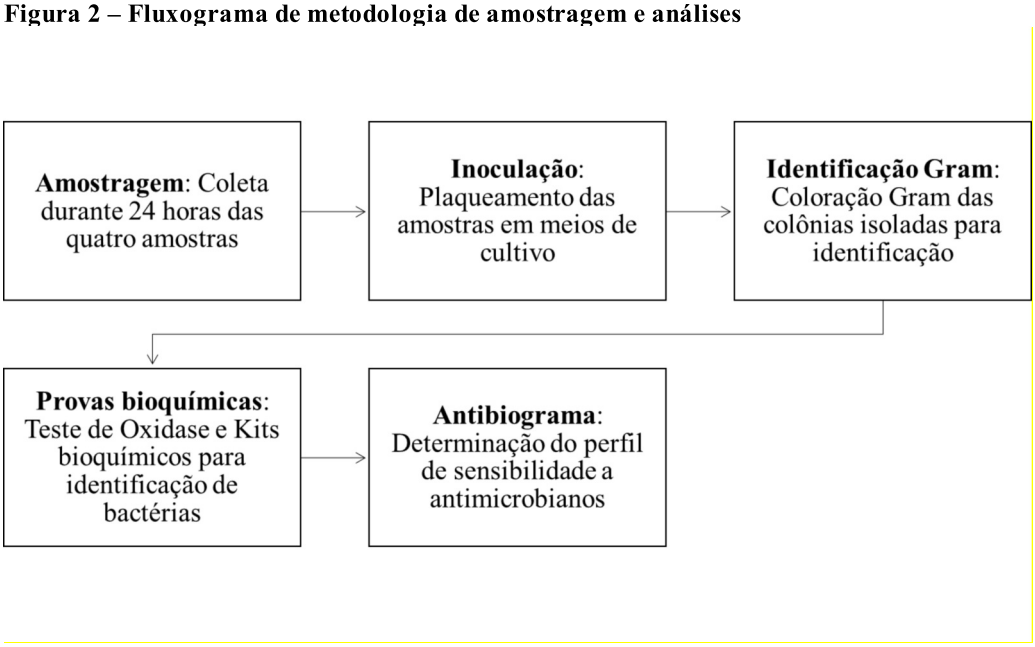
Para manter uma padronização na identificação das amostras coletadas, durante todas as etapas do processo, garantindo um rastreio do material que estava sendo analisado, foi definida a seguinte metodologia de identificação das amostras: inicialmente o mês em que a coleta estava sendo realizada, seguido de “E” para amostras de esgoto bruto, “L” para lodo e “S” para efluente tratado.

Figura 1 – Pontos de coleta de amostras na ETE Espinheiros



Fonte: elaboração própria.

Figura 2 – Fluxograma de metodologia de amostragem e análises



Fonte: elaboração própria.

Com as amostras devidamente coletadas e identificadas por seus pontos de coleta, foi feita a diluição em solução salina em 10-3 para o efluente bruto e lodo ativado. Para a amostra de efluente tratado não foi necessária a diluição. Amostras dessas soluções foram plaqueadas em triplicata.

Seguindo a metodologia empregada por Vecchia (2021) a técnica para a identificação dos microrganismos é possível pelo método de plaqueamento em meio de cultura específico (*Ágar Macconkey*) e Ágar ESBL, para bactérias com espectro expandido, seguido do uso de kits bioquímicos específicos. Decorrido o tempo de incubação, mantendo as placas a 35°C por 48h, as colônias foram selecionadas de acordo com suas características macroscópicas.

As bactérias selecionadas foram submetidas aos testes para confirmação de sua identidade, sendo realizados testes de coloração Gram, para verificar a morfologia. Após, foram aplicados testes bioquímicos utilizando o Kit NF III® (Probac, São Paulo, Brasil) e o kit e mini kit para enterobactérias (New Prov, Paraná, Brasil), seguindo todas as instruções do fabricante para identificação de bactérias (ANVISA, 2008).

O teste de sensibilidade aos antimicrobianos foi realizada utilizado o método de disco-difusão em meio Ágar Mueller-Hinton, no qual o tamanho do halo representa a resistência do microrganismo ao antibiótico (BRCAST, 2022).

O inóculo bacteriano foi preparado a partir de uma placa de Petri contendo colônias isoladas e comparado ao padrão 0,5 na escala de turvação de McFarland (DensiCHECK Plus® - bioMérieux). A suspensão foi inoculada em toda a superfície da placa contendo meio de cultura ágar Mueller-Hinton (bioMérieux) e foi feita a aplicação dos discos de antimicrobianos após 5 minutos. Em seguida, a placa foi incubada em posição invertida em estufa a 35ºC, por 16 a 18 horas.

Os antimicrobianos testados foram *cefepime* (30 µg), *ceftazidima* (30 µg), *ceftriaxona* (30 µg), *imipenem* (10 µg) e *meropenem* (10 µg), todos da marca Laborclin.

Tabela 1 - Identificação e abreviaturas dos antimicrobianos utilizados

Identificação	Abreviatura
cefepime (30 µg)	CPM 30
ceftazidma (30 µg)	CAZ 30
ceftriaxona (30 µg)	CRO 30
imipenem (10 µg)	IPM 10
merompenem (10 µg)	MER 10

Fonte: elaboração própria.

RESULTADOS OBTIDOS

Ao todo foram coletadas 20 amostras, tendo havido crescimento de bactérias em apenas 12. Destas, foram identificadas 21 bactérias, sendo 8 do esgoto bruto, 5 do lodo ativado e 8 da saída (efluente tratado). Importante ressaltar que as amostragens do efluente tratado foram realizadas antes da etapa de desinfecção. Amostras do efluente tratado após a desinfecção também foram coletadas, porém não houve crescimento de nenhuma colônia de bactérias, o que comprova a efetividade da desinfecção da ETE Espinheiros.

Com a metodologia apresentada, foi possível identificar todas as colônias isoladas no estudo e seus respectivos graus de sensibilidade aos antimicrobianos testados.

A Tabela 2 traz o resumo dos resultados obtidos, sendo R – resistente, S – sensível, e I – resistente de acordo com a exposição. Para a coluna "ID amostra", os números correspondem ao mês de coleta e as letras o tipo de efluente, sendo que L é para lodo ativado, E para esgoto bruto e S para saída (ou efluente tratado).

Tabela 2 – Resultados de identificação de bactérias e de sensibilidade à antimicrobioanos

Placa	CPM 30	CAZ 30	CRO 30	IPM 10	MER 10	ID amostra	Identificação IDENTAX *Newprov* e Painel PROBAC
1	R	S	R	I	S	12L	*Escherichia coli*
2	I	R	R	I	S	02E	*Citrobacter farmeri*
3	R	S	R	I	S	02E	*Escherichia coli*
4	R	R	R	I	S	02L	*Escherichia coli*
5	I	R	R	I	S	04E	*Citrobacter freundii*
6	I	S	R	I	S	04E	*Enterobacter cloacae*
7	R	R	R	I	S	04S	*Ochrobactrum anthropi*
8	I	S	R	I	S	04S	*Klebsiella pneumoniae*
9	R	R	R	I	I	06E	*Klebsiella pneumoniae*
10	R	R	R	I	R	06E	*Klebsiella pneumoniae*
11	R	R	R	I	S	06E	*Escherichia coli*
12	R	R	R	I	R	06S	*Klebsiella oxytoca*
14	R	R	R	I	S	06S	*Escherichia coli*
16	R	R	R	I	I	06L	*Klebsiella aerogenes*
17	R	R	R	I	S	06S	Grupo *Acinetobacter iwoffii*
23	R	R	R	I	S	08E	*Klebsiella oxytoca*
25	R	R	R	I	S	08L	*Aeromonas hydrophila complex*
27	I	S	R	I	S	08L	*Pseudomonas aerugonosa*
28	I	I	R	I	S	08S	*Klebsiella oxytoca*
29	R	I	R	I	R	08S	*Enterobacter cloacae*
30	I	I	R	I	S	08S	*Pseudomonas fluorescens/putida*

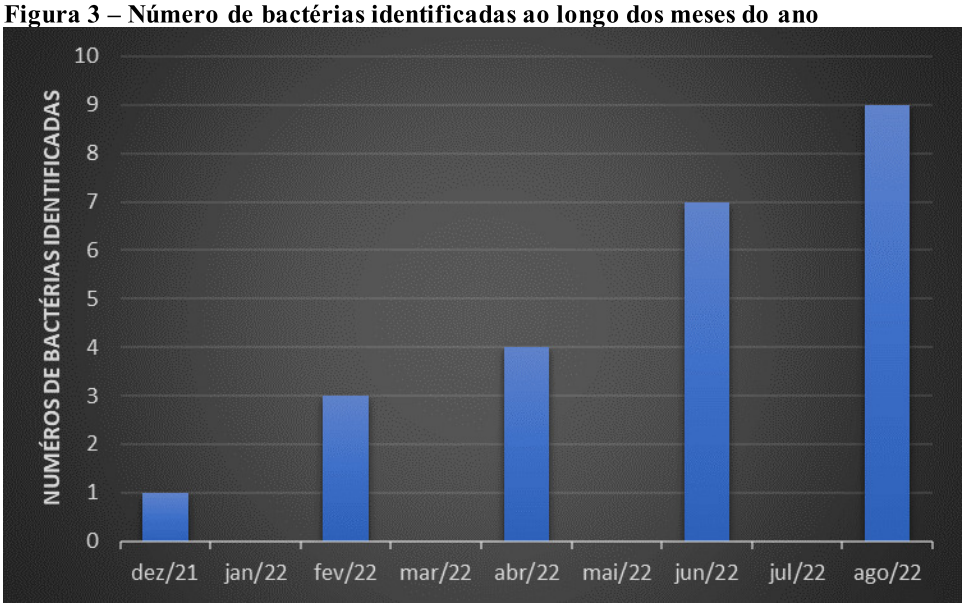
Fonte: elaboração própria a partir de dados obtidos no estudo.

Os resultados foram interpretados de acordo com as diretrizes do BRCast. Observa-se que a maior resistência apresentada pelos microrganismos foi ao antimicrobiano Ceftriaxona, sendo 91,66% das amostras totalmente resistentes. Para o antimicrobiano *Cefepime*, 70,83% das amostras foram totalmente resistentes. Para o *Ceftadizima,* 62,5% das amostras foram totalmente resistentes. O *Meropenem* obteve apenas 20,8% de resistência, seguido do *Imipenem*, com apenas 8,33% de resistência.

ANÁLISE E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

De acordo com a bula de *Ceftriaxona* e *Cefepime*, estes são antimicrobianos capazes de eliminar grande variedade de bactérias causadoras de diversos tipos de infecções, como meningite, infecções respiratórias agudas ou crônicas, infecções renais e do trato urinário e febre tifoide. Segundo Dalbosco et al (2003), infecções urinárias são consideradas as mais comuns na medicina, responsáveis por 80 a cada 1000 consultas clínicas. A Figura 3 apresenta a distribuição das bactérias identificadas ao longo dos meses do ano.

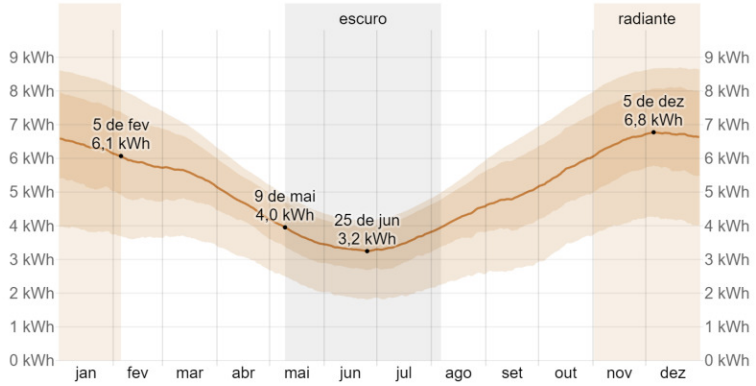
Figura 3 – Número de bactérias identificadas ao longo dos meses do ano



Fonte: elaboração própria.

As coletas foram distribuídas igualmente entre as estações do ano, no entanto, no período do inverno e outono houve um crescimento maior das colônias de bactérias, visto que das 21 bactérias identificadas na Tabela 3, 83,33% correspondem às amostragens realizadas nos períodos mais frios do ano. Na figura 4 temos a média diária de energia solar de ondas curtas incidentes em Joinville, que representa o total diário incidente de energia solar de ondas curtas que chega à superfície do solo. A radiação de ondas curtas inclui a luz visível e a radiação ultravioleta.

Figura 4 – Média diária de energia solar de ondas curtas incidentes em Joinville



Fonte: © WeatherSpark.com (2022).

O período mais radiante do ano dura 3,1 meses, de 1 de novembro a 5 de fevereiro, com média diária de energia de ondas curtas incidente por metro quadrado acima de 6,1 kWh. O mês mais radiante do ano no Joinville é dezembro, com média de 6,7 kWh. O período mais escuro do ano dura 2,9 meses, de 9 de maio a 6 de agosto, com média diária de energia de ondas curtas incidente por metro quadrado abaixo de 4,0 kWh. O mês mais escuro do ano no Joinville é junho, com média de 3,3 kWh.

Mais da metade dos óbitos que ocorrem no Brasil são devidos doenças respiratórias e diarreia aguda, especialmente na região Sul do Brasil as taxas de mortalidade por doenças respiratórias supera as de diarreia aguda, ocorrendo em maiores taxas nos meses mais frios do ano (WHO, 2021). No entanto, para muitos estudiosos ainda não está totalmente clara a relação direta e única da temperatura ambiente baixa com o aumento dos casos clínicos respiratórios, visto que diversos outros fatores também podem ser relacionados, como: aglomeração em ambientes fechados, número de moradores de uma mesma casa, aumento da exposição a poluentes domésticos, tabagismo ativo e passivo, entre outros (FRAUCHES et al., 2017; HORTAL et al., 1990). De qualquer forma, são nos períodos frios que a população está mais sujeita à medicação por antimicrobianos, o que vem ao encontro dos resultados encontrados nas amostragens.

As colônias de bactérias de *Escherichia sp* e *Klebsiella sp* foram predominantes nas amostragens. A *Escherichia sp* é encontrada no intestino grosso de seres humanos e animais homeotérmicos, constituindo cerca de 80% da flora intestinal aeróbia. Participa ativamente na função biológica de suprimir bactérias nocivas e na síntese da vitamina K, importante na formação de cabelos e plaquetas sanguíneas (WASTESON, 2002). Portanto, não é incomum encontrá-la em estações de tratamento de esgoto. Segundo dados de Palou et al. (2011), esta bactéria está relacionada a 50% das infeções hospitalares e 70 a 90% das infecções do trato urinário em pacientes dos Estados Unidos da América (EUA).

A resistência da *Escherichia sp* à maioria dos antimicrobianos tem aumentado desde a década de 1990, provavelmente relacionado ao uso indiscriminado de medicamentos, assim como a falta de monitoramento ou ausência de epidemiológico de resistências do Escherichia sp aos antimicrobianos (LINDGREN et al, 2003).
A bactéria *Klebsiella sp* é encontrada amplamente no meio ambiente e microbiota do trato intestinal de humanos e animais, causadora de grandes infecções hospitalares, responsável por altas taxas de mortalidade devido sua resistência aos antimicrobianos, por isso, também é chamada de microrganismo multirresistente (MURRAY et al., 2004).

Os microrganismos podem adquirir resistência aos antimicrobianos por meio intrínseco, quando codificada por um gene universalmente encontrado no genoma da espécie e cuja expressão independe da prévia exposição a antimicrobianos, ou quando da aquisição de novo material genético móvel ou mutações decorrentes da exposição a antimicrobianos. A partir do momento em que o gene é modificado, este código é passado para as próximas células-filhas desta bactéria, conferindo resistência a estas novas células também (ALAM et al., 2019; HOLLENBECK; RICE, 2012).

Em se tratando de recursos hídricos e levando-se em consideração os resultados aqui apresentados, é de suma importância que a coleta e tratamento do esgoto seja universalizada pois, de outra forma, os patógenos que comprovadamente são eliminados no tratamento do esgoto, estariam sendo dispostos na natureza, com alto potencial causador de poluição hídrica, prejudicando a vida tanto da fauna e flora, quanto humana (METCALF & EDDY, 1991).

CONCLUSÕES/RECOMENDAÇÕES

Este trabalho obteve êxito na investigação e identificação de bactérias patogênicas com resistências a agentes antimicrobianos encontradas na estação de tratamento de esgoto do bairro Espinheiros, em Joinville/SC. As bactérias que se destacaram foram a *Escherichia sp* e *Klebsiella sp*, por sua predominância nas amostragens. Ambas as bactérias são mundialmente conhecidas por serem responsáveis por diversas doenças clínicas.

Todas as bactérias identificadas tiveram alguma resistência aos cinco antimicrobianos testados, sendo 91,66% das amostras totalmente resistentes ao antimicrobiano *Ceftriaxona*, seguido de 70,83% de resistência ao antimicrobiano *Cefepime*, e 62,5% ao *Ceftadizima*, todos estes medicamento são recomendados no tratamento das doenças supracitadas. Amostras do efluente tratado após a etapa de desinfecção não tiveram crescimento

de colônias de bactérias, atestando a efetividade deste processo na remoção dos patógenos remanescentes do esgoto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALAM, M M et al. *Antimicrobial resistance crisis and combating approaches. Journal of Medicine (Bangladesh)*, v. 20, n. 1, p. 38–45, 2019. Disponível em: DOI: 10.3329/jom.v20i1.38842. Acesso em: 25 abr. 2022.

2. ANVISA, Módulo 3: Gram negativos e Fermetadores. Disponível em https://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/boas_praticas/modulo3/introducao.htm. Acesso em: 15 abr. 2022.

3. BESSA, V C; LARANJEIRA, B J. Mecanismos De Resistência Bacteriana Em Cocos Gram Positivos. Revista Científica UNIFAGOC, Caderno Saúde, Volume I, 2020. Disponível em: https://revista.unifagoc.edu.br/index.php/saude/article/view/424. Acesso em: 15 abr. 2022.

4. BRCAST. Orientações do EUCAST para a detecção de mecanismos de resistência e resistências específicas. Disponível em http://brcast.org.br/documentos/. Acesso em 15/04/2022.

5. CERCEO, E et al. *Multidrug-resistant gram-negative bacterial infections in the hospital setting: Overview, Implications for Clinical Practice, and Emerging Treatment Options. Microbial Drug Resistance* Vol 22, No 5, 2016. Disponível em: doi: 10.1089/mdr.2015.0220. Acesso em: 25 set. 2022.

6. CHAGAS, T P G. Detecção de bactérias multirresistentes aos antimicrobianos em esgoto hospitalar no Rio De Janeiro. Orientadora: Marise Dutra Asensi. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical) apresentada ao Programa de Pós-graduação da Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2011.

7. DALBOSCO, V et al. Infecções do trato urinário. RBM - Revista Brasileira de Medicina, 60(6): 320-: 326-: 328-: passim-322, 326, 328, jun. 2003.

8. FERREIRA, B L S; OLIVEIRA, T C D. Resistência bacteriana e sua relação com o consumo incorreto de antibióticos. Revista Multidisciplinar Em Saúde, 2(2), 48, 2021. Disponível em: https://doi.org/10.51161/rems/1205. Acesso em: 13 abr. 2022.

9. FRAUCHES, D de O et al. Doenças respiratórias em crianças e adolescentes: um perfil dos atendimentos na atenção primária em Vitória/ES. Revista Brasileira de Medicina de Família e Comunidade, Rio de Janeiro, v. 12, n. 39, p. 1 – 11, Jan-Dez 2017.

10. HOLLENBECK, B L.; RICE, L B. *Intrinsic and acquired resistance mechanisms in Enterococcus. Virulence*, n.1, v. 3, n. 5, p. 421–569, 2012. Disponível em: DOI: 10.4161/viru.21282. Acesso em: 20 set. 2022.

11. HORTAL, B et al. *A community-based study of acute respiratory tract infections in children in Uruguay. Rev Infect Dis,* 12 (Suppl 8), p. 966–973, 1990.

12. KOBS, V C. Investigação da resistência microbiana em bactérias isoladas de animais de companhia e dos respectivos humanos contactantes: Uma Abordagem *One Health*. Orientador: Paulo Henrique Condeixa de França. Tese (Doutorado em Saúde e Meio Ambiente) apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Meio ambiente, Universidade da Região de Joinville, Joinville, 2021.

13. LEPESOVA, K et al. *Hospital Wastewater — Important Source of Multidrug Resistant Coliform Bacteria with ESBL-Production. International Journal of Environmental Research and Public Heath*, vol.17, p. 21, 2020. Disponível em: doi:10.3390/ijerph17217827. Acesso em: 13 abr. 2022.

14. LINDGREN P. K. et al. *Mutation Rate and Evolution of Fluoroquinolone Resistance in Escherichia coli Isolates from Patients with Urinary Tract Infections. Antimicrob. Agents Chemother*, vol. 47 no. 10 3222-3232, 2003.

15. MURRAY, P et al. Microbiologia Médica, Ed 4. Rio de Janeiro-RJ. Editora Guanabara, 2004.

16. PALOU, J et al. *Etiología y sensibilidad de los uropatógenos identificados en infecciones urinarias bajas no complicadas de la mujer (Estudio ARESC): implicaciones en la terapia empírica. Medicina Clínica*, 2011, Vol.136(1), p.1-7.

17. VECCHIA, M T D. Determinação do perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de bactérias isoladas da baía babitonga. Orientador: Paulo Henrique Condeixa de França. Dissertação (Mestrado em Saúde e Meio Ambiente) apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Meio ambiente, Universidade da Região de Joinville, Joinville, 2021.

18. WASTESON, Y. *Zoonotic Escherichia coli. Acta Veterinaria Scandinavica* vol. 43, n. S79, 2002. Disponível em: http://www.biomed central.com/content/pdf/1751-0147-43-S1- S79.pdf. Acesso em: 25 set. 2022.

19. WHO. *Global Tricycle Surveillance – ESBL E.coli - Integrated Global Surveillance on ESBL-producing E. Coli Using a "One Health" Approach: Implementation and Opportunities. World Health Organization, Global Antimicrobial Resistance Surveillance System (GLASS), Surveillance Prevention and Control,* n.1, p. 76, 2021.