



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO TECNOLÓGICO
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA AMBIENTAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AMBIENTAL**

MARIANA PERIN DE MEDEIROS DAVARIZ

**RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS EM *Escherichia coli* ISOLADAS DE
ESGOTOS HOSPITALARES**

**VITÓRIA
2022**

MARIANA PERIN DE MEDEIROS DAVARIZ

**RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS EM *Escherichia coli* ISOLADAS DE
ESGOTOS HOSPITALARES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção de título de Mestre em Engenharia Ambiental, Área de concentração: Saneamento Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Túlio Alves Cassini

Co-orientador: Prof. Dr. Ricardo Pinto Schuenck

VITÓRIA
2022

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de
Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

P445r Perin de Medeiros Davariz, Mariana, 1995-
Resistência a antimicrobianos em Escherichia coli isoladas
de esgotos hospitalares / Mariana Perin de Medeiros Davariz. -
2022.
86 f. : il.

Orientador: Sérgio Tulio Alves Cassini.
Coorientador: Ricardo Pinto Schuenck.
Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) -
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro Tecnológico.

1. Águas residuais - Microbiologia. 2. Escherichia coli. I.
Alves Cassini, Sérgio Tulio. II. Pinto Schuenck, Ricardo. III.
Universidade Federal do Espírito Santo. Centro Tecnológico. IV.
Título.

CDU: 628

AGRADECIMENTOS

A Deus e ao meu anjo da guarda, agradeço por iluminarem meu caminho e me sustentarem nos dias desafiadores.

Aos meus pais, irmã e minha avó Mariza por acreditarem em mim todos os dias e não duvidarem da minha capacidade. Obrigada por me educarem com amor e me ensinarem sobre o respeito e amor ao próximo.

Ao Ian por iluminar meus dias e fazer minha vida mais leve e feliz, obrigada pelo amor, compreensão e a parceria nessa vida.

Aos meus amigos, Thales, Juliana, Maria, Talita, Ana Paula e Monaliza, vocês são os maiores presentes que a vida poderia ter me oferecido. Agradeço de coração por terem sido meu canal de lamentações, risadas e fortalecimento.

A Letícia do LABCAS, sem você nada disso teria acontecido. Serei eternamente grata por tudo que construímos juntas nesses anos de mestrado.

Ao Lucas e Larissa do CPID, pelo suporte e principalmente pela amizade. Que honra ter conhecido vocês. Os levarei sempre no coração.

Aos Professores Sérgio Túlio Cassini e Ricardo Schuenck, serei eternamente grata pela confiança e por terem dividido comigo tanto conhecimento.

As Professoras Liliana Cruz Spano e Regina Keller, que fizeram parte da banca e contribuíram imensamente para a construção desse trabalho.

Agradeço também a FAPES pelo apoio financeiro e incentivo ao projeto de pesquisa.

RESUMO

A presença de antimicrobianos em efluentes tem sido alvo de pesquisas nas áreas de saúde pública e ambiental, devido, principalmente, ao potencial desenvolvimento de bactérias resistentes e sua persistência no meio ambiente. Na comunidade científica, os efluentes hospitalares vêm chamando cada vez mais atenção por ser uma importante fonte de resistência bacteriana aos antimicrobianos e seus genes associados. Nesse contexto, a *Escherichia coli* é um dos principais indicadores de qualidade de águas, evidenciando contaminação recente por esgotos sanitários. A análise de resistência a antimicrobianos em *Escherichia coli* pode representar uma significativa aproximação dos efeitos gerais de BRA em esgotos sanitários e sua possível disseminação ambiental. Este trabalho teve por objetivo isolar cepas de *Escherichia coli* de efluentes hospitalares, identificando o nível de resistência dos isolados a antimicrobianos específicos. Os resultados das análises físico-químicas dos efluentes hospitalares, de maneira geral, estão dentro dos encontrados em literatura, mas com diferenças entre si. Encontrou-se evidências da contaminação por efluentes em um lago pertencente à uma unidade hospitalar. No HJSN 1 e HSJN 2, foram obtidos perfis de resistência diferentes na entrada e saída da estação de tratamento de esgotos, respectivamente. Também no HEAC, os perfis de resistência foram diferentes nos pontos HEAC 1 e HEAC 2, sendo este apresentando maior diversidade de tipos de antimicrobianos. No ponto denominado como HUCAM 1 foram encontradas cepas de *Escherichia coli* resistentes à ampicilina, ciprofloxacina e sulfametoxazol – trimetropima. No HUCAM 2, as maiores porcentagens de resistência estavam atreladas, além da ampicilina, à amicacina e à tetraciclina. O HUCAM LAGOA apresentou resistência também a ampicilina e a sulfametoxazol – trimetropima, mas também a ciprofloxacina. Cepas de *Escherichia coli* expressando multirresistência igual à 7 foram observadas em amostras do HEAC, HUCAM Lago e na saída da ETE do HJSN. Estas bactérias que apresentam perfis característicos de resistência a antimicrobianos podem apresentar um risco ambiental na medida em que estas cepas de bactérias

coliformes podem disseminar a resistência para outras bactérias, inclusive aquelas com características patogênicas. Esse monitoramento dos níveis de resistência aos ATB em bactérias, como a *Escherichia coli* nos efluentes, pode ser usado como um sistema de alerta precoce para mudanças nos padrões de resistência da população humana e animal. Entretanto, o potencial risco humano e na natureza em relação ao lançamento de efluentes hospitalares bactérias resistentes aos antimicrobianos ainda são incertos. Se faz necessário uma padronização de relatórios e exigência do monitoramento como tantos outros parâmetros de qualidade de água, especialmente no Brasil, para permitir a construção de um banco de dados que são essenciais para a tomada de decisões na saúde baseada em evidências.

Palavras-chave: *Escherichia coli*; resistência a antimicrobianos; efluentes hospitalares.

ABSTRACT

The presence of antimicrobials in effluents has been the subject of research in areas of public and environmental health, mainly due to the potential development of resistant bacteria and their persistence and dissemination on environment. In scientific community, hospital effluents have been drawing attention as an important source of bacterial resistance antimicrobials and their associated genes. In this context, *Escherichia coli* is one of the main indicators of water quality, evidencing contamination by sanitary sewage. The analysis of antimicrobial resistance in *Escherichia coli* can represent a significant approximation of the general effects of antimicrobial resistant bacteria in sanitary sewage and its possible environmental spread. This work aimed to isolate *Escherichia coli* strains from hospital effluents, verifying the level of resistance of the isolates to specific antimicrobials. The results of the physical-chemical analysis of hospital effluents, in general, are within the range found in the literature, but with differences between them. Evidence of contamination by effluents was found in a lake belonging to a hospital unit. In HJSN 1 and HSJN 2, different resistance profiles were obtained at the influent and effluent. Also at HEAC, resistance profiles were different at HEAC 1 and HEAC 2 points, the last one had a greater variability of antimicrobial types. In HUCAM 2, the highest percentages of resistance were linked, in addition to ampicillin, to amikacin and tetracycline. HUCAM LAGOA also showed resistance to ampicillin and sulfamethoxazole – trimethoprim, but also to ciprofloxacin. *Escherichia coli* strains expressing multidrug resistance equal to 7 were observed in samples from HEAC, HUCAM Lago and at the WWTP effluent of HJSN. These bacteria that have characteristic antimicrobial resistance profiles may present an environmental risk as these strains of coliform bacteria can spread resistance to other bacteria, including those with pathogenic characteristics. This monitoring of antimicrobials resistance levels in bacteria such as *Escherichia coli* in effluents can be used as an early warning system for changes in resistance patterns in the human and animal population. However, the potential human and nature risk in relation to the release of hospital effluents from antimicrobial resistant bacteria are still uncertain. It is necessary to standardize reporting and monitoring

requirements like so many other water quality parameters, especially in Brazil, to allow the construction of a database that is essential for evidence-based health decision-making.

Keywords: *Escherichia coli*; antibiotic resistance; hospital wastewater.

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

µg: micrograma

ARB: *Antibiotic Resistance Bacteria* - Bactéria Resistente aos Antimicrobianos

ARG: *Antibiotic Resistance Genes* - Genes de Resistência aos Antimicrobianos

AMC: Amoxicilina + Ácido Clavulânico

AMP: Ampicilina

APHA: *American Public Health Association*

ATB: Antimicrobianos

ATCC: *American Type Culture Collection*

ATM: Aztreonam

BrCAST: *Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

CFE: Cefalexina

CIP: Ciprofloxacina

CLO: Cloranfenicol

CONAMA: Conselho Nacional de Meio Ambiente

CREFES: Centro de Reabilitação Física do Espírito Santo

CT: Coliformes Termotolerantes

CTX: Cefotaxima

CONAMA: Conselho Nacional de Meio Ambiente

DBO: Demanda Bioquímica de Oxigênio

DQO: Demanda Química de Oxigênio

DDD: doses diárias definidas

EPA: *Environmental Protection Agency*

ETE: Estação de Tratamento de Esgotos

ESBLs: β -lactamases de espectro estendido

GEN: Gentamicina

GLASS: *Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System*

IPM: Imipinem

HEAC: Hospital Estadual de Atenção Clínica

HJSN: Hospital Estadual Dr. Jayme Santos Neves

HUCAM: Hospital Universitário Cassiano Antônio Moraes

MR: multiresistência

MER: Meropenem

MUG: 4-metilumbeliferil- β -D-glucoronídeo

MP: multi-parâmetro

NMP: Número Mais Provável

n: número de amostras

OMS: Organização Mundial da Saúde

ONPG: Orto-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo

PPT: Piperacilina + Tazobactam

RA: Resistência a Antimicrobianos

SUT: Sulfametoxazol +Trimetropima

TET: Tetraciclina

THG: Transferência Horizontal de Genes

TVG: Transferência Vertical de Genes

UFC: Unidades formadoras de colônia

UV: Luz Ultravioleta

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Consumo em dose diária definida/1000 habitantes/dia de subgrupos de antimicrobianos no Brasil e em outros países, 2016	20
Figura 2: Comparação entre os anos de inserção dos ATB na saúde e a primeira resistência associada à cada tipo, observada ao longo do tempo.....	23
Figura 3: Mecanismos de resistência bacteriano, divididos em resistência intrínseca e adquirida.....	25
Figura 4: Representação esquemática das bactérias indicadores de contaminação fecal (CT = Coliformes Totais; C. Termo = Coliformes Termotolerantes)	30
Figura 5: Método de substrato Cromogênico-Fluorogênico para detecção de Coliformes e Escherichia coli, simultaneamente (ONPG = Orto-nitrofenil-β-D-galactopiranosídeo; MUG = 4-metilumbeliferil-β-D-glucoronídeo).	32
Figura 6: Vias de transmissão para a disseminação de bactérias resistentes a antimicrobianos e genes de resistência no meio ambiente.....	34
Figura 7: Localização no mapa dos hospitais e os pontos de coleta das amostras de efluentes hospitalares na Região Metropolitana de Vitória – ES.	48
Figura 8: Fluxograma do método utilizado para isolamento de Escherichia coli.	53
Figura 9: Método da cartela com reações positivas para Coliformes Totais.	54
Figura 10: Método da cartela com reações positivas para Escherichia coli.	54
Figura 11: Coleta de amostras positivas para E. coli.....	54
Figura 12: Plaqueamento das amostras positivas em meio A1 e ágar bacteriológico.	54
Figura 13: Porcentagem de amostras confirmadas para Escherichia coli em relação ao total (71 amostras) por hospital.	62
Figura 14: Resistência e multirresistência aos antimicrobianos testados em Escherichia coli por ponto de coleta para cada hospital.	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Exemplos de antimicrobianos e principais mecanismos de ação associados.....	21
Tabela 2: Exemplo de bactérias com resistência intrínseca.	26
Tabela 3: Valores médios obtidos por autores por meio das análises físico-químicas e microbiológicas de efluentes hospitalares e valores médios de esgotos sanitários.	38
Tabela 4: Estudos publicados avaliando a resistência aos antimicrobianos em <i>Escherichia coli</i> isoladas de efluentes hospitalares utilizando método de Disco de Difusão.	40
Tabela 5: Descrição dos pontos de coleta em cada hospital.....	47
Tabela 6: Datas das coletas e número de amostras coletadas no total.	50
Tabela 7: Parâmetros analisados de qualidade de efluentes e métodos aplicados.....	51
Tabela 8: Antimicrobianos utilizados no presente estudo e suas respectivas concentrações para o método de difusão de disco.	56
Tabela 9: Interpretação dos halos de inibição dos antimicrobianos utilizados.	56
Tabela 10: Média e desvio-padrão dos resultados obtidos das análises físico-químicas e microbiológica dos efluentes hospitalares	58
Tabela 11: Resultado das amostras após testes bioquímicos.....	60
Tabela 12: Classificação das resistências obtidas dos testes de Disco de Difusão em Ágar das amostras de efluentes coletadas do CREFES.....	63
Tabela 13: Classificação das resistências obtidas dos testes de Disco de Difusão em Ágar das amostras de efluentes coletadas do HUCAM.	64
Tabela 14: Classificação das resistências obtidas dos testes de Disco de Difusão em Ágar das amostras de efluentes coletadas do HJSN.	65
Tabela 15: Classificação das resistências obtidas dos testes de Disco de Difusão em Ágar das amostras de efluentes coletadas do HEAC.	66

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS	18
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1. ANTIMICROBIANOS	19
3.1.1. Principais tipos de antimicrobianos e seus mecanismos de ação	20
Fonte: autora.	21
3.2. RESISTÊNCIA BACTERIANA A ANTIMICROBIANOS (BRA)	21
3.2.1. Mecanismos de resistência	24
3.2.2. Resistência horizontal e vertical	28
3.3. <i>Escherichia coli</i> COMO BIOINDICADORA DE QUALIDADE DA ÁGUA	29
3.4. ANTIMICROBIANOS E MEIO AMBIENTE	32
3.4.1. Esgotos hospitalares	36
3.5. LEGISLAÇÃO AMBIENTAL NACIONAL E INTERNACIONAL	43
3.5.1. Aspectos regulatórios internacionais	43
3.5.2. Aspectos regulatórios nacionais	45
4. METODOLOGIA	47
4.1. COLETA DE AMOSTRAS	47
4.2. CARACTERIZAÇÃO DOS EFLUENTES HOSPITALARES	51
4.2.1. Análises físico-químicas	51
4.2.2. Análises microbiológicas	52
4.3. ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE <i>E. coli</i> DE EFLUENTES HOSPITALARES	52
4.3.1. Isolamento da <i>Escherichia coli</i>	53
4.3.2. Testes bioquímicos confirmatórios de <i>Escherichia coli</i>	54
4.4. AVALIAÇÃO DO PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE BACTERIANA	55
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
5.1. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E MICROBIOLÓGICA DOS EFLUENTES HOSPITALARES	57
5.2. RESULTADO DO ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE <i>E. COLI</i>	60

5.3. PERFIL DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS DOS ISOLADOS DE <i>Escherichia coli</i> POR DISCO DE DIFUSÃO EM ÁGAR	62
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES	72
7. RECOMENDAÇÕES	73
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

1. INTRODUÇÃO

A introdução da utilização de antimicrobianos (ATB) no tratamento de infecções bacterianas a partir da década de 1940, representou um gigantesco avanço para a medicina e qualidade de vida de populações humanas. Entretanto, a sua utilização indiscriminada, contribui para o fenômeno da resistência bacteriana aos antimicrobianos (ARB) que, atualmente, representa um dos maiores desafios da medicina contemporânea.

A resistência bacteriana aos antimicrobianos, caracteriza-se pela prevalência de cepas específicas que sobrevivem a ação dos mesmos devido ao desenvolvimento de mecanismos de adaptação e resistência. Diante disso, a frequente ocorrência de eventos de resistência aos antimicrobianos na saúde pública, gera um quadro de preocupação devido à redução de novos tipos de antimicrobianos e possível letalidade desses quadros clínicos infecciosos.

Os casos de ARB estão relacionados à elevada pressão seletiva de antimicrobianos nos organismos de seres humanos e animais, sendo a atuação primária sobre a microbiota intestinal devido, principalmente, a sua posologia via oral.

Embora as bactérias resistentes são isoladas, frequentemente, em amostras clínicas, inúmeros microrganismos resistentes e seus genes que conferem resistência têm sido encontrados em esgotos hospitalares e em matrizes ambientais devido a pressão seletiva impostas pelas atividades humanas. Essas atividades incluem o uso excessivo de antimicrobianos em clínicas, hospitais e asilos (DUAN *et al.*, 2020; FENG *et al.*, 2017) e até mesmo na automedicação. Outras atividades incluem o uso de antimicrobianos para prevenir doenças no âmbito veterinário e promover o crescimento em animais de fazenda e aquicultura (WATSS *et al.*, 2017; XIONG *et al.*, 2018).

À medida que as bactérias resistentes aos antimicrobianos morrem, os genes de resistência (ARG) podem ou não serem degradados, sendo detectados em fontes de água potável (SCHWARTZ *et al.*, 2003), águas superficiais (BAI *et al.*, 2017).

al., 2019), solo (CHEN *et al.*, 2016), ar (BRĄGOSZEWSKA e BIEDRON, 2018) e nas estações de tratamento de efluentes (NEUDORF *et al.*, 2017). Assim, as ARB, patogênicas ou não, estão presentes nas fezes e, conseqüentemente, nos efluentes associados a hospitais e domicílios.

No meio ambiente, os ATB, mesmo em baixas concentrações, podem facilitar o desenvolvimento e a manutenção da resistência bacteriana (GULLBERG *et al.*, 2011). As estações de tratamento de esgoto (ETE), especialmente as que tratam efluentes hospitalares, foram reconhecidas como reservatório de bactérias resistentes (RIZZO *et al.*, 2013) e as principais vias de disseminação de bactérias e genes de resistência à antimicrobianos para diferentes matrizes ambientais.

No Brasil, as Resoluções do Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA) nº 357/2005 e 430/2011 estabelecem condições e padrões de lançamentos de efluentes nos corpos hídricos. Além disso, o padrão de potabilidade vigente é estabelecido pela Portaria de Consolidação do Ministério da Saúde nº 888 de 04 de maio de 2021 e suas alterações, que dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano no país. Ainda que, as normativas supracitadas elencam diversos parâmetros químicos e microbiológicos, não estabelecem limites padrões para os antimicrobianos presentes em lançamento de efluentes sanitários e hospitalares, que se apresentam em baixas concentrações (na ordem de micro e nanogramas). Tão pouco, abordam o monitoramento de ARB e ARG em efluentes sanitários.

Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) mais recentes, em 2009, haviam 2.219 unidades de saúde em todo Espírito Santo. Porém, conforme a Companhia Espírito Santense de Saneamento, em 2013, apenas 115 das unidades de saúde pertencentes ao estado eram autorizadas a realizar a ligação à rede de tratamento da Companhia (CESAN, 2013). Dessas que não são ligadas a rede da CESAN, infere-se que possuem ou não solução para tratamento de esgoto gerado pela unidade, sendo ambas

opções lançamentos em corpos hídricos próximos às unidades e por fim, ligações clandestinas à rede.

A *Escherichia coli* é um dos principais indicadores de qualidade de águas referenciado na legislação, evidenciando contaminação recente por esgotos sanitários. E devido a sua presença na microbiota intestinal de animais homeotérmicos, essas bactérias são continuamente expostas ao uso de antimicrobianos para o tratamento de infecções bacterianas, adquirindo e transmitindo genes que conferem resistência.

Dessa forma, a análise de resistência a antimicrobianos em *Escherichia coli* pode representar uma significativa aproximação dos efeitos gerais de ARB em esgotos sanitários e sua possível disseminação em diferentes matrizes ambientais. Contribuindo, principalmente, para nortear e destacar a importância da vigilância e monitoramento no tratamento de efluentes dentro dos estabelecimentos de saúde. Uma vez que, a realidade da infraestrutura do saneamento brasileiro é deficiente, não somente em relação à cobertura, mas também referente à qualidade do tratamento que, atualmente, não visa a remoção de bactérias resistentes e seus genes associados.

2. OBJETIVOS

- Objetivo Geral:

- Avaliar a resistência aos antimicrobianos em isolados de *Escherichia coli* provenientes de esgotos hospitalares da Região Metropolitana de Grande Vitória – ES.

- Objetivos específicos:

- Caracterizar os esgotos hospitalares por meio das análises físico-químicas e microbiológicas;

- Isolar e caracterizar *Escherichia coli* do efluente sanitário hospitalar;

- Analisar o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos em isolados de *Escherichia coli*.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. ANTIMICROBIANOS

Após o estabelecimento da correlação entre os microrganismos e doenças no final do século XIX, os cientistas direcionaram as novas pesquisas para a busca de substâncias que pudessem matar ou reduzir o crescimento do patógeno sem causar problemas à pessoa ou ao animal infectado. Essas substâncias desenvolvidas e eficazes vêm modificando o enfoque da maior parte das doenças, principalmente, as bacterianas.

Na década de 1930, o cientista britânico Alexander Fleming expandiu esta fronteira ao descrever a penicilina, inibidor bacteriano produzido por um fungo identificado com *Penicillium notatum*, sendo mais tarde chamado de *Penicillium chrysogenum*. Porém, atualmente, os antimicrobianos são sintetizados ou modificados em laboratórios para o uso em terapias humanas e veterinárias.

A classe dos fármacos com ação antimicrobiana inclui os antibacterianos, antifúngicos, antiprotzoários e antivirais. Os antibacterianos dividem-se em antibióticos (sintetizados por fungos e bactérias) e os quimioterápicos (produzidos em laboratório). Os antimicrobianos (ATB) são compostos que possuem a capacidade de controlar ou inibir o crescimento de microrganismos que possam vir a causar infecções (DALHOLF, 2020). Atualmente, no Brasil, a lista de antimicrobianos para tratar infecções bacterianas, sob uso de prescrição médica, está em torno de 130 compostos.

As atividades dos ATB, em relação ao crescimento, resumem-se em dois principais mecanismos: bactericida (causando a morte das bactérias) e bacteriostático (inibindo o crescimento bacteriano sem causar a morte). Entretanto, as porcentagens excretadas de antimicrobianos por meio da urina e fezes podem variar de 20% a 90% do composto original (Jelic *et al.*, 2015).

Nas últimas décadas, os antimicrobianos têm sido utilizados em quantidades cada vez maiores sem o correto controle (DANNER *et al.*, 2019). Um estudo realizado pela Organização Mundial da Saúde (OMS, 2018), de 2016 à 2018, com objetivo de fornecer a primeira visão geral dos resultados sobre o consumo de antimicrobianos e destacar os desafios e as etapas futuras no monitoramento do consumo de antimicrobianos, obteve que entre 65 países, o Brasil foi um dos maiores consumidores de antimicrobianos do mundo, superando a média do Canadá, Europa e Japão.

A figura 1, divulgada pela OMS (2018), expõe o consumo de antimicrobianos, em doses diárias definidas (DDD) por 1000 habitantes por dia, por subgrupo de antimicrobianos em seis países diferentes em 2015. Dentre Bolívia, Canadá, Costa Rica, Paraguai e Peru, o Brasil ocupou o primeiro lugar, prevalecendo o consumo de beta-lactâmicos (53,4%), macrolídeos (16,2%) e quinolonas (12,8%).

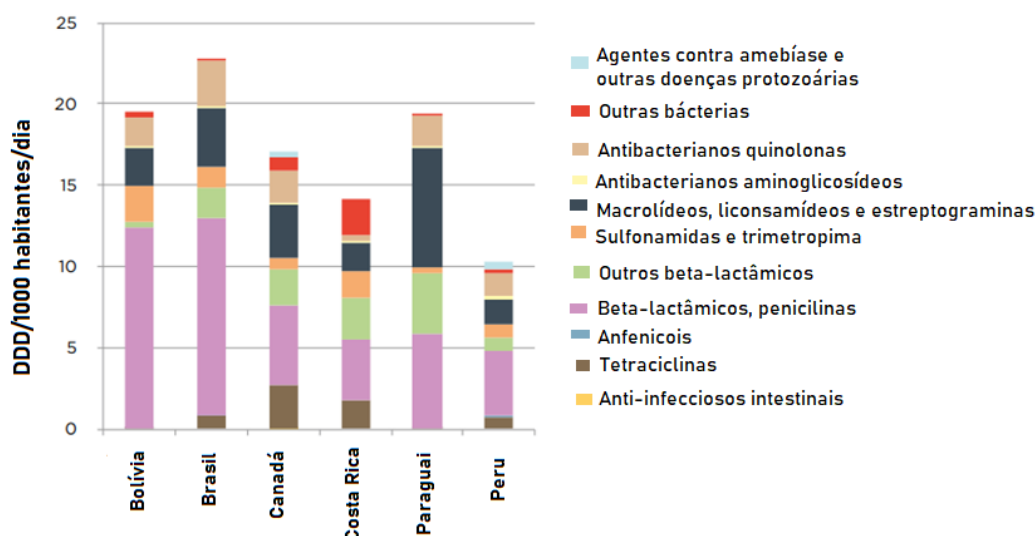


Figura 1: Consumo em dose diária definida/1000 habitantes/dia de subgrupos de antimicrobianos no Brasil e em outros países, 2016

Fonte: Modificado de OMS, 2018.

3.1.1. Principais tipos de antimicrobianos e seus mecanismos de ação

A forma mais comum de classificar os antimicrobianos é de acordo com o alvo na célula bacteriana, sendo, também, agrupados pela sua estrutura química

e quanto ao espectro de ação. Este último refere-se à diversidade de organismos afetados pelo agente, podendo ter largo (atuando contra bactérias gram-negativas e gram-positivas), intermediário e baixo (com atividade restrita a um grupo de bactérias) espectro de ação (GUARDABASSI *et al.*, 1998; TRABULSI *et al.*, 1999).

Os antimicrobianos formam um grupo diversificado de produtos químicos que pode ser dividido em diferentes subgrupos, como β -lactâmicos, quinolonas, tetraciclina, aminoglicosídeos, cloranfenicóis, sulfonamidas, entre outros. A tabela 1 ilustra exemplos de antimicrobianos e os alvos específicos da célula.

Tabela 1: Exemplos de antimicrobianos e principais mecanismos de ação associados.

Grupos de antimicrobianos	Principais mecanismos de ação	Exemplo de classes
β -lactâmicos	Inibição da síntese da parede celular bacteriana	Penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e monobactâmicos
Fluoroquinolonas	Enzima DNA-girase bacteriano	Ciprofloxacina
Tetraciclina	Impedem a síntese protéica	Tetraciclina
Aminoglicosídeos	Impedem a síntese protéica	Estreptomicina e Gentamicina
Cloranfenicóis	Impedem a síntese protéica	Cloranfenicol
Sulfonamidas	Inibição de enzimas redutases e sintetases	Sulfametoxazol

Fonte: autora.

3.2. RESISTÊNCIA BACTERIANA A ANTIMICROBIANOS (BRA)

Um dos problemas emergentes na medicina é o uso inadequado dos antimicrobianos que estão ligados diretamente à resistência bacteriana. Dentre os fatores que contribuíram para o crescente problema de resistência, segundo Reygaert (2018) incluem: aumento do consumo de antimicrobianos, tanto por

humanos quanto por animais e; prescrição inadequada de antimicrobianos na terapia.

Os microrganismos que não possuem seu crescimento ou multiplicação inibido pelas concentrações dos ATB ministrados, bem como aqueles que não têm respostas clínicas durante o tratamento, são considerados resistentes, e multirresistentes (MR) quando possuem a capacidade de resistir aos efeitos de diferentes classes, sendo uma característica inerente às bactérias ou adquirida durante a infecção (CARVALHO et al., 2021). Segundo Coutinho et al. (2013), microrganismos com resistência a pelo menos três classes de antimicrobianos são considerados multirresistentes.

O uso excessivo está relacionado, principalmente, à prescrição médica que é baseada em uma combinação de baixo custo e baixa toxicidade (GRIFFITH *et al.*, 2012). Também pode haver prescrição inadequada, ou seja, administração de ATB de amplo espectro quando as de menor espectro seriam suficientes e disponíveis (YU, 2011). Outros motivos são o desrespeito à posologia e o tempo de tratamento inadequado do medicamento (CHAGAS, 2011 apud SOUZA et al., 2008). Além disso, o uso prévio de antibiótico coloca o paciente em risco de infecção por um organismo resistente ao composto (REYGAERT, 2018).

O uso irresponsável de antimicrobianos, favorece a pressão seletiva, tendo como consequência a seleção e predominância de espécies bacterianas cada vez mais resistentes. A magnitude cada vez maior da resistência antimicrobiana encontrada em patógenos humanos é uma grande preocupação para a saúde pública em todo o mundo, limitando as opções de tratamento para infecções bacterianas (WINTERSDORFF et al., 2016).

A resistência aos antimicrobianos pode ocorrer tanto por mutações e transferências verticais quanto pela aquisição de genes que conferem resistência via transferência horizontal de genes (TGH), sendo esta última considerada o fator mais importante na disseminação da resistência (WINTERSDORFF et al., 2016), detectada até mesmo anteriormente à produção e uso de antimicrobianos por humanos. Por exemplo, β -lactamases foram

encontradas como sendo transmitidas por plasmídeos e capazes de se transferir entre espécies bacterianas há milhões de anos (BARLOW e HALL, 2002).

Embora a resistência aos antimicrobianos seja um fenômeno natural aos microrganismos, ocorrendo em ambientes com impactos antropogênicos baixos ou ausentes (ALLEN et al., 2010; RIESENFELD et al., 2004; SEGAWA et al., 2013), a taxa na qual esses processos ocorrem e o número de cepas resistentes aumentaram significativamente nas últimas décadas, tornando-se um problema significativo quando é acelerada pela utilização incorreta de drogas e descuido humano (OMS, 2010). Somado a isso, a falta de desenvolvimento de novos antimicrobianos e o aumento da resistência até mesmo aos de último recurso, traz consequências preocupantes para a saúde humana e veterinária.

A resistência aos antimicrobianos, segundo JIM O'NEIL et al. (2014), é reconhecida como uma ameaça ao desenvolvimento e à prosperidade global, podendo levar, até 2050, 10 milhões de mortes anualmente, ficando à frente de casos de câncer em todo mundo. Essa ameaça à saúde é diretamente relacionada à capacidade de tratar uma série de infecções causadas por agentes patogênicos, colocando em risco cirurgias de grande porte, transplante de órgãos, tratamento de bebês prematuros, controle de diabetes e quimioterapia contra o câncer sem antimicrobianos eficazes (OMS, 2018). A figura 2, apresenta-se o tempo que passou desde a introdução de antimicrobianos específicos e a observação de bactérias resistentes a eles.

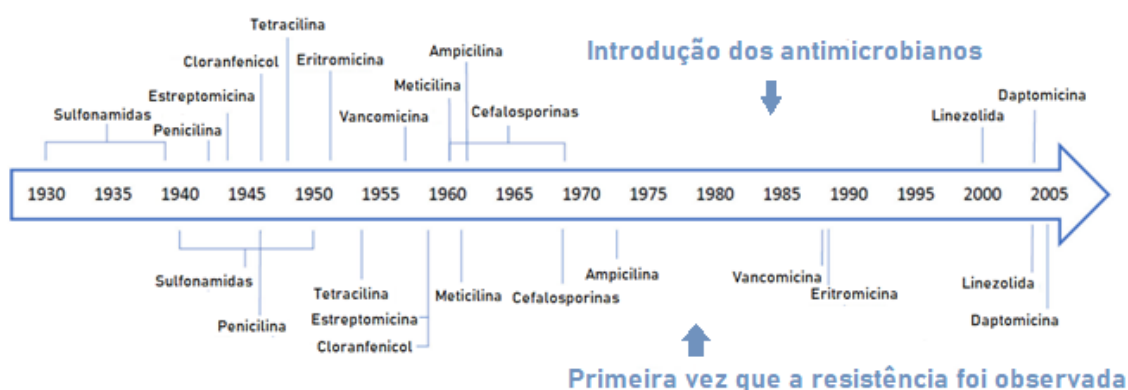


Figura 2: Comparação entre os anos de inserção dos ATB na saúde e a primeira resistência associada à cada tipo, observada ao longo do tempo.

Fonte: Adaptado de PAZDA et al., 2019.

Destaca-se que, a partir de 1970, houve uma redução das opções de novos tipos de antimicrobianos capazes de tratar diferentes tipos de infecções. Dessa forma, a OMS e Centro Europeu de Prevenção e Controlo das Doenças (ECDC), reconheceram a resistência aos antimicrobianos como um dos mais importantes problemas de saúde pública do século 21, pois pode causar ameaças epidêmicas e alta mortalidade em todo mundo (PAZDA et al., 2019).

O aumento contínuo dos casos de resistência aos antimicrobianos e a redução de opções de tratamento para os pacientes geram quadros de infecções mais graves que precisam de tratamento mais extenso e de altos custos, muitas vezes exigindo a hospitalização prolongada (REYGAERT, 2018), ocorrendo o aumento das taxas de morbidade e mortalidade.

Segundo a OMS (2018), o aumento da resistência não apenas impede nossa capacidade de tratar infecções, mas tem efeitos sociais e econômicos mais amplos. Dessa forma, o impacto direto e indireto da BRA recairá principalmente em países de baixa e média renda, que muitas vezes carecem de infraestrutura, recursos humanos e financeiros para combater adequadamente os casos de resistência.

3.2.1. Mecanismos de resistência

A resistência aos antimicrobianos consiste na capacidade adquirida por um organismo de ser resistente aos efeitos de um agente antimicrobiano, ao qual deveria ser sensível, permitindo ser dividida, principalmente, em resistência intrínseca e adquirida, como exposto na figura 3.

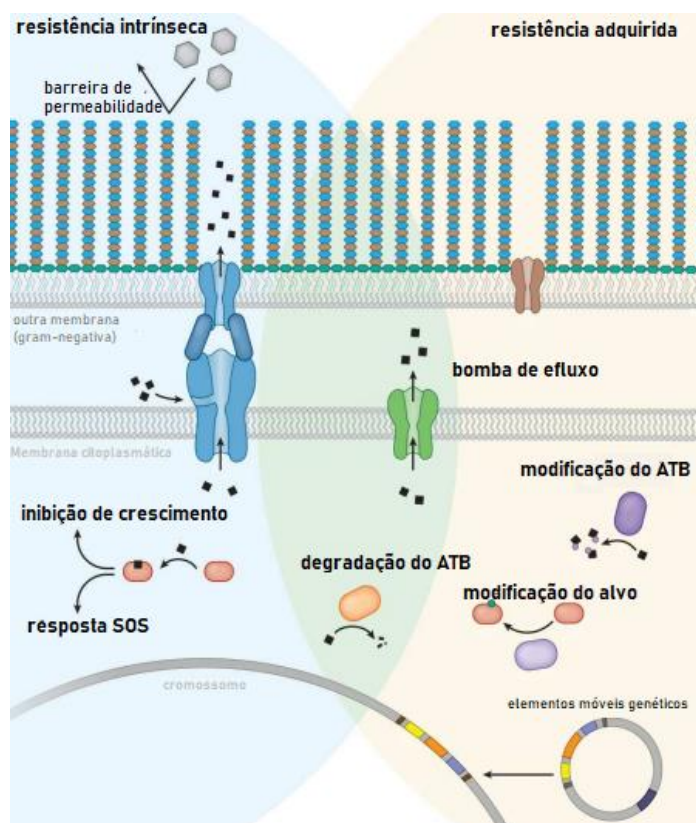


Figura 3: Mecanismos de resistência bacteriano, divididos em resistência intrínseca e adquirida.

Fonte: Adaptado de Surette e Wright (2017).

A resistência intrínseca é descrita como um conjunto de genes expressos na mesma espécie bacteriana e que evoluíram como uma resposta geral aos antimicrobianos (SURETTE e WRIGHT, 2017). Ou seja, é aquela que faz parte das características naturais, fenotípicas do microrganismo, contemplando a herança genética do microrganismo.

Sendo assim, estão inclusas as respostas de reparo ao DNA, bombas de efluxo de amplo espectro, enzimas de inativação codificadas pelo cromossomo bacteriano (β -lactamases, por exemplo) e barreiras de entrada como porinas (BELTRAME, 2021). A resistência intrínseca a ATB representa um fenótipo característico de uma espécie ou organismo, resultante de múltiplos genes e, portanto, não é facilmente transferível por transferência horizontal de genes (ALVAREZ-ORTEGA et al., 2011). Na tabela 2, são apresentados exemplos de bactérias e resistências intrínsecas associadas a cada uma.

Tabela 2: Exemplo de bactérias com resistência intrínseca.

Organismo	Resistência intrínseca
<i>Bacterioides</i>	Aminoglicosídeos, alguns β -lactâmicos e quinolonas
Gram positivas	Aztreonam
<i>Enterococci</i>	Aminoglicosídeos, cefalosporinas e lincosamidas
<i>Listeria monocytogenes</i>	Cefalosporinas
Gram negativas	Glicopeptídicos e lipopeptídicos
<i>Escherichia coli</i>	Macrolídeos
<i>Klebsiella</i> spp.	Ampicilina
<i>Serratia marcescens</i>	Macrolídeos
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Sulfonamidas, ampicilina, cefalosporinas de 1 ^a e 2 ^a geração, cloranfenicóis e tetraciclinas
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Aminoglicosídeos, β -lactâmicos, carbapenêmicos, quinolonas
<i>Acinetobacter</i> spp.	Ampicillinas e glicopeptídicos

Fonte: Adaptado de Reygaert (2018).

As principais discussões sobre resistência aos ATB estão centradas na resistência adquirida, resultante de mutação gênica e a recombinação genética por transferência horizontal de genes (THG) (BAQUERO et al., 2008; HUTINEL et al., 2021). A aquisição, temporária ou permanente, do material genético que confere resistência é possível por todas as principais vias pelas quais as bactérias adquirem qualquer material genético: transformação, transposição, conjugação e mutações em seu próprio DNA cromossômico (REYGAERT, 2018). Dentro desse tipo de resistência, estão inclusas as bombas de efluxo específicas para compostos, expressão de alvos não sensíveis e enzimas que modificam alvos ou moléculas de antimicrobianos (SURETTE e WRIGHT, 2017).

Segundo Reygaert (2018), além da transmissão de genes que conferem resistência por plasmídeos, internamente à bactéria sequências de inserções podem mover o material genético e estressores externos (como radiação UV e produtos químicos) são causas comuns de mutações genéticas (substituições,

deleções e etc.). Geralmente, as mutações que auxiliam na resistência antimicrobiana ocorrem em genes que codificam: alvos de drogas; transportadores de drogas; reguladores que controlam os transportadores de drogas e; enzimas modificadoras de antimicrobianos (MARTINEZ, 2014).

Segundo ANVISA (2007), LIN *et al.* (2015) e REYGAERT (2018), os quatros principais mecanismos de resistência são:

- 1) Limitação da absorção do antibiótico: a membrana celular externa de Gram-negativas detém proteínas como as porinas, que são responsáveis por estabelecer canais específicos para a passagem de substâncias do meio externo para interno celular. A permeabilidade limitada dessas proteínas é responsável pela resistência intrínseca dos bacilos Gram-negativos à penicilina, eritromicina, clindamicina e vancomicina;
- 2) Modificação de sítio-alvo do antibiótico: impedimento da ocorrência de qualquer efeito inibitório ou bactericida, constituindo um dos mais importantes mecanismos de resistência. As bactérias podem codificar um novo produto resistente ao antibiótico, substituindo o alvo original;
- 3) Inativação do ATB: uma das mais conhecidas formas de degradação são as β -lactamases, que hidrolisam a ligação amida do anel beta-lactâmico, destruindo, assim, o local onde os antimicrobianos ligam-se ao alvo bacteriano;
- 4) Remoção do antibiótico ativo da célula bacteriana por meio de bomba de efluxo: bombeamento de ATB do meio intracelular para o extracelular por meio de proteínas transportadoras. Esse sistema pode carrear uma ou mais estruturas capazes de bombear diferentes tipos de medicamentos (WEBBER e PINDOCK, 2003).

A resistência intrínseca pode fazer uso de limitação de captação, inativação dos antimicrobianos e o auxílio das bombas de efluxo. Por outro lado,

os mecanismos de resistência adquirida usados podem ser modificação do alvo, inativação do ATB e efluxo da droga (REYGAERT, 2018)

As bactérias gram negativas, por exemplo, podem fazer o uso de todos os quatro mecanismos principais, enquanto as bactérias gram positivas usam menos o mecanismo de limitação da absorção de um composto (por não possuir a membrana externa) e não têm capacidade para certos tipos de mecanismos de efluxo (CHANCEY et al, 2012 e MAHON et al., 2014).

A primeira β -lactamase a ser caracterizada foi de *E. coli* e é codificada cromossomicamente pelo gene *ampC* (assim chamado por resistência à ampicilina). As β -lactamases AmpC são mais eficazes contra as penicilinas e algumas cefalosporinas de primeira geração (REYGAERT, 2018). Existem também muitas β -lactamases transmitidas por plasmídeos que carregam uma variedade de genes *bla* (genes de β -lactamases). Se essas β -lactamases conferem resistência a cefalosporinas de última geração, elas são designadas como beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs). Os inibidores de β -lactamase são estruturalmente semelhantes às β -lactamases e funcionam em combinação com um fármaco de β -lactâmico e geralmente são: amoxicilina/ácido clavulânico, ampicilina/sulbactam e piperacilina/tazobactam.

Um grande enigma da resistência antimicrobiana é que mesmo em concentrações baixas ou muito baixas de antimicrobianos (sub-inibitórios), podem levar à seleção de alto nível de resistência em sucessivas gerações bacterianas e aumentar a capacidade de adquirir resistência a outros agentes antimicrobianos (BLÁZQUEZ et al., 2012).

3.2.2. Resistência horizontal e vertical

A maioria das estratégias de resistência bacteriana é codificada por um ou mais genes, que podem ser transferidos por meio de diversos mecanismos. Os genes de resistência estão localizados no cromossomo bacteriano - o que confere certa estabilidade genética ao microrganismo - ou nos plasmídeos extra-cromossomiais (KÜMMERER, 2009). Os plasmídeos, além das funções essenciais, podem transportar genes de resistência aos antimicrobianos, tolerar

metais tóxicos, produzir toxinas e sintetizar enzimas (ZHUANG et al., 2021). A transmissão de genes de resistência mediada pelos mesmos, é a via mais comum para aquisição de material genético externo e a transmissão por bacteriófagos é bastante rara (REYGAERT, 2018).

Os microrganismos resistentes a antimicrobianos estão em toda parte no meio ambiente e podem se mover entre diferentes ecossistemas e facilitar a disseminação de elementos genéticos móveis que podem conferir resistência a outros organismos (OMS, 2018). A transferência pode ocorrer tanto vertical (na mesma espécie) quanto horizontal (entre espécies diferentes), referindo-se ao genoma bacteriano, plasmídeos, transposons e sequências de inserção.

De acordo com BELTRAME, (2021) a principal problemática relacionada aos genes de resistência associados a bactérias comensais não-patogênicas é o risco da transferência de determinantes de resistência para organismos patogênicos. Dessa forma, a microbiota comensal pode se tornar um reservatório de genes de resistência, podendo estes se propagarem para microrganismos com potencial patogênico e levando pacientes a quadros graves. Assim, podemos encontrar cenários em que o tratamento com antimicrobianos são prejudicados para controle ou cura de infecções comuns.

O trato gastrointestinal, por exemplo, é um ambiente repleto de microrganismos, que favorece compartilhamentos genéticos entre componentes da microbiota residentes e transientes neste espaço (BELTRAME, 2021). A literatura científica já traz relatos de bactérias do gênero *Bifidobacterium*, muito empregado como probiótico devido suas propriedades benéficas, carregando genes de resistência relacionados a tetraciclinas (LIM et al., 2018).

3.3. *Escherichia coli* COMO BIOINDICADORA DE QUALIDADE DA ÁGUA

Os organismos patogênicos e parasitos mais frequentemente encontrados em águas e esgotos sanitários podem ser divididos em quatro principais grupos: bactérias, vírus, protozoários e helmintos (VON SPERLING,

2014). A maioria destes são excretados nas fezes e liberados nos esgotos, onde sem o devido tratamento, podem entrar em contato com os corpos d'água.

Dessa forma, a quantidade e os tipos de microrganismos presentes na água podem ser usados para avaliar a qualidade microbiológica da mesma. Essa qualidade é determinada pela ausência/presença de microrganismos, pela quantidade de inóculo e pelo tempo de controle ou destruição desses agentes patogênicos (FIOCRUZ, 2020). Na figura 4, apresenta-se uma representação esquemática para ilustrar as categorias de bactérias indicadores de contaminação fecal.

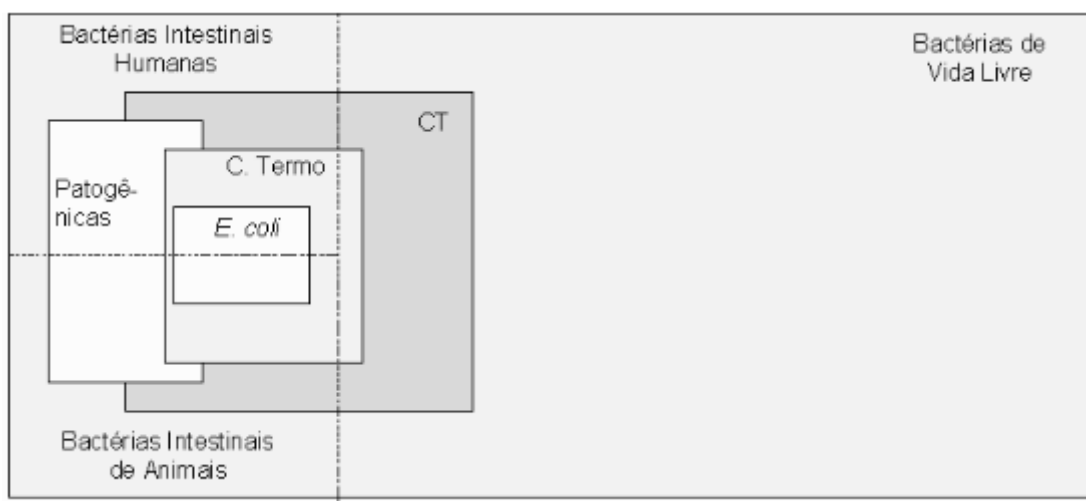


Figura 4: Representação esquemática das bactérias indicadores de contaminação fecal (CT = Coliformes Totais; C. Termo = Coliformes Termotolerantes)

Fonte: Adaptado de Von Sperling (2014).

Os Coliformes totais são uma classe de bactérias que podem ser de vida livre ou não, abrangendo os seguintes gêneros: *Klebsiella*, *Escherichia*, *Enterobacter* e *Citrobacter* (OMS, 1998). Por outro lado, os coliformes fecais ou coliformes termotolerantes são bactérias de um subgrupo de coliformes totais, predominantemente, do trato intestinal humanos e de outros animais homeotérmicos, sendo a *Escherichia coli* (*E. coli*) a principal espécie pertencente a esse grupo, possuindo origem exclusivamente fecal.

A principal bactéria utilizada como indicadora de contaminação fecal é a *E. coli*, sendo detectada em esgoto e águas superficiais sujeita a contaminação

recente por seres humanos, atividades agropecuárias, animais selvagens e pássaros (OMS, 1993).

Pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, a *E. coli* é uma bactéria Gram negativa, mesófila, na forma de bacilo, anaeróbia facultativa, possuidora de cápsula, flagelos e fímbrias. Em meio sólido, as colônias podem ser observadas após 24 horas de incubação a 37°C com aspecto rugoso e/ou mucoide (SANTOS, 2014).

Nas amostras ambientais, os métodos de “Tubos Múltiplos” e “Membrana Filtrante” ainda são largamente utilizados na avaliação de qualidade da água no âmbito de indicação de contaminação fecal. Entretanto a opção pelo método de substrato Cromogênico-Fluorogênico é comumente adotado pela facilidade de manuseio, bem como por ter relativo custo/benefício já comprovado para detecção de coliformes totais e de *E. coli* (BRASIL, 2014; MARQUEZI, 2010).

Segundo a Fundação Nacional da Saúde (2013), o método é baseado nas atividades enzimáticas específicas dos coliformes (β -galactosidade) e *E. coli* (β -glucoronidase). Os meios de cultura contêm substrato cromogênico Ortonitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (ONPG) e o fluorogênico 4-metilumbeliferil- β -D-glucoronídeo (MUG) que, ao serem hidrolisado pelas enzimas específicas dos coliformes e da *E. coli*, transformam em ortonitrofenol (detecção cromogênica) e 4-metilumbeliferona (detecção fluorogênica), respectivamente, como descrito na figura 5.

Os meios de cultura cromogênicos e fluorogênicos são meios de crescimento microbiológicos que contêm substratos enzimáticos ligados a um composto cromogêneo (resulta em uma mudança de cor), fluorogêneo (conduz à emissão de fluorescência) ou a junção de ambos.

Após o período de incubação de 24 horas, caso o meio permaneça incolor, indica a ausência de bactérias do grupo coliforme e de *E. coli* na amostra. Se o meio alterar a cor alterada para amarelo e não apresentar fluorescência sob luz UV, indica presença de bactérias do grupo coliforme e ausência de *E. coli* na amostra. Por fim, caso a cor do meio seja alterada para amarela e apresentar

fluorescência sob luz UV, simultaneamente, significa que bactérias do grupo coliforme e *E. coli* estão presentes na amostra analisada (BRASIL, 2014).

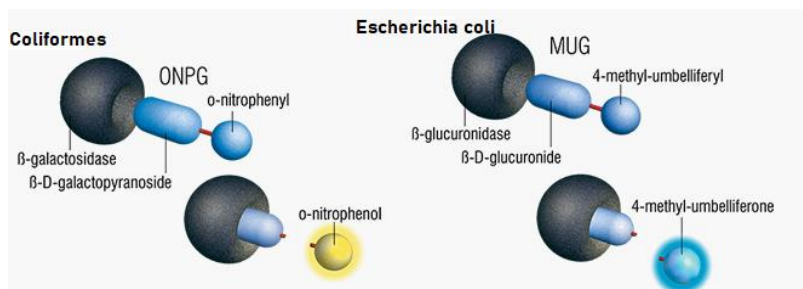


Figura 5: Método de substrato Cromogênico-Fluorogênico para detecção de Coliformes e *Escherichia coli*, simultaneamente (ONPG = Orto-nitrofenil-β-D-galactopiranosídeo; MUG = 4-metilumbeliferil-β-D-glucuronídeo).

Fonte: <https://www.idexx.com.br/pt-br/water/water-products-services/colilert-250/>

A *E. coli*, por ter essa estreita relação com os seres humanos (bioindicadora de contaminação fecal) e devido a facilidade de isolamento em laboratório, é uma das bactérias mais amplamente monitoradas na avaliação da resistência antimicrobiana no meio ambiente (REINTHALER *et al.*, 2003; FIGUEIRA *et al.*, 2011; AKIBA *et al.*, 2015; PAULSHUS *et al.*, 2019), inclusive no Brasil (CHAGAS *et al.*, 2011; REBELLO E REGUA-MANGIA, 2014; GONÇALVES *et al.*, 2019; BARTLEY *et al.*, 2019).

3.4. ANTIMICROBIANOS E MEIO AMBIENTE

A temática dos contaminantes emergentes vem ganhando destaque e em diferentes aspectos pela comunidade científica. Essa tipologia trata-se de centenas de compostos que têm sido detectados nas diferentes matrizes ambientais (solo, água e ar), sendo eles, principalmente, de origem antrópica presentes em efluentes domésticos, industriais, hospitalares e aqueles provenientes das atividades agrícola e pecuária (MONTAGNER *et al.*, 2017).

Além de apresentarem risco ao ecossistema, a maioria dos contaminantes emergentes no Brasil não estão presentes na legislação, portanto, não estão inclusos nos programas de monitoramento de qualidade nas diferentes matrizes ambientais. O monitoramento de antimicrobianos – um dos tipos de contaminantes emergentes - possui grande importância devido ao fato de muitas dessas substâncias serem, frequentemente, encontradas em corpos d'água,

além de gerar impactos sobre a saúde humana e de outros animais. Foi somente no final do século XX, que se iniciaram as investigações sobre as fontes, destino e efeito destes produtos (HALLING- SØRENSEN et al., 1998; HIRSCH et al., 1999).

Os antimicrobianos são persistentes e lipofílicos, podendo bioacumular e serem parcialmente metabolizados pelo organismo e seus metabólitos, lançados no ambiente por meio das excretas, sendo um possível via a causar efeitos à biota e ao homem (MONTAGNER et al, 2017). Os ATB encontrados no meio ambiente são um risco não somente por ser um componente químico, mas também, devido à uma preocupação ainda maior: o fenômeno da resistência entre populações bacterianas.

O surgimento da resistência antimicrobiana no meio ambiente é o resultado de uma interação complexa entre microbiologia, comportamento humano e geografia que muitas vezes é impactada pela pressão seletiva do uso de antimicrobianos na saúde humana e animal (BARTLEY et al, 2019). Visto que a maioria da resistência é codificada por elementos genéticos móveis que permitem a transferência entre diferentes espécies de bactérias, existe um potencial para os genes que codificam a resistência se moverem rapidamente e facilmente no meio ambiente (WOOLHOUSE e WARD, 2013).

Plasmídeos, fagos e elementos transponíveis/transposons são considerados elementos genéticos móveis, ou seja, fragmentos de DNA que podem movimentar-se dentro dos genomas ou mesmo entre genomas diferentes. Elementos genéticos tais como plasmídeos podem amplificar o problema contribuindo para o aumento da multirresistência bacteriana, já que estes elementos genéticos móveis podem ser transferidos para outras bactérias de gêneros e espécies distintos (KUMMERER, 2003).

Os principais mecanismos responsáveis pela alta disseminação de bactérias resistentes a antimicrobianos em vários ambientes são: mutação e recombinação de genes alvo de antimicrobianos; transferência lateral de genes e; a influência de pressões de seleção impostas por agentes antimicrobianos ou

contaminantes de metais pesados (BERENDONK et al., 2015 *apud* YUAN et al., 2020). Há uma preocupação de que a prevalência da resistência esteja altamente correlacionada com o uso indiscriminado de antimicrobianos e de metais pesados em tratamentos clínicos e criação de animais (JIA et al., 2017; WANG et al., 2018).

A resistência aos antimicrobianos é um problema de saúde pública complexo que integra a saúde humana e animal, o setor agrícola e ambiental. Por isso, nenhuma intervenção única é suficiente para combater totalmente o surgimento e a disseminação de organismos infecciosos que se tornam resistentes aos medicamentos antimicrobianos disponíveis, sendo necessário uma abordagem coordenada e multissetorial e de ação imediata global (OMS, 2018). Na figura 6, são abordadas as principais vias de circulação de BRA e GRA no meio ambiente, tendo como principal via de disseminação os esgotos (KARKMAN et al., 2018).

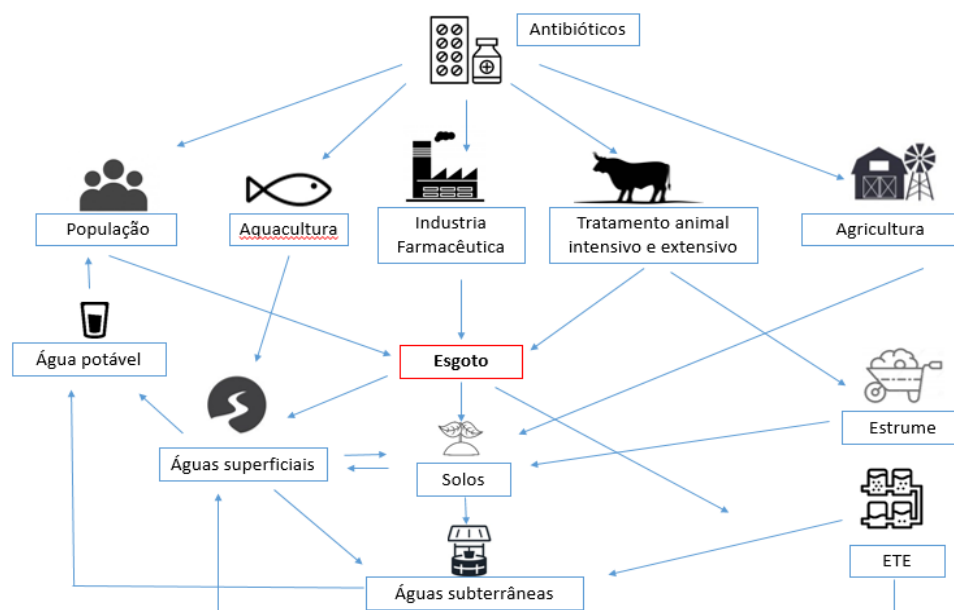


Figura 6: Vias de transmissão para a disseminação de bactérias resistentes a antimicrobianos e genes de resistência no meio ambiente.

Fonte: Adaptado de Pazda et al. (2019)

O fenômeno da resistência está diretamente ligado à capacidade das bactérias em poder fazer, e frequentemente o fazem, mudanças no seu material genético, adquirindo resistência aos ATB. Atualmente, artigos publicados na

comunidade científica relatam que já é possível encontrar ATB em diferentes matrizes ambientais, como: na água potável (SCHWARTZ et al., 2003), águas superficiais (BAI et al., 2019), solo (CHEN et al., 2016), ar (BRAĞOSZEWSKA e BIEDRON, 2018) e nas estações de tratamento de efluentes (NEUDORF et al., 2017).

A água é um dos habitats bacterianos mais relevantes na Terra, além de ser uma das principais formas de disseminação de microrganismos na natureza e tem sido reconhecida como reservatório de resistência a antimicrobianos (BAQUERO et al., 2008, RIZZO et al., 2013). Ainda que haja intensa pesquisa nesta área nos últimos anos, não está claro em quais circunstâncias as bactérias presentes na água são importantes fontes de resistência ou quando atuam como elementos auxiliares que facilitam a disseminação da resistência e ademais, como isso impactaria a saúde humana (VAZ-MOREIRA et al, 2014).

No Brasil, o primeiro estudo que investigou bactérias em esgoto foi realizado na cidade de Rio de Janeiro, em 1984, por Vinhas e Almeida (1984), e pesquisou a diversidade de espécies de *Salmonella* sp. e a sensibilidade aos antimicrobianos com perfil de resistência a ampicilina, cloranfenicol, gentamicina, estreptomicina, tetraciclina, sulfazotrim e ácido nalidíxico.

Estudo conduzido por BÖGER et al. (2021), encontraram cepas de *Escherichia coli*, na cidade de Curitiba, resistentes à amoxicilina, norfloxacin, ciprofloxacina, doxiciclina e sulfametoxazol isoladas de um rio urbano na cidade, inferindo à possibilidade de que tenham vindo de esgotos sanitários e possam estar contribuindo para a disseminação da resistência bacteriana.

Outro estudo brasileiro, realizado no estado de São Paulo, analisou amostras de águas provenientes de abastecimento público e de poços de diferentes cidades, isolando enterobactérias resistentes aos ATB e produtoras de β -lactamase de espectro expandido de águas para consumo humano. Os resultados mostraram que das amostras analisadas, mais de 30% foram resistentes à pelo menos um ATB, demonstrando que as estações de tratamento

de água, de um modo geral, podem não remover todos esses microrganismos associados à resistência (MARTINS *et al.*, 2019).

Ainda que os processos de tratamento ETE's sejam projetados, principalmente, para remoção de matéria orgânica, bactérias resistentes a antimicrobianos foram detectadas em efluentes pouco antes de sua descarga para águas superficiais (MAO *et al.*, 2015; AMARASIRI *et al.*, 2019).

Na Irlanda (SMYTH *et al.*, 2020), mais de 50% dos coliformes fecais isolados de amostras de efluentes coletados após o tratamento terciários de ETE's expressaram fenótipos de resistência a múltiplos antimicrobianos. Segundo o autor, esses resultados fornecem evidências de que esgotos sanitários tratados ainda podem ser fontes de enterobactérias resistentes a antimicrobianos. Por consequência, tornando possível a entrada no meio ambiente desses microrganismos se a remoção não for completa, ou se, principalmente, não forem tratadas (WATKINSON *et al.*, 2007).

3.4.1. Esgotos hospitalares

Nos estabelecimentos de saúde, entre eles os hospitais e centros clínicos, há geração constante de resíduos sólidos, consumo elevado de água e consequentemente o descarte de efluente hospitalar que necessita de tratamento adequado.

As fontes de efluentes líquidos nos estabelecimentos de saúde provêm de diversos setores e atividades, como por exemplo: da lavagem de materiais contaminados, procedimentos clínicos, das instalações sanitárias utilizadas pelos funcionários, visitantes e dos pacientes. Além disso, os hospitais geram também efluentes a partir dos refeitórios, dos serviços de limpeza de superfícies e pisos misturadas com desinfetantes, da lavanderia, dos resíduos de procedimentos do centro cirúrgico, dos ambulatórios e do laboratório de análises clínicas (KÜMMERER, 2001; REINTHALER *et al.*, 2003; EMMANUEL *et al.*, 2005).

A caracterização dos esgotos hospitalares ainda não está bem definida. Porém, há relatos que existem poucas diferenças em relação aos efluentes domésticos e hospitalares com relação à concentração de matéria orgânica, metais e pH (CHAGAS, 2011), como exposto na tabela 3. Algumas características específicas são atribuídas aos esgotos hospitalares, como: presença de maiores concentrações de metais pesados, desinfetantes, medicamentos, hormônios e radioisótopos (KÜMMERER, 2001 e GAUTAM et al., 2007).

Tabela 3: Valores médios obtidos por autores por meio das análises físico-químicas e microbiológicas de efluentes hospitalares e valores médios de esgotos sanitários.

Parâmetros físico-químicos e microbiológicos

Literatura	Tipo de efluente	pH	Temperatura (°C)	Condutividade (µs/cm)	Demanda Bioquímica de Oxigênio ₅ ^{20°C} (mg/L)	Demanda Química de Oxigênio (mg O ₂ /L)	Sólidos Totais (mg/L)	Sólidos Suspensos Totais (mg/L)	Coliformes Totais (cel/100 ml)	<i>Escherichia coli</i> (cel/100 ml)
Khan et al. (2021)	hospitalar	6,8 - 8,6	-	230 -1468	80 - 1530	150 -2664	-	11 -900	-	-
Akin (2016)	hospitalar	8,7	-	-	75	934	-	124	-	-
Varela et al. (2014)	hospitalar	-	-	-	-	622	-	305	-	-
Korzeniewska e Harnisz (2013)	hospitalar	7,6 - 7,8	-	-	225 - 2163	398 - 3332	-	-	-	-
Chagas et al. (2011)	hospitalar	7.5	-	-	100	380	-	-	7,4 x 10 ⁵	-
Von Sperling (2014)	sanitário	6,7 – 8,0	-	-	250 - 400	450 -800	700 - 1350	-	10 ⁶ – 10 ¹⁰	10 ⁶ – 10 ⁹

Os antimicrobianos são usados em toda a sociedade, mas os hospitais são uma importante fonte de disseminação de resistência no ambiente (HOCQUET *et al.*, 2016). Segundo Baquero *et al.* (2008), existem os chamados reservatórios genéticos, que basicamente são locais potenciais para trocas genéticas e, conseqüentemente, para a disseminação da resistência bacteriana aos antimicrobianos devido à alta interação biológica e a presença de seleção específica. Entre estes reservatórios, encontram-se os esgotos hospitalares. A presença de bactérias resistentes no esgoto depende, portanto, da estação de tratamento de esgoto, da população bacteriana estudada, do agente antimicrobiano e da concentração associada (BAQUERO *et al.*, 2008).

No Espírito Santo, Depizzol *et al.* (2006), avaliaram a resistência a antibióticos específicos de isolados de *Escherichia coli* de esgotos sanitário e hospitalar. Notou-se que o número de resistências nas linhagens das amostras do esgoto hospitalar foi significativamente maior quando comparado ao das amostras do esgoto sanitário. Resultado encontrado, também, na revisão por publicada por Hassoun-Kheir *et al.* (2020) em 81% dos trabalhos observados, concluindo que os hospitais possuem um importante como fonte de disseminação de resistência a antimicrobianos no ambiente.

Outro aspecto a se destacar dos efluentes hospitalares são as concentrações de microrganismos patogênicos liberados, principalmente, bactérias. Segundo Gallert *et al.* (2005) os Coliformes, *Pseudomonas sp.*, *Enterococcus sp.* são bactérias comuns nos esgotos domésticos. Além dessas bactérias, em uma pesquisa sobre o perfil microbiológico de bactérias em amostra de esgoto hospitalar no Rio Grande do Sul, Ortolan *et al.* (2000) identificaram diversos gêneros bacterianos: *Acinetobacter sp.*, *Alcaligenes spp.*, *Comamonas sp.*, *Enterobacter sp.*, *Escherichia sp.*, *Enterococcus sp.*, *Flavobacterium spp.*, *Klebsiella sp.*, *Leclercia sp.*, *Morganella sp.*, *Pasteurella sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Proteus sp.*, *Serratia sp.*, *Staphylococcus sp.*, *Stenotrophomonas sp.*, *Streptococcus sp.* e entre outros.

Um estudo que teve como objetivo determinar a presença de *Enterobacteriaceae* produtoras de beta-lactamase em diferentes pontos de uma ETE na Colômbia, relatando que 83% dos isolados corresponderam na produção de beta-lactamase foi em relação a *Escherichia coli*, ressaltando o papel significativo da bactéria na formação de resistência em ecossistemas (Aristizábal-Hoyos et al., 2019).

Dessa forma, devido a interação das bactérias em ambiente hospitalar e o papel considerável da *E. coli* no que tange à resistência bacteriana nos efluentes, inúmeras pesquisas têm se destacado na literatura científica nas amostras de efluentes hospitalares, como exposto na tabela 4.

Tabela 4: Estudos publicados avaliando a resistência aos antimicrobianos em *Escherichia coli* isoladas de efluentes hospitalares utilizando método de Disco de Difusão.

Estudo	País	Fonte da amostra	Classe dos ATB testados
Zagui et al., 2022	Brasil	Caixa de passagem do efluente ambulatorial, enfermaria e ponto de confluência dos efluente de todo o hospital	AMP, CIP, GEN, SUT, TET, AMC, CTX, CLO, IPM, MER, PPT, etc.
Kumar et al., 2020	Sri Lanka	ETE hospitalar no oeste e sul do Sri Lanka e duas ETE's municipais	CIP, TET, SUT, etc.
Girijan et al., 2020	Índia	Saída de efluentes de três hospitais para corpo hídrico	CIP, GEN, CTX, IMP, etc.
Guruge et al., 2021	Sri Lanka	Efluente de três hospitais, um lago e um canal de uma cidade	AMP, CTX, CLO, TET, GEN, SUT, CIP, etc.
Gaspar et al., 2021	Romênia	Efluente hospitalar e esgoto sanitário	CTX, CIP, AMP, MER, ATM, GEN, SUT, etc.
Chukwu et al., 2018	Nigéria	Amostras de solo e efluentes hospitalares	CLO, GEN, CIP, etc.

ATB = Antibióticos; AMP = Ampicilina; CIP = Ciprofloxacina; GEN = Gentamicina; SUT = Sulfametoxazol + Trimetoprima; TET = Tetraciclina; AMC = Amicacina; CTX = Cefotaxima; CLO = Cloranfenicol; IPM = Imipinem; MER = Meropenem; PPT = Piperacilina + Tazobactam;

No estudo de Zagui *et al.* (2022), no interior do estado de São Paulo, foram coletadas amostras do efluente referente às unidades de ambulatório e enfermarias e um ponto da junção de todos os efluentes do hospital. Encontraram elevadas porcentagens de resistência para amoxicilina e ampicilina, sendo o fenótipo multirresistente (MR) atribuído a mais de 60% dos isolados.

O estudo publicado por Chukwu *et al.* (2018), na Nigéria, avaliou os efeitos microbiológicos de efluentes hospitalares tratados em fossa séptica, por meio da coleta de solo em diferentes distâncias do local de tratamento. Dentre os microrganismos isolados, foram identificadas cepas de *E.coli* resistentes à CLO e a GEN. As altas cargas microbianas dos isolados e as altas densidades dos coliformes indicaram que há contaminação do meio ambiente do solo em decorrência do descarte de efluentes hospitalares, o que provavelmente poderia ser perigoso para a saúde humana.

Coletivamente, os estudos analisados demonstram o papel potencial dos efluentes hospitalares como um reservatório ambiental que auxilia no surgimento e disseminação de novas cepas de bactérias que apresentam resistência. Isso é promovido, principalmente, pela coexistência de diversas espécies de bactérias e altos níveis de GRA's nesses ambientes, o que aumenta a probabilidade de transferência de genes em elementos móveis entre espécies. Os esgotos sanitários e efluentes hospitalares não tratados podem conter cargas antimicrobianas, que representam uma importante pressão seletiva para o surgimento e disseminação de BRA (FLANDROY *et al.*, 2018).

O *Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System* (GLASS) foi lançado para fornecer uma abordagem padronizada para a coleta, análise e compartilhamento de dados de resistência a antimicrobianos. Com base nas informações fornecidas por 68 países inscritos no GLASS em 2018, a OMS concluiu que inúmeros países enfrentam grandes desafios na construção de seus sistemas nacionais de vigilância.

Os afluentes das ETE 's urbanas contêm bactérias de milhares de indivíduos da comunidade conectados a um sistema, abrindo possibilidades para gerar dados de resistência a antimicrobianos em nível comunitário sem a necessidade de amostrar indivíduos, sendo um dado valioso para compor o monitoramento de resistência.

Os efluentes têm sido utilizados para a vigilância do poliovírus e, mais recentemente, de surtos virais, monitoramento de salmonelas (HOVI et al., 2012; HELLMÖR et al., 2014; YAN et al., 2018) e a mais recente ao vírus SARs-COV-2 (HERRERA-URIBE et al., 2022). Testes de suscetibilidade a antimicrobianos de bactérias isoladas de efluentes podem fornecer informações sobre a resistência a antimicrobianos na comunidade (REINTHALER et al., 2013; KWAK et al., 2015). Para que o monitoramento de efluentes seja útil para a geração de dados de vigilância, é necessário investigar a relação entre a prevalência de resistência a antimicrobianos em águas residuais e amostras clínicas (HUIJBERS et al., 2020).

Um estudo em Bangladesh mostrou que a proximidade aos hospitais estava associada a níveis elevados de BRA nas águas superficiais, sugerindo que a descarga de ATB dos hospitais tem um efeito na abundância dessas bactérias e declina com a distância (ISLAM et al., 2017). Essa informação é corroborada pelo estudo publicado na China, onde concentrações de tetraciclina e sulfametoxazol nos efluentes estavam correlacionados à GRA's *tetM* e *sul1*, respectivamente (LI et al., 2015).

Os efluentes hospitalares podem estar sujeitos à três diferentes cenários de tratamento: descarregado diretamente no meio ambiente; tratado no local e posteriormente descarregado no meio ambiente ou; tratado no local e posteriormente descarregado para tratamento de águas residuais municipais (PAUWELS e VERSTRAETE, 2006). A última abordagem foi preconizada pela OMS, nas diretrizes publicadas sobre gestão segura de resíduos de estabelecimentos de saúde (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE *et al.*, 2014). Em publicação pelo *Wellcome Trust and the Center for Disease Control* (CDC), o pré-tratamento de esgoto hospitalar foi considerado como a abordagem

preferencial, pois foca a aplicação de tratamento tecnológico de alto custo nas principais fontes de resistência (CENTROS DOS EUA PARA CONTROLE E PREVENÇÃO DE DOENÇAS, 2018). Entretanto, a comunidade científica não chegou a um consenso sobre a melhor forma de tratar os efluentes sanitários domésticos no que tange a redução de BRA's e GRA's, tampouco os efluentes hospitalares. Além disso, a variabilidade nos tratamentos e a endemicidade local de resistência dificultam a possibilidade de tirar conclusões compiladas dos efeitos do tratamento sobre a abundância de resistências (HASSOUN-KHEIR *et al.*, 2020).

3.5. LEGISLAÇÃO AMBIENTAL NACIONAL E INTERNACIONAL

O monitoramento de bactérias resistentes aos antimicrobianos e seus genes associados em esgotos domésticos é uma realidade longínqua no Brasil, uma vez que o país apresenta graves deficiências em relação ao saneamento básico. Realidade essa que brasileiros vivem sem acesso ao abastecimento público de tratamento e disposição adequada de esgoto. Dados recentes do Sistema Nacional de Informação sobre Saneamento – SNIS, mostram que pouco mais da metade da população (50,8%) dos esgotos do país é coletada e tratada, isso infere que os outros 49,2% são direcionados diretamente à natureza (BRASIL, 2020). O lançamento inadequado de efluentes nos corpos hídricos, compromete, diretamente, a qualidade da água para os usos múltiplos da água.

3.5.1. Aspectos regulatórios internacionais

A União Europeia colocou em prática, nas últimas décadas, inúmeras legislações ambientais, tendo por consequência redução de poluição significativas no ar, água e solo (BRANCO, 2021). A Diretiva 60/2000/CE do Parlamento Europeu e do Conselho estabeleceu um quadro de ação comunitária na política da água e foi adotada a Diretiva-Quadro da Água da UE, conhecida como *Water Framework Directive* cujo objetivo é proteger e recuperar a qualidade da água na Europa, como também assegurar a sua utilização sustentável até 2027 (COMISSÃO EUROPEIA, 2000).

A última Decisão de Execução 2020/1161, estabeleceu inúmeras substâncias da lista de vigilância que são selecionadas entre aquelas cuja informação disponível indique que podem representar um risco significativo, a nível da União, para o meio aquático, ou por intermédio deste, mas cujos dados de monitorização sejam insuficientes para se chegar a uma conclusão quanto ao risco real que representam. Foram inclusos alguns fármacos, dentre os quais, os antimicrobianos: Azitromicina, Claritromicina, Eritromicina, Amoxicilina, Ciprofloxacina, Sulfametoxazol e Trimetropim (COMISSÃO EUROPEIA, 2020).

A Europa adotou uma abordagem estratégica relativa aos produtos farmacêuticos no ambiente, priorizou o aspecto da ecotoxicidade, a presença de antimicrobiano no ambiente, e os possíveis efeitos da exposição crônica nos seres humanos. A legislação relativa aos medicamentos constitui o principal recurso para garantir a qualidade, a segurança e a eficácia dos fármacos para utilização nos seres humanos e nos animais, e a proteção do meio ambiente (COMISSÃO EUROPEIA, 2019).

Na UE, o monitoramento baseia-se em programas de vigilância implementados nos Estados-Membros e os dados relevantes são disponibilizados à Comissão (BRANCO et al., 2021). As diretrizes têm como objetivos reduzir o uso inadequado e promover o uso prudente de antimicrobianos e, tem como alvo, todos os atores responsáveis ou que desempenham um papel relevante no uso ou na prescrição de antimicrobianos na Europa (COMISSÃO EUROPEIA, 2019).

Nos Estados Unidos, a Agência de Proteção Ambiental – EPA (*Environmental Protection Agency*) é o órgão responsável para monitorar e garantir a conformidade com a legislação de água limpa, a fim de proteger a saúde humana e o meio ambiente. A Lei da Água Limpa é a principal lei federal que rege a poluição da água.

Segundo BRANCO et al. (2021) A EPA possui um programa de monitoramento dos contaminantes na água destinada ao consumo que ainda não são regulamentados. O monitoramento fornece dados sobre a ocorrência de

contaminantes suspeitos de estarem presentes na água potável, o número de pessoas potencialmente expostas e uma estimativa dos níveis dessa exposição. Esses dados podem apoiar futuras legislações e outras ações para proteger a saúde pública por meio desse programa.

Atualmente, apenas a eritromicina faz parte da lista, mas serve como o primeiro nível de avaliação para os contaminantes de água potável não regulamentados e que necessitam de uma investigação mais aprofundada dos efeitos potenciais sobre a saúde, e os níveis que são encontrados na água potável (BRANCO et al., 2020; EPA, 2018). Esse monitoramento fornece uma base para futuras ações regulatórias para proteger a saúde pública

3.5.2. Aspectos regulatórios nacionais

No Brasil, o Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA) é um órgão consultivo e deliberativo do Sistema Nacional do Meio Ambiente (SISNAMA), foi instituído pela Lei 6.938/81, que dispõe sobre a Política Nacional do Meio Ambiente, regulamentada pelo Decreto 99.274/90. Dessa forma, é o CONAMA o responsável por nortear as legislações brasileiras, cabendo aos Estados e Municípios estabelecer diretrizes que melhor se adequam à realidade do local, não podendo ser mais flexível do que a legislação nacional.

No que tange a temática água, a Resolução CONAMA nº 357/2005 e suas resoluções complementares – dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como as condições e padrões de lançamento de efluentes - estabelecem que além dos padrões estabelecidos para os corpos d'água enquadrados em classes específicas, os efluentes provenientes de serviços de saúde, poderão ser lançados somente após tratamento especial. Além disso, o lançamento em rede coletora de esgotos sanitários conectada à estação de tratamento, será permitido somente atendendo às normas e diretrizes da operadora do sistema de coleta e tratamento de esgoto sanitários. Porém, não há parâmetros estabelecidos para concentrações de antimicrobianos e seus microrganismos associados e

principalmente, não há definição qual o tipo de tratamento dos efluentes dos serviços de saúde deverão ser direcionados.

Nesses serviços de saúde incluem-se todos os serviços relacionados com o atendimento à saúde humana ou animal, inclusive os serviços de assistência domiciliar e de trabalhos de campo, laboratórios, necrotérios, funerárias, serviços de medicina legal, drogarias, farmácias, estabelecimentos de ensino e pesquisa na área de saúde, centros de controle de zoonoses, distribuidores de produtos farmacêuticos e materiais de diagnóstico, serviços de acupuntura, serviços de tatuagem, entre outros.

Uma das maiores preocupações da comunidade científica é com o grupo dos ATB, que é a maior categoria de fármacos utilizados na saúde humana e veterinária e são consumidas em altas quantidades e pelo seu potencial de causar o surgimento de resistência bacteriana com contato com essas águas contaminadas, além do efeito tóxico aos organismos aquáticos (PNUMA, 2017).

Outra legislação importante é a estabelecida pela Portaria de Consolidação do Ministério da Saúde nº 888 de 04 de maio de 2021, que dispõe sobre padrões de potabilidade da água e monitoramento durante o tratamento para assegurar a qualidade da água. Entretanto, destaca-se que não há qualquer menção sobre a avaliação de BRA's e GRA's na água tratada.

No Espírito Santo, o Instituto Estadual de Meio Ambiente do Espírito Santo (IEMA-ES) por meio da Instrução Normativa de nº 15/2016 estabelece critérios técnicos para apresentação de resultados de monitoramento de Efluentes Líquidos Industriais, Efluentes Líquidos Sanitários, dos Corpos de água, do solo e da água subterrânea no âmbito do licenciamento ambiental do IEMA em consonância as Resoluções Conama nº 357/2005 e 430/2011, ou norma que vier a suceder.

Além da Instrução Normativa do IEMA, a Companhia Espírito Santense de Saneamento (CESAN) estabelece que os efluentes provenientes de estabelecimentos serviços de saúde poderão ser lançados diretamente à rede coletora que esteja conectada a estação de tratamento de esgoto, desde que

atenda às exigências e valores estabelecidos Resolução de Nº 6221 de 2020. Porém, novamente, não se faz menção em relação ao monitoramento de BRA's, GRA's e ATB.

Ainda que não se estabeleça monitoramento de BRA e GRA nos corpos hídricos, efluentes e água tratada, é importante destacar que a Resolução nº 357/2005 do CONAMA estabelece que os efluentes não deverão causar ou possuir potencial para causar efeitos tóxicos aos organismos aquáticos no corpo receptor, de acordo com os critérios de toxicidade estabelecidos pelo órgão ambiental competente. Dessa forma, cabe aos geradores de resíduos de serviço de saúde, a responsabilidade sobre o gerenciamento dos mesmos desde a geração até a disposição final, de forma a atender aos requisitos ambientais e de saúde pública (BRASIL, 2005).

4. METODOLOGIA

4.1. COLETA DE AMOSTRAS

As coletas simples de efluentes hospitalares foram realizadas, semanalmente, no período compreendido entre 30 de novembro de 2020 à 25 de janeiro de 2021 em quatro hospitais da rede pública estadual e UFES localizados na região metropolitana da Grande Vitoria (RMGV) conforme descrito na tabela 5 e apresentado na figura 7.

Tabela 5: Descrição dos pontos de coleta em cada hospital.

Hospitais	Coordenada geográfica (latitude/longitude)	Pontos	Descrição do ponto
HUCAM	-20.300445° -40.317941°	HUCAM 1	Rede de esgoto
		HUCAM 2	Rede de esgoto
		HUCAM LAGO	Lago pertencente à unidade
HJSN	-20.200183° -40.227483°	HJSN 1	Entrada da ETE
		HJSN 2	Saída da ETE

CREFES	-20.327766° -40.274135°	-	Rede de esgoto
HEAC	-20.314388° -40.381431°	HEAC 1	Entrada da fossa séptica
		HEAC 2	Antes do gradeamento

HUCAM = Hospital Universitário Cassiano Antônio Moraes; HJSN = Hospital Jayme dos Santos Neves; CREFES = Centro de Reabilitação Física do Espírito Santo; HEAC = Hospital Estadual de Atenção Clínica.

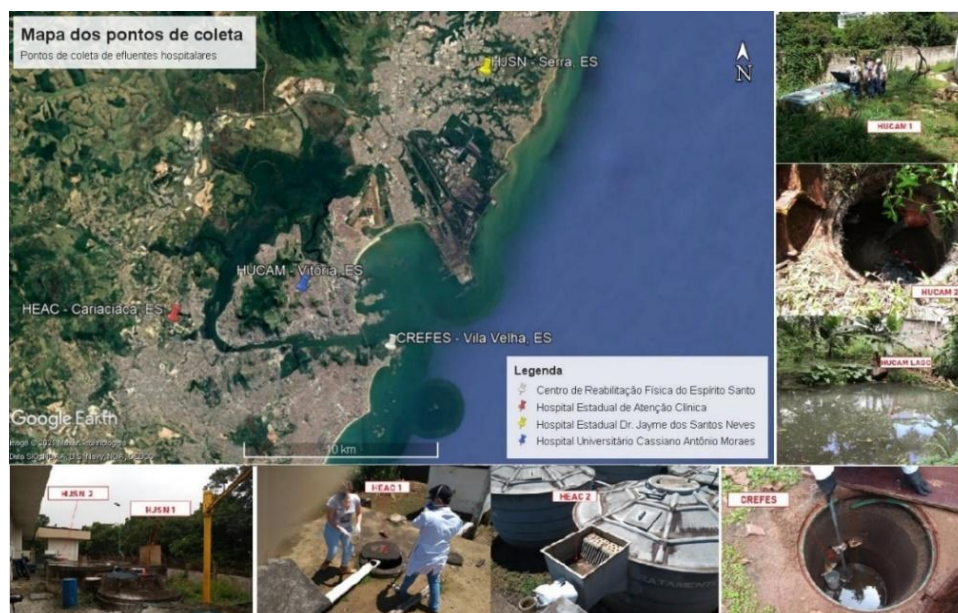


Figura 7: Localização no mapa dos hospitais e os pontos de coleta das amostras de efluentes hospitalares na Região Metropolitana de Vitória – ES.

Fonte: Google Earth.

O Hospital Universitário Cassiano Antônio Moraes (HUCAM) está localizado no município de Vitória – ES, funciona com 277 leitos (UFES, 2020), atendendo, gratuitamente e 24 horas por dia, a pacientes do SUS da capital do Estado do Espírito Santo e também dos municípios vizinhos como, Serra, Vila Velha, Serra, Cariacica, Viana, Fundão e das demais regiões do Estado, bem como de outros estados.

Atualmente, para o tratamento de efluentes, o HUCAM não possui uma estação de tratamento de efluentes (ETE). Portanto, entende-se que, todo o efluente oriundo do sistema hospitalar é dirigido diretamente para a rede da Companhia Espírito-Santense de Saneamento (CESAN – ES) sem tratamento prévio. Portanto, foram selecionados dois pontos na rede coletora interna – que recebe efluente provenientes de diferentes áreas - bem como de um lago pertencente à unidade próximo às residências e ao estacionamento do local, o qual suspeita-se ocorrer contaminação por esgoto hospitalar.

O Hospital Estadual Dr. Jayme Santos Neves (HJSN), é o maior hospital do Espírito Santo com 304 leitos disponíveis e encontra-se no município da Serra-ES (GOVERNO DO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO, 2022). Tal hospital, detém uma área reservada para tratamento de esgotos (sistema fossa-filtro) sendo o efluente final direcionado para à rede da CESAN – ES.

O Hospital Estadual de Atenção Clínica (HEAC) está localizado na cidade de Cariacica – ES, conta com 90 leitos disponíveis (GOVERNO DO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO, 2022) e atualmente, possui instalada uma ETE com dois sistemas, que recebem efluente de diferentes áreas, compostas por: gradeamento seguido de biodigestores e em paralelo outra unidade composta por caixa de areia e sistema fossa-filtro. Após tratamento, o efluente é lançado diretamente no córrego próximo à área hospitalar. Dessa forma, os pontos de coleta foram estabelecidos na entrada de cada unidade.

O Centro de Reabilitação Física do Espírito Santo (CREFES), está localizado na cidade de Vila Velha – ES e conta com 20 leitos de medicina física e reabilitação (GOVERNO DO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO, 2022). Assim como HUCAM, o CREFES não possui nenhuma estrutura de tratamento de efluentes, sendo lançado diretamente para a rede da CESAN-ES. Dessa forma, foi selecionado um ponto de coleta na rede interna.

No período de dezembro de 2020 a janeiro de 2021, foram realizadas sete coletas, semanalmente, nos quatro hospitais. Na tabela 6, apresenta-se de forma resumida, as datas de coleta e o número de amostras coletadas. No HUCAM 1

e HUCAM 2 foi necessário realizar uma coleta a mais no dia 16/12/2020 devido à aparência da amostra ao chegar no laboratório. No HUCAM Lago, houve momentos que a coleta se tornou inviável devido ao acesso ao local. Por fim, no dia 21/12/2020, no HEAC 2, no gradeamento, havia inúmeros sólidos grosseiros o que inviabilizou a coleta da amostra.

Tabela 6: Datas das coletas e número de amostras coletadas no total.

Ponto	Número de amostras	Datas de coleta							
		2020					2021		
		30/11	7/12	14/12	16/12	21/12	4/01	18/01	25/01
HUCAM 1	8	X	X	X	X	X	X	X	X
HUCAM 2	7	X	X	-	X	X	X	X	X
HUCAM LAGO	5	X	-	X	-	X	X	X	-
HJSN 1	7	X	X	X	-	X	X	X	X
HJSN 2	7	X	X	X	-	X	X	X	X
CREFES	7	X	X	X	-	X	X	X	X
HEAC 1	7	X	X	X	-	X	X	X	X
HEAC 2	6	X	X	X	-	-	X	X	X

Fonte: autora.

As coletas das amostras simples foram realizadas pelo turno da manhã, em decorrência da necessidade de processamento das amostras no laboratório, de acordo com as orientações do Guia Nacional de Coleta e Preservação de Amostras (CETESB, 2011) e as especificações da ABNT - NBR 9898/1987, que dispõe sobre a preservação e técnicas de amostragem de efluentes líquidos e corpos receptores. O volume coletado em cada ponto foi de três litros, manualmente com auxílio de um béquer, armazenado em frascos de plásticos

limpos, conservados e transportados para o Laboratório de Caracterização Física, Química e Microbiológica (LACAR) pertencente ao Centro de Pesquisa, Inovação e Desenvolvimento (CPID) do Governo do Espírito Santo em parceria com Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES) e processadas imediatamente para análise.

4.2. CARACTERIZAÇÃO DOS EFLUENTES HOSPITALARES

4.2.1. Análises físico-químicas

Para obter as características físico-químicas dos efluentes hospitalares, todos os métodos analíticos empregados seguiram as análises dos parâmetros descritos por *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2017). Os parâmetros físico-químicos sob avaliação das amostras coletadas estão resumidos na tabela 7.

Tabela 7: Parâmetros analisados de qualidade de efluentes e métodos aplicados.

Variável	Unidade	Método	Referência
Temperatura	°C	Sonda MP	APHA 2550 B, 2017
pH	-	Sonda MP	APHA 4500-H ⁺ B, 2017
Oxigênio Dissolvido	mg/L	Sonda MP	APHA 4500-O H, 2017
Condutividade Elétrica	µS/cm	Sonda MP	APHA 2510 A, 2017
Demanda Química de Oxigênio (DQO)	mg O ₂ /L	Método colorimétrico, fluxo fechado	APHA 5220 D, 2017
Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO ²⁰ ₅)	mg O ₂ /L	Respirométrico	APHA 5210 D, 2017
Série de sólidos	mg/L	Gravimétrico	APHA 2540, 2017

Fonte: autora

4.2.2. Análises microbiológicas

Foi realizada conforme APHA (2017) o método 9223B. Após adição de alíquota da amostra coletada em 100 ml meio MUG, seguindo-se a adição em cartela Quanti-Tray®, selada e incubada a 24 ± 2 horas à temperatura 37,5 °C. Após a incubação das cartelas, os números de poços positivos amarelos (para coliformes) e fluorescentes sob luz ultravioleta (para *E.coli*) são convertidos ao Número Mais Provável (NMP)/100 ml através de uma tabela de conversão disponibilizada pelo fabricante.

4.3. ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE *E. coli* DE EFLUENTES HOSPITALARES

Amostras coletadas de esgoto bruto hospitalar foram processadas para identificação e quantificação de *E.coli* utilizando metodologia descrita por APHA (2017) e modificações propostas por Cassini et al. (2013) baseando-se na presença de reação positiva em cartela de 98 poços para *E. coli*, isolamentos subsequentes em meios A1 e Agar MacConkey. Todas as colonias isoladas em Meio MacConkey foram avaliadas com testes confirmativos (Bactray™) conforme esquematizado no fluxograma apresentado na figura 8.

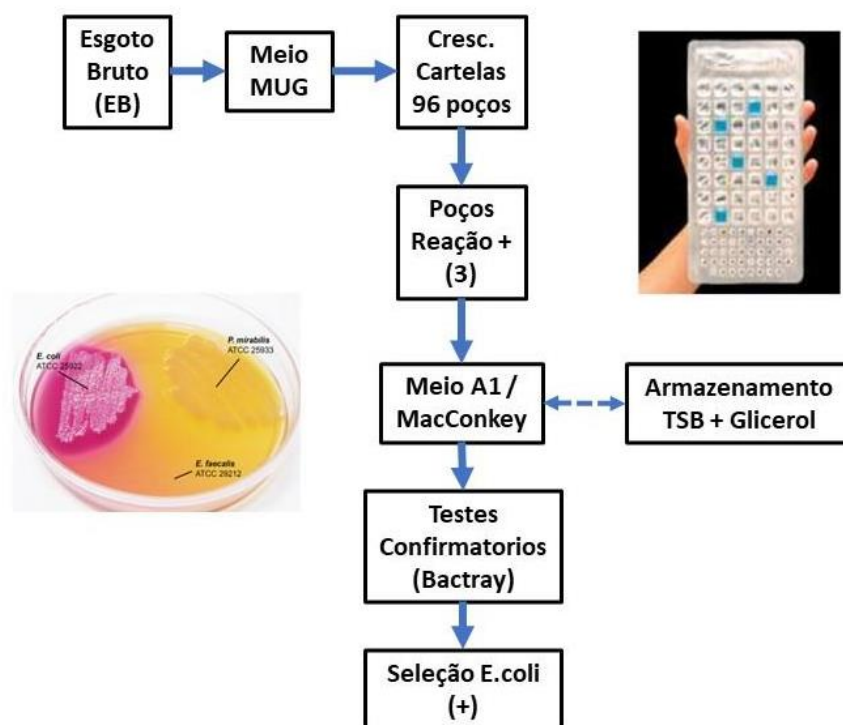


Figura 8: Fluxograma do método utilizado para isolamento de *Escherichia coli*.

Fonte: APHA (2017) e modificações propostas por Cassini et al. (2013)

4.3.1. Isolamento da *Escherichia coli*

A metodologia de isolamento de *E. coli* foi baseada na presença de reação positiva da cartela de 98 poços para quantificação de Coliformes totais e *Escherichia coli* foi realizada segundo Cassini (2013).

A partir dos poços com reação positiva amarela para Coliformes totais e fluorescente para *E. coli* (figura 9 e 10) foram retiradas três alíquotas de diferentes poços, para realizar triplicatas, com seringas e cada uma espalhada em placas com meio A1, específico para enterobactérias, e ágar bacteriológico (figura 11 e 12). As placas foram incubadas a 42 °C durante o período de 24 horas. Após o período de incubação, selecionou-se colônias isoladas e as armazenou em frascos na geladeira com meio A1 e ágar, para posterior armazenamento em microtubos com Caldo Soja Tripticaseína (TSB) e glicerol 20% à temperatura de 2 a 4°C.



Figura 9: Método da cartela com reações positivas para Coliformes Totais.

Fonte: autora.

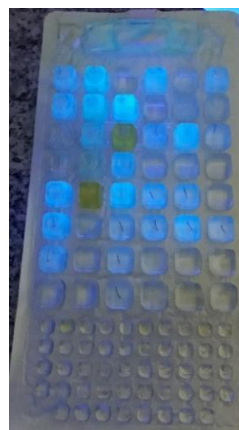


Figura 10: Método da cartela com reações positivas para *Escherichia coli*.

Fonte: autora.

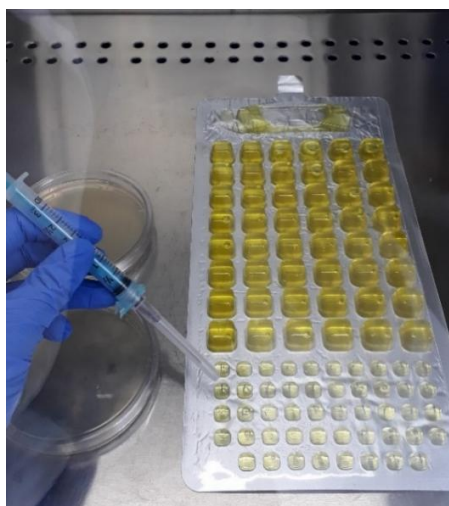


Figura 11: Coleta de amostras positivas para *E. coli*.

Fonte: autora.

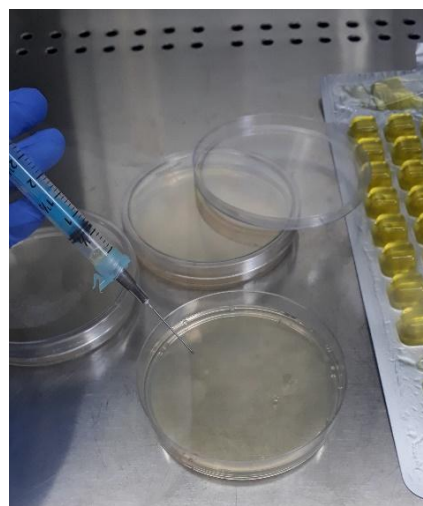


Figura 12: Plaqueamento das amostras positivas em meio A1 e ágar bacteriológico.

Fonte: autora.

4.3.2. Testes bioquímicos confirmatórios de *Escherichia coli*

Para realização de testes confirmativos para *E. coli*, as culturas armazenadas em TSB + glicocol foram, primeiramente, semeadas em meio ágar MacConkey. Após crescimento da bactéria por 24 horas à 44°C, selecionou-se colônias morfologicamente fermentadoras de lactose (meio de coloração rosácea) semelhantes para realizar a suspensão de água destilada e MUG, com intuito de observar a ocorrência de fluorescência. As amostras que positivaram

para fermentação de lactose e fluorescência, seguiram para os testes bioquímicos.

Nessa pesquisa, utilizou-se um sistema comercial, com bases em teste bioquímico, Bactray I e II ® da Laborclin com 10 poços de reação, cujos componentes reativos são: Orto-nitrofenil-galactopiranoside (ONPG), Arginina (ADH), Lisina (LDC), Ornitina (ODC), Uréia (URE), Vogues-Proscauer (VP), L-fenilalanina (PD), Triptona (IND), Citrato de sódio (CIT) no Bactray I e Rhamnose (RHA), Adonitol (ADO), Arabinose (ARA) Salicina (SAL), Inositol (INO), Sorbitol (SOR), Sacarose (SAC), Manitol (MAN), Rafinose (RAF) no Bactray II.

Para a inoculação nos sistemas bioquímicos realizou-se uma suspensão da bactéria a ser identificada (1mL) semelhante a turvação 0,5 da Escala McFarland, sendo adicionado 100µL da suspensão em cada poço, tais quais representam uma reação bioquímica diferente. Após 24 horas de incubação em câmara úmida à 35 °C para avaliação da positividade/negatividade das provas bioquímicas, as colorações foram observadas e comparadas de acordo com gabarito fornecido pelo fabricante. Após essa etapa, os resultados foram compilados em um *software* de identificação bacteriano disponibilizado pelo fabricante. Para o controle de qualidade da identificação bacteriana, foi utilizado o padrão *Escherichia coli* ATCC 25922.

4.4. AVALIAÇÃO DO PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE BACTERIANA

As análises de resistência aos antimicrobianos foram realizadas empregando o teste de suscetibilidade aos antimicrobianos por difusão de discos de acordo com BrCAST (*Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*, 2021) e escolhidos com base na Lista da Organização Mundial da Saúde de Antimicrobianos Criticamente Importantes para Medicina Humana (OMS, 2019).

O método por difusão de antimicrobiano é realizado a partir de discos contendo diferentes concentrações padronizadas pelo BrCAST (2021) em meio ágar *Mueller-Hinton*. Ao todo, foram testados 13 antimicrobianos, selecionados em função da sua utilização na rotina dos hospitais (Tabela 8).

Tabela 8: Antimicrobianos utilizados no presente estudo e suas respectivas concentrações para o método de difusão de disco.

Antibacterianos	Tipo	Siglas	Concentrações (µg)
Ampicilina	Penicilina	AMP	10
Amoxicilina – Ácido clavulânico	Penicilina	AMC	20-10
Piperacilina – Tazobactam	Penicilina	PPT	30-6
Cefalexina	Cefalosporinas	CFE	30
Cefotaxima	Cefalosporinas	CTX	5
Meropenem	Carbapenêmicos	MER	10
Imipenem	Carbapenêmicos	IPM	10
Aztreonam	Monobactâmicos	ATM	30
Ciprofloxacina	Fluoroquinolonas	CIP	5
Gentamicina	Aminoglicosídeos	GEN	10
Tetraciclina	Tetraciclinas	TET	30
Cloranfenicol	Clorafenicóis	CLO	30
Sulfametoxazol – Trimetropima	Sulfonamidas	SUT	23,5-1,25

Fonte: autora.

Para a realização dos testes de susceptibilidade antimicrobiana, as culturas de *E. coli* foram inoculadas em placas com meio ágar nutriente e incubadas a 37°C por 24 horas. Em seguida, as culturas foram diluídas a uma concentração correspondente a 0,5 na escala de McFarland correspondendo, aproximadamente, 5×10^5 Unidades Formadoras de Colônia por ml (UFC/ml) em solução salina à 0,9%. Para realizar o inóculo da solução em placa 150x20mm com meio Ágar *Muller- Hinton*, utilizou-se um *swab* estéril para espalhamento em três direções da placa, seguindo as recomendações do BrCAST (2021). Após 18±2h horas de incubação a 35±1°C, observou-se a presença ou ausência de halos nas placas. Os halos de inibição foram interpretados de acordo com os pontos de cortes da tabela padrão (Tabela 9), medidos com auxílio de uma régua (considerável área sem crescimento detectável a olho nu). Como controle do teste utilizou-se a amostra de *E. coli* ATCC 25922.

Tabela 9: Interpretação dos halos de inibição dos antimicrobianos utilizados.

Antibacterianos	Zona de inibição em mm
-----------------	------------------------

	Sensível ≥	Sensível, aumentando exposição	Resistent e <
Ampicilina	14	-	14
Amoxicilina – Ácido clavulânico	19	-	19
Piperacilina – Tazobactam	20	-	20
Cafalexina	14	-	14
Cefotaxima (infecções não meníngeas)	20	17-19	17
Cefotaxima	20	-	20
Meropenem (infecções não meníngeas)	22	16-21	16
Meropenem	22	-	22
Imipenem	22	19-21	19
Aztreonam	26	21-25	21
Ciprofloxacina	25	22-24	22
Gentamicina	17	-	17
Tetraciclina*	19	-	19
Cloranfenicol	17	-	17
Sulfametoxazol - Trimetropima	14	11-13	11

*Baseado no BRCAST (2020).

Fonte: BRCAST (2021).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E MICROBIOLÓGICA DOS EFLUENTES HOSPITALARES

As médias dos resultados e os desvios padrões (s) associados à cada parâmetro obtido por meio das análises físico-químicas e microbiológicos dos efluentes hospitalares coletados estão apresentados na tabela 1.

Tabela 10: Média e desvio-padrão dos resultados obtidos das análises físico-químicas e microbiológica dos efluentes hospitalares

Pontos	Parâmetros físico-químicos e microbiológicos									
	pH	Temp (°C)	Cond (µs/cm)	OD (mg O ₂ /L)	DBO ₅ ^{20°C} (mg/L)	DQO (mg O ₂ /L)	ST (mg/L)	SST (mg/L)	CT (cel/100 ml)	E.coli (cel/100 ml)
HUCAM 1	7,3	27,7	2327	1,13	396	965	1263	181	7,86E+06	1,37E+06
s	0,4	0,7	307,6	0,8	137,0	244,3	296,0	123,5	210,8	55,4
HUCAM 2	7,4	28,0	2174	1,27	367	989	1253	180	1,16E+07	4,39E+06
s	0,4	0,6	263,5	0,8	172,7	280,7	269,7	57,9	7,60E+06	8,61E+06
HUCAM LAGO	7,3	26,3	559	0,87	47	28	360	11	9,27E+04	1,49E+05
s	0,2	0,4	43,4	0,6	17,0	65,7	59,0	8,5	4,10E+06	1,28E+06
HJSN 1	7,1	28,4	1026	0,96	429	1036	753	192	7,85E+06	7,60E+05
s	0,3	0,6	98,6	0,7	120,2	119,4	144,3	63,1	9,40E+06	2,67E+06
HJSN 2	6,7	27,8	1306	2,61	433	999	658	143	2,91E+06	4,43E+05
s	0,2	0,4	575,8	0,9	112,8	364,1	92,9	53,7	9,57E+06	4,82E+06
CREFES	7,9	27,3	1016	1,16	298	880	598	235	4,38E+06	1,56E+06
s	0,5	0,9	429,5	0,8	237,4	606,4	354	213	8,83E+06	9,06E+06
HEAC F	7,2	27,9	906	0,56	210	622	462	124	8,14E+06	1,66E+06
s	0,3	1,8	399,6	0,6	77,0	553,9	140,3	45,2	8,66E+06	5,13E+06
HEAC G	8,2	29,5	1080	0,60	199	901	577	257	6,39E+06	2,97E+06
s	0,4	1,2	332,2	0,8	120,8	740,6	303,1	253,9	8,97E+06	9,76E+06

Temp. = Temperatura; Cond. = Condutividade; OD = Oxigênio Dissolvido; DBO = Demanda Bioquímica de Oxigênio; DQO = Demanda Química de Oxigênio; ST = Sólidos Totais; SST = Sólidos Suspensos Totais; SSV = Sólidos Suspensos Voláteis; CT = Coliformes Totais; E.coli = *Escherichia coli*; s = desvio-padrão amostral.

Em relação ao HUCAM, o pH está dentro das faixas encontradas em literatura. Entretanto, a condutividade dos pontos HUCAM 1 e HUCAM 2 estão acima dos valores obtidos por Khan et al. (2021), refletindo, principalmente, que os efluentes possuem mais íons dissolvidos, possivelmente associado ao uso de medicamentos e soros em ambiente hospitalar (AKIN, 2016) e também a influência da salinidade devido a Região da Grande Vitória estar cercada de mares.

Foi relatado que as águas residuárias hospitalares tinham características geralmente semelhantes aos esgotos domésticos quanto às concentrações de DBO e DQO (AKIN, 2016). A faixa do esgoto sanitário segundo Von Sperling (2014) é de 450-800 mg/L para DQO e 250-400 mg/L para DBO. Este estudo observou que os valores médios de DQO estão acima das faixas médias dos esgotos sanitários para os pontos HUCAM 1 e HUCAM 2 (965 mg/L e 989 mg/L, respectivamente) e abaixo (28 mg/L) no HUCAM LAGO. A matéria orgânica representada DBO nos pontos HUCAM 1 e 2 está próxima aos valores obtidos em literatura, exceto nos estudos publicados por Akin (2016) e Chagas et al. (2011).

Em relação à análise microbiológica do efluente, os valores de Coliformes Totais foram da ordem de 10^7 NMP/100 ml para HUCAM 1 e HUCAM 2 e de 10^6 NMP/100 ml para o lago. Destaca-se as concentrações de E.coli, principalmente para o ponto HUCAM LAGO, pois é onde suspeita-se da contaminação de algum tipo de esgoto - hospitalar ou sanitário - pois próximo ao local há área residencial.

No Hospital Jayme dos Santos Neves, nos pontos de entrada (HJSN 1) e (HJSN 2) destaca-se as concentrações para DBO, uma vez que, em média, as concentrações na saída são maiores do que na entrada, indo de encontro ao que é estabelecido pelo CONAMA n° 357/2011 que prevê a condição de lançamento de efluentes apenas com remoção mínima de 60% na ETE.

O CREFES, se configurou como ponto que apresentou características físico-químicas mais próximas ao esgoto doméstico, uma vez que esta instituição

de saúde possui baixa rotatividade e é utilizada pelo governo local como instituição de tratamento e recuperação de problemas de saúde relacionados à mobilidade. Destaca-se, também, que durante as coletas, observou-se menor vazão e menor diluição.

Ainda que sejam parâmetros que possam oscilar durante o dia, devido ao aporte de compostos que são detectados nos testes de DQO e matéria orgânica na DBO, os parâmetros obtidos no CREFES e no HEAC, de modo geral, estão dentro dos encontrados em literatura, exceto para DBO e DQO ao ser comparado com os obtidos por Chagas et al. (2011).

5.2. ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE *E. COLI*

No plaqueamento das alíquotas retiradas da cartela Quanti-Tray® foram realizadas triplicatas para cada amostra coletada. Inicialmente, foi realizado o teste do MUG com intuito de pré-seleção das amostras, para depois seguir para o teste bioquímico Bactray®. Na tabela 11 são expostos as porcentagens após o resultado dos testes bioquímicos.

Tabela 11: Resultado das amostras após testes bioquímicos.

Resultado da detecção dos testes	Porcentagem do total de amostras (n = 97)
<i>Citrobacter farmeri</i>	2%
<i>Escherichia hermanii</i>	1%
<i>Escherichia coli</i>	71%
<i>Hafnia alvei</i>	1%
Inconclusivo	24%
<i>Klesbsiella oxytoca</i>	1%

Fonte: autora.

Após os testes confirmatórios para *Escherichia coli* em meio MacConkey e bioquímicos no Bactray, de 97 amostras testadas, 32 deram negativos para esse teste e logo foram descartadas. Do total, 69 amostras (71%) deram resultado positivos para E.coli seguiram para os testes de antibiograma.

O sistema Bactray® estabelece porcentagens aceitáveis de identificação, considerando aceitável para conclusão porcentagens maiores ou iguais à 80%. Dessa forma, foram consideradas amostras positivas para *E.coli* apenas resultados que após o teste bioquímico se encaixam nessa orientação dada pelo fabricante. Os testes, como exposto na tabela 11, tiveram como resultado: positivo para *Escherichia coli* (69 amostras); *Klesbsiella oxytoca* (1 amostra); *Hafnia alvei* (1 amostra); *Escherichia hermanii* (1 amostra); *Citrobacter farmeri* (2 amostras) e; amostras inconclusivas com porcentagens variáveis de identificação menores que 80% (23 amostras).

Como o grupo coliformes totais abrange diferentes microrganismos, dentre os quais se destacam os gêneros *Escherichia*, juntamente com os gêneros *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella* (MOURA et al., 2017), não há indicativos de que o MUG seja um meio de cultura seletivo, uma vez que os nutrientes utilizados somente indicam que há a presença ou ausência de coliformes e/ou *Escherichia coli* podendo se associar a técnica do “Número Mais Provável” para quantificação.

Dessa forma, ao semear alíquotas dos poços positivos para Coliformes totais e *Escherichia coli*, há a possibilidade de cultivar outros tipos de bactérias, ou seja, falso-positivo. Porém, por ser um método de fácil manipulação, baixo custo e de resposta relativamente rápida (CASSINI et al., 2013) torna-se viável seu uso, sendo necessária a confirmação por testes bioquímicos como exposto nesta pesquisa.

A figuras 13 expõem as porcentagens das cepas de *Escherichia coli* confirmada em relação à cada hospital, respectivamente.

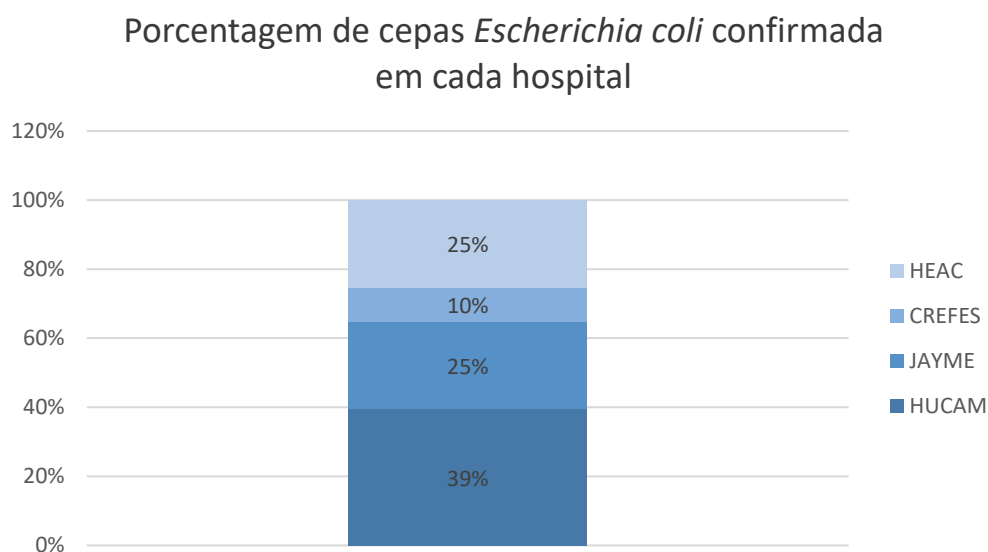


Figura 13: Porcentagem de amostras confirmadas para *Escherichia coli* em relação ao total (71 amostras) por hospital.

Fonte: autora.

De acordo com os resultados obtidos, pode-se perceber que de todas as amostras confirmadas para *E.coli*, 10% corresponde às do CREFES, podendo estar alinhado ao fato de que no referido local há baixa população atendida e no momento da coleta as vazões eram consideravelmente baixas, apresentando maior tempo de retenção na rede, levando à perda de diversidade microbiológica.

5.3. PERFIL DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS DOS ISOLADOS DE *Escherichia coli*.

Nas tabelas 12, 13, 14 e 15, estão apresentados os resultados das resistências aos antimicrobianos das cepas de *Escherichia coli* em cada ponto de coleta analisados de acordo com BrCAST (2021), seguida pela figura 14 que expõe os níveis de resistência e multirresistência encontrados por hospital definidos de acordo com Zagui et al. (2020).

Tabela 12: Classificação das resistências obtidas dos testes de Disco de Difusão em Ágar das amostras de efluentes coletadas do CREFES.

Antimicrobianos	Resistentes		Sensível, aumentando exposição	
	n	%	n	%
AMP	1	14%	0	0%
AMC	0	0%	0	0%
PPT	0	0%	0	0%
CFE	0	0%	0	0%
CTX	0	0%	0	0%
MER	0	0%	0	0%
IPM	0	0%	0	0%
ATM	0	0%	0	0%
CIP	0	0%	0	0%
GEN	0	0%	0	0%
TET	0	0%	0	0%
CLO	0	0%	0	0%
SUT	0	0%	0	0%

n = número de amostras bacterianas. AMP = ampicilinas; AMC = Amoxicilina - ácido clavulânico; PPT = Piperacilina-tazobactam; CFE = Cefalexina; CTX = Cefotaxima; MER = Meropenem; IPM = Imipinem; ATM = Aztreonam; CIP = Ciprofloxacina; GEN = Gentamicina; TET = Tetraciclina; CLO = Cloranfenicol; SUT = Sulfametoxazol-trimetoprima.

Tabela 13: Classificação das resistências obtidas dos testes de Disco de Difusão em Ágar das amostras de efluentes coletadas do HUCAM.

Antimicrobianos	Resistentes						Sensível, aumentando exposição					
	HUCAM 1		HUCAM 2		HUCAM LAGO		HUCAM 1		HUCAM 2		HUCAM LAGO	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
AMP	6	55%	3	38%	3	43%	0	0%	0	0%	0	0%
AMC	1	9%	4	50%	1	14%	0	0%	0	0%	0	0%
PPT	1	9%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%
CFE	0	0%	0	0%	1	14%	0	0%	0	0%	0	0%
CTX	0	0%	0	0%	1	14%	0	0%	0	0%	0	0%
MER	0	0%	0	0%	0	0%	1	9%	0	0%	0	0%
IPM	1	9%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%
ATM	0	0%	0	0%	1	14%	0	0%	0	0%	2	29%
CIP	6	55%	0	0%	2	29%	0	0%	0	0%	1	14%
GEN	1	9%	1	13%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%
TET	5	45%	3	38%	1	14%	0	0%	0	0%	0	0%
CLO	3	27%	1	13%	1	14%	0	0%	0	0%	0	0%
SUT	5	45%	2	25%	2	29%	1	9%	0	0%	0	0%

n = número de amostras bacterianas. AMP = ampicilinas; AMC = Amoxicilina - ácido clavulânico; PPT = Piperacilina-tazobactam; CFE = Cefalexina; CTX = Cefotaxima; MER = Meropenem; IPM = Imipinem; ATM = Aztreonam; CIP = Ciprofloxacina; GEN = Gentamicina; TET = Tetraciclina; CLO = Cloranfenicol; SUT = Sulfametoxazol-trimetoprima.

Tabela 14: Classificação das resistências obtidas dos testes de Disco de Difusão em Ágar das amostras de efluentes coletadas do HJSN.

Antibióticos	Resistentes				Sensível, aumentando exposição			
	HJSN 1		HJSN 2		HJSN 1		HJSN 2	
	n	%	n	%	n	%	n	%
AMP	3	33%	4	44%	0	0%	0	0%
AMC	2	22%	3	33%	0	0%	0	0%
PPT	0	0%	1	11%	0	0%	0	0%
CFE	2	22%	1	11%	0	0%	0	0%
CTX	2	22%	1	11%	0	0%	0	0%
MER	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%
IPM	0	0%	0	0%	0	0%	1	11%
ATM	1	11%	1	11%	0	0%	1	11%
CIP	0	0%	1	11%	0	0%	0	0%
GEN	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%
TET	3	33%	4	44%	0	0%	0	0%
CLO	0	0%	2	22%	0	0%	0	0%
SUT	1	11%	2	22%	1	11%	0	0%

n = número de amostras bacterianas. AMP = ampicilinas; AMC = Amoxicilina - ácido clavulânico; PPT = Piperacilina-tazobactam; CFE = Cefalexina; CTX = Cefotaxima; MER = Meropenem; IPM = Imipinem; ATM = Aztreonam; CIP = Ciprofloxacina; GEN = Gentamicina; TET = Tetraciclina; CLO = Cloranfenicol; SUT = Sulfametoxazol-trimetoprima.

Tabela 15: Classificação das resistências obtidas dos testes de Disco de Difusão em Ágar das amostras de efluentes coletadas do HEAC.

Antibióticos	Resistentes				Sensível, aumentando exposição			
	HEAC 1		HEAC 2		HEAC 1		HEAC 2	
	n	%	n	%	n	%	n	%
AMP	1	13%	3	30%	0	0%	0	0%
AMC	0	0%	2	20%	0	0%	0	0%
PPT	0	0%	1	10%	0	0%	0	0%
CFE	0	0%	2	20%	0	0%	0	0%
CTX	0	0%	2	20%	0	0%	0	0%
MER	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%
IPM	0	0%	0	0%	1	13%	0	0%
ATM	0	0%	0	0%	1	13%	2	20%
CIP	2	25%	3	30%	1	13%	4	40%
GEN	1	13%	0	0%	0	0%	0	0%
TET	1	13%	6	60%	0	0%	0	0%
CLO	1	13%	0	0%	0	0%	0	0%
SUT	1	13%	6	60%	0	0%	1	10%

n = número de amostras bacterianas. AMP = ampicilinas; AMC = Amoxicilina - ácido clavulânico; PPT = Piperacilina-tazobactam; CFE = Cefalexina; CTX = Cefotaxima; MER = Meropenem; IPM = Imipinem; ATM = Aztreonam; CIP = Ciprofloxacina; GEN = Gentamicina; TET = Tetraciclina; CLO = Cloranfenicol; SUT = Sulfametoxazol-trimetoprima.

De acordo com as tabelas anteriormente apresentadas, pode-se notar que a maioria das resistências encontradas nas amostras foram relacionadas com a ampicilina e tetraciclina, seguido por: ciprofloxacina; amoxicilina – ácido clavulânico; sulfametoxazol – trimetropima; cloranfenicol; cefalexina e cefotaxima; piperacilina – tazobactam, aztreonam e gentamicina. Não foi encontrada resistência à meropenem em nenhum dos isolados, apenas uma amostra caracterizada como resistente aumentando à exposição do ponto HUCAM 1.

No ponto denominado como HUCAM 1 (Tabela 13) foram encontradas cepas de *Escherichia coli* resistentes à ampicilina (AMP), ciprofloxacina (CIP) e sulfametoxazol – trimetropima (SUT). Diferentemente do HUCAM 2, cujas maiores porcentagens de resistência estavam atreladas, além da ampicilina, à amicacina e à tetraciclina. Por fim, o HUCAM LAGOA apresentou resistência também a AMP e a SUT, mas também a CIP.

No Hospital Jayme dos Santos Neves, na entrada (HJSN 1) e saída da ETE (HJSN 2), ambos resultados apresentados na Tabela 14, foram obtidos perfis de resistência diferentes na entrada e saída. No HJSN 1 e HJSN 2 as maiores porcentagens de resistência foram, do maior para o menor, a AMP, TET, AMC. Além dessas foram observadas resistência a CFE e CTX no HJSN 1, e TET e CLO no HJSN 2. Cepas de resistência à CIP foram mais frequentes na saída da ETE, enquanto à SUT e TET, foram menores e igualmente, respectivamente.

No CREFES (Tabela 12) observou-se, apenas, uma única cepa de *E.coli* resistente a AMP. Esse resultado é explicado pela baixa rotatividade no local e consequentemente, baixa vazão e variabilidade de perfis de resistência a serem obtidos da coleta.

No HEAC, os perfis de resistência foram diferentes nos pontos HEAC 1 e HEAC 2, sendo esse último uma maior variabilidade de tipos de antimicrobianos, podendo ser observado na Tabela 15. Isso deve ao fato de que cada estação de

tratamento de esgoto trata uma área diferente do hospital, interferindo assim, no perfil de susceptibilidade na entrada de cada estação.

Segundo os mesmos autores descritos anteriormente, a AMP e CIP estão entre os ATB mais prescritos no atendimento ambulatorial no mundo. Em contraste com MER, GEN e CTX que são reservadas para tratamento hospitalar de infecções graves, que felizmente, no presente estudo, apresentaram baixas porcentagens de ocorrência de resistência.

Gaspar et al. (2021), na Romênia, isolaram cepas de E. coli resistentes de efluentes hospitalares, testando um painel de dez antimicrobianos (de nove classes diferentes), como por exemplo: à AMP (70,2%), SUT (55,3%), ATM (51,06%), CIP (31,9%), CTX (34,0%), GEN (12,8%) e MER (4,3%). Perfil esse, diferente do que encontrado no presente estudo. Entretanto, em comparação, a ampicilina ocupou o primeiro lugar em ambos estudos ainda que em porcentagens diferentes, atribuindo, principalmente, ao fato de estar entre os medicamentos mais utilizados para o tratamento de infecções respiratórias, abdominais, tecidos moles e do trato urinário.

A maioria das resistências encontradas está na prioridade alta da lista da OMS e de acordo com o mesmo, esses antimicrobianos (altos e prioritários) devem ser incluídos no programa de monitoramento de resistência a antimicrobianos (OMS, 2019). Segundo os mesmos, esses medicamentos devem ser usados com cautela, pois a perda de sua eficácia pelo surgimento de resistência resultaria na falta de opções terapêuticas e por consequência risco de vida em humanos e animais.

As cepas de E.coli testadas com os antimicrobianos β -lactâmicos como as penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e monobactâmicos apresentaram perfis de resistência diferentes entre si. No mundo todo, os ATB pertencentes à essas classes são os mais utilizados pela medicina humana, que conduz inevitavelmente a um aumento da população de BRA's e um aumento da quantidade de ATB presentes nos efluentes que podem causar resistências em populações bacterianas suscetíveis (GASPART et al., 2021).

Dos isolados, 18% delas foram resistentes as cefalosporinas cefalexina e cefotaxima, sendo observadas na entrada e saída da ETE do HJSN, na lagoa do HUCAM e em um dos pontos do HEAC. Destaca-se que observada a resistência à CTX, ocorria, simultaneamente, a resistência a CFE.

A maioria das amostras foram sensíveis aos carbapenêmicos IPM e MER testados (99% e 96% amostras sensíveis, respectivamente). O único local em que encontrou-se cepas de *E. coli* resistentes à essa classe foi no ponto 1 do HUCAM, sendo as outras amostras apenas consideradas sensíveis aumentando a exposição. O mesmo ocorreu em um estudo publicado por Abreu et al. (2010) com efluentes hospitalares em Maringá no Brasil.

A baixa taxa do meropenem pode ser devido ao fato de estar incluído no grupo “*Watch*”: continua sendo um ATB reservado para pacientes hospitalares, é administrado via parenteral e não é usado em nenhuma situação como primeira opção terapêutica (GASPART et al., 2021).

Embora as sulfonamidas e suas combinações tenham sido cada vez menos utilizadas nos últimos anos na medicina humana, encontramos, no presente estudo, uma frequência considerável de 16% resistentes a sulfametoxazol-trimetoprima.

Na figura 14, é exposto a multirresistência aos antimicrobianos obtido por meio dos dados de perfis de resistência das amostras de cada hospital.

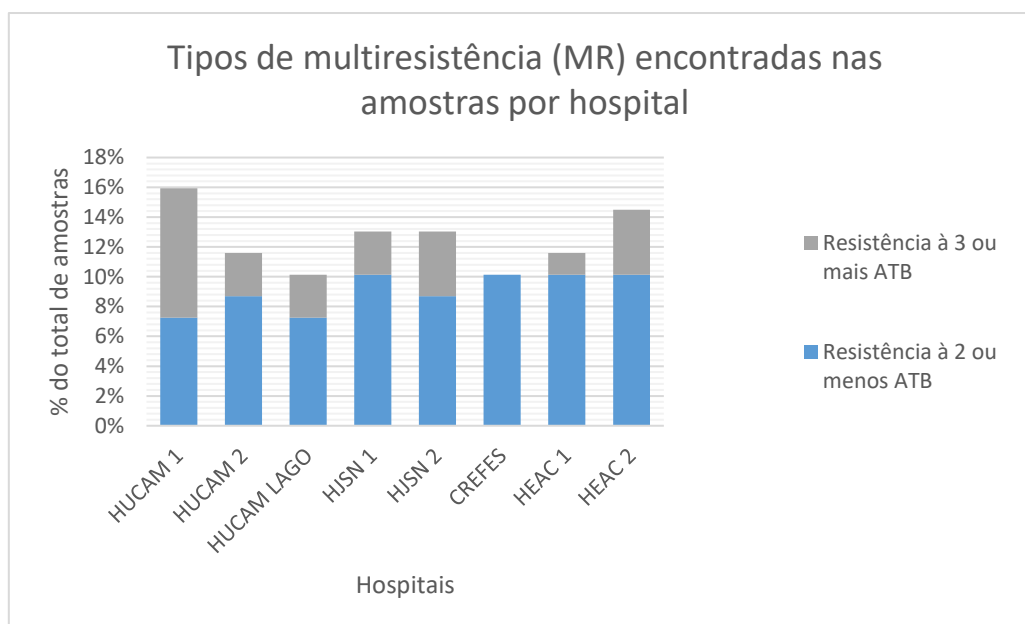


Figura 14: Resistência e multiresistência aos antimicrobianos testados em *Escherichia coli* por ponto de coleta para cada hospital.

Fonte: autora.

De acordo com a figura 14, mais da metade dos isolados (53,6%) apresentaram resistência à pelo menos um antibiótico. Em estudo publicado por Zagui et al. (2020) em Ribeirão Preto – SP também foram encontradas cepas de *Escherichia coli* (multi-resistência) MR em efluentes de ambulatório e de enfermarias, associadas à AMP, AMC, AMO, CTX, IPM, MER, SXT e TET. Esse amplo perfil de resistência à antimicrobianos em isolados do HUCAM, JAYME e HEAC, é justificado pela administração dos mesmos em pacientes internados, seja para tratamento de infecções ou medida profilática: HUCAM e JAYME por atenderem diversas especialidades e o HEAC, ainda que foque em tratamento psiquiátricos, muitos pacientes permanecem no local por tempo indeterminado.

Por outro lado, a multiresistência não foi observada nas amostras do CREFES, podendo estar associada ao local em si, que não é alvo de internações, apenas para medicina física e reabilitação para pessoas com deficiência motora, sensória motora e auditiva.

Cepas de *E.coli* com MR igual à 7 foram observadas em amostras do HEAC, HUCAM Lago e na saída da ETE do HJSN, apresentando perfil de

resistência próximo: AMP, AMC, CFE, CTX, CIP, TET e SUT. O mesmo ocorreu para MR à 6 antimicrobianos (AMP, AMC ou PPT, CIP, TET, CLO e SUT).

Kumar et al. (2021), avaliou o perfil de susceptibilidade de E.coli isoladas de uma ETE hospitalar e duas de esgotos sanitários municipais. Obteve que em comparação com as ETE's municipais, a ETE hospitalar apresenta uma maior proporção de multirresistência o que pode ser devido à maior concentração de produtos farmacêuticos no efluente.

Ainda sobre o estudo descrito anteriormente, para todas as amostras de ETE, pelo menos 20% das cepas apresentaram resistência a todos os seis antimicrobianos testados. Diferentemente dos resultados obtidos nesse estudo, pois a maioria das cepas foram resistentes à 2 ou menos antimicrobianos, como exposto na figura 15.

Além dos casos não contabilizados de bactérias resistentes nos hospitais infere-se que a exposição de bactérias a produtos como antimicrobianos, metais pesados e desinfetantes podem contribuir para a seleção de bactérias resistentes (MANAIA, 2017). Ou seja, a ocorrência de BRA's em pacientes não é o único fator para a detecção das mesmas nos efluentes.

Outro fator importante a ser considerado é a sazonalidade da população atendida, no que tange ao período de intensa circulação de população flutuante ou turistas. Kolokotsa et al. (2020) relatam resultados em que o tratamento de efluentes não modificou o perfil de resistência dos isolados na Grécia e observaram mudanças no perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos diminuindo para alguns e aumentando para outras classes no período de turismo. Hospital como HUCAM, que recebe pacientes de outros municípios e estados, pode estar sujeito à variação do perfil de resistência nos efluentes. Além desse, o HJSN que foi direcionado para receber a maioria dos casos graves de COVID-19 durante a pandemia, pode ser que tenha modificado o perfil de resistência do efluente ao longo do tempo, devido ao uso de antimicrobianos durante o tratamento de pacientes.

Estudo publicado por Huijbers et al. (2020), mostrou que há relações significativas entre a proporção de *E. coli* resistente de amostras de efluentes e a proporção de *E. coli* resistente de amostras clínicas, sugerindo que o monitoramento de BRA's em efluentes pode ser usado para prever os níveis de resistência clínica que, por sua vez, podem ajudar a orientar o uso de antimicrobianos e o gerenciamento da resistência. Em tal estudo foram utilizadas amostras compostas de afluentes à ETE's que atendem as principais cidades em dez países europeus. Autores responsáveis por conduzir tal pesquisa ressaltaram que um dos pontos interessantes a ser iniciado o monitoramento é por meio da coleta de amostras de efluentes hospitalares, que teoricamente se assemelham mais à população de pacientes desse hospital do que amostras de um local mais a jusante, onde o efluente hospitalar é misturado e diluído com efluentes de outras partes da comunidade.

Isso abre a possibilidade de usar o monitoramento de efluentes hospitalares para a geração de dados de vigilância que refletem a situação clínica, o que pode ser especialmente valioso em países como o Brasil, onde os dados de resistência a antimicrobianos são escassos. Entretanto, é necessário que a legislação seja adaptada para exigir dos órgãos responsáveis tal monitoramento e fomentar um banco de dados para servir como tomada de decisão.

6. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente estudo foi possível identificar que os esgotos hospitalares da Região Metropolitana de Vitória – ES por meio das análises físico-químicas e microbiológicas estão dentro da média de qualidade de efluentes hospitalares encontradas na literatura, porém as características físico-químicas variaram entre os hospitais. Encontrou-se, também, perfis de resistência diferentes na entrada e saída da estação de tratamento de esgoto do HJSN, e cepas isoladas do lago do HUCAM resistente à sete antimicrobianos diferentes.

Os resultados indicam que os efluentes hospitalares analisados, lançam na rede pública coletora de esgotos e em córregos, cepas de *Escherichia coli* portadoras de multirresistência para determinados antimicrobianos. Portanto,

tornando-se necessária a implantação de um sistema eficiente de tratamento de seus efluentes, acompanhados de monitoramento contínuo.

Destaca-se que esse estudo apresenta limitações, como o pequeno tamanho amostral e o número de isolados, o que impossibilita estudo estatísticos mais aprofundados. A falta de caracterização molecular dos isolados também é uma questão quando se trata de ampliar as discussões na detecção dos genes. Apesar dessas limitações, a constatação de que efluentes hospitalares podem ser uma fonte de bactérias resistentes considerável e importante e pode ser uma via de estudo que se aproxima do padrão de prevalência de resistência clínica.

Esse monitoramento dos níveis de resistência aos ATB em bactérias, como a *Escherichia coli* nos efluentes pode ser usada como um sistema de alerta precoce para mudanças nos padrões de resistência da população humana e animal. Principalmente por ser uma bactéria que faz parte da microbiota e está em contato direto com outros tipos de bactérias e diferentes ATB.

Entretanto, o potencial risco humano e na natureza em relação ao lançamento de efluentes hospitalares com BRA's e GRA's ainda são incertos. Se faz necessário uma padronização de relatórios e exigência do monitoramento como tantos outros parâmetros de qualidade de água, especialmente no Brasil, para permitir a construção de um banco de dados que são essenciais para a tomada de decisões na saúde baseada em evidências.

7. RECOMENDAÇÕES

- Análise do fenótipo de resistência acompanhado de dados genotípicos, ou seja, os genes detectados em cada um dos isolados;
- Estabelecer a correlação de casos clínicos com BRA's identificadas no efluente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA). **Contaminant Candidate List (CCL) and Regulatory Determination. Contaminant Candidate List 4-CCL 4, 2018.** Disponível em: <https://www.epa.gov/ccl/chemical-contaminants-ccl-4>. Acesso em: 20 mai. 2022.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, ANVISA, 2007. **Resistência Microbiana – Mecanismos e Impacto Clínico.** Disponível em: <https://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controlere/rede_rm/cursos/rm_controlere/pas_web/modulo3/mecanismos.htm>. Acesso em: 01 ago. 2021.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, ANVISA, 2008. **Interpretação de dados microbiológicos.** Disponível em: <https://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controlere/rede_rm/cursos/atm_racional/modulo2/objetivos.htm>. Acesso em: 01 ago. 2021.

ABREU, E.T.; PRETTO, J.A.; CALEARE, A.O.; TAVARES, C.R.G.; NAKAMURA, C.V. **Avaliação da resistência a antimicrobianos de bactérias isoladas de efluente hospitalar.** Acta Scientiarum Technology, v. 32, n. 1, p. 1-5, 2010

AKIBA, M.; SENBA, H.; OTAGIRI, H.; PRABHASANKAR, V.; TANIYASU, S.; YAMASHITA, N.; LEE, K.; YAMAMOTO, T.; TSUTSUI, T.; IAN JOSHUA, D.; BALAKRISHNA, K.; BAIRY, I.; IWATA, T.; KUSUMOTO, M.; KANNAN, K.; GURUGE, K.S. Impact of wastewater from different sources on the prevalence of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* in sewage treatment plants in South India. Ecotoxicol. **Environ. Saf.**, v. 115, p. 203-208, 2015.

AKIN, B.S. **Contaminant Properties of Hospital Clinical Laboratory Wastewater: A Physiochemical and Microbiological Assessment.** Journal of Environmental Protection, v.7, p.635-642, 2016

ALLEN H.K.; DONATO J.; WANG, H.H.; CLOUD-HANSEN, K.A.; DAVIES, J.; HANDELSMAN, J. **Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments.** Nat. Ver. Microbiol., v.8, p. 251–259, 2010.

ALVAREZ-ORTEGA, C.; WIEGAND, I.; OLIVARES, J.; HANCOCK, R.E.W.; MARTÍNEZ, J.L. **The intrinsic resistome of *Pseudomonas aeruginosa* to β -lactams.** Virulence, v. 2, p. 144–146, 2011.

AMARASIRI, M.; SANO, D.; SUZUKI, S. **Understanding human health risks caused by antibiotic resistant bacteria (ARB) and antibiotic resistance genes (ARG) in water environments: Current knowledge and questions to be answered.** Critical Reviews in Environmental Science and Technology, 2019.

AMOS, G.C.A.; PLOUMAKIS, S.; ZHANG, L.; HAWKEY, P.M.; GAZE, W.H.; WELLINGTON, E.M.H. **The widespread dissemination of integrons throughout bacterial communities in a riverine system.** ISME J., v.12, p.681-691, 2018.

ANDERSSON, D.I.; HUGHES, D. **Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics.** Nat. Rev. Microbiol., v.12, p.465-478, 2014.

APHA. **Standard Methods for the Examination Water and Wastewater**, 23th ed. Washington, DC: American Public Health Association, 2017.

BAI, Y.; RUAN, X.; XIE, X.; YAN, Z. **Antibiotic resistome profile based on metagenomics in raw surface drinking water source and the influence of environmental factor: a case study in Huaihe River Basin, China.** Environ. Pollut., v.248, p. 438–447, 2019.

BAKER-AUSTIN, C.; WRIGHT, M.S.; STEPANAUSKAS, R.; MCARTHUR, J.V. **Co-selection of antibiotic and metal resistance.** Trends Microbiol., v.14, p.176-182, 2006.

BAQUERO, F.; MARTÍNEZ, J.; CANTÓN, R. **Antibiotics and antibiotic resistance in water environments.** Current Opinion in Biotechnology, v. 19, p. 260–265, 2008.

BARTLEY, P.S.; DOMITROVIC, N.; MORETTO, V.T.; SANTOS, C.S.; TERASHIMA, R.P.; REIS, M.G.; BARBOSA, L.M.; BLANTON, R.E.; BONOMO, R.A.; PEREZ, F. **Antibiotic Resistance in Enterobacteriaceae from Surface Waters in Urban Brazil Highlights the Risks of Poor Sanitation.** The Amer. Jour. of Trop. Med. and Hyg. v. 100, p. 1369–1377, 2019.

BELTRAME, L. C. **Caracterização do resistoma de amostras provenientes de ambientes de criação animal e hospitalar do Estado de Santa Catarina, Brasil.** Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia e Biociências, 2021.

BERENDONK, T.U.; MANAIA, C.M.; MERLIN, C.; FATTA-KASSINOS; D., CYTRYN, E; WALSH, F.; BURGMANN, H.; SORUM, H.; NORSTROM, M.; PONS, M.N.; KREUZINGER, N.; HUOVINEN, P.; STEFANI, S.; SCHWARTZ, T.; KISAND, V.; BAQUERO, F.; MARTINEZ, J.L. **Tackling antibiotic resistance: the environmental framework.** Nat. Rev. Microbiol., v.13, p.310-317, 2015.

BLAIR, J.M.; RICHMOND, G.E.; PIDDOCK, L.J. **Multidrug efflux pumps in Gram-negative bacteria and their role in antibiotic resistance.** *Future Microbiol.*, v. 9, p. 1165–1177, 2014.

BÖGER, B.; SUREK, M.; VILHENA, R.O.; FACHI, M.M.; JUNKERT, A. M.; SANTOS, J. M.M.F.; DOMINGOS, E.L.; COBRE, A. F.; MOMADE, D.R.; PONTAROLO, R. **Occurrence of antibiotics and antibiotic resistant bacteria in subtropical urban rivers in Brazil.** *Journal of Hazardous Materials*, v. 402, 2021.

BRĄGOSZEWSKA, E.; BIEDRÓN, I. **Indoor air quality and potential health risk impacts of exposure to antibiotic resistant bacteria in an office rooms in Southern Poland.** *Int. J. Environ. Res. Publ. Health*, v.15, 2018.

BRANCO, N.M.C; ALBERT, A.L.M.; ROMÃO, C.M.C.P.A. **Poluentes emergentes: Antimicrobianos no ambiente, a educação ambiental e o aspecto regulatório nacional e internacional.** *Research, Society and Development*, v. 10, n. 8, e. 16910817083, 2021.

BRASIL. **Manual prático de análise de água.** Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde. Brasília: Funasa, 2013.

BRASIL. **Manual de Controle da Qualidade da Água para Técnicos que Trabalham em ETAS.** Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde. Brasília: Funasa, 2014.

BRASIL.. **Vigilância e controle da qualidade da água para consumo humano.** Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, 212 p. Brasília, 2006.

BRASIL. **Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento 2020.** Ministério do Desenvolvimento Regional. Secretaria Nacional de Sanemaneto. Disponível em: <http://www.snis.gov.br/painel-informacoes-saneamento-brasil/web/painel-esgotamento-sanitario>. Acesso em: 20 mai. 2022.

BrCAST, **Brazilian Committee On Antimicrobial Susceptibility Testing,** Método de disco-difusão: BrCAST-EUCAST, 2021.

CAHILL, N.; O’CONNOR, L.; MAHON, B.; VARLEY, Á.; MCGRATH, E.; RYAN, P.; CORMICAN, M.; BREHONY, C.; JOLLET, K.A.; MAIDE, M.C.; BRISSEN, S. MORRIS, D. **Hospital effluent: A reservoir for carbapenemase-producing Enterobacterales?.** *Science of The Total Environment*, v. 672, p. 618–624, 2019.

CARVALHO, J.J.V.; BOAVENTURA, F.G.; SILVA, A.C.R.; XIMENES, R.L.; RODRIGUES, L.K.C.; NUNES, D.A.A.; SOUZA, V.K.G. **Bactérias multirresistentes e seus impactos na saúde pública: Uma responsabilidade social.** *Resear., Socie. and Develop.*, v. 10, n. 6, 2021.

CASSINI, S.T.; GONÇALVES, R.F.; ZANDONATE, E.; MARQUES, M.A.M. **Deteção simplificada de coliformes totais e *Escherichia coli* em amostras de águas utilizando substrato cromogênico em microplacas e metodologia NMP**. Funasa 3º Caderno de pesquisa em engenharia de saúde pública / Fundação Nacional de Saúde. Brasília: Funasa, p. 151-178, 2013. Disponível em: http://www.funasa.gov.br/biblioteca-eletronica/publicacoes/estudos-e-pesquisas1/-/asset_publisher/qGiy9skHw4ar/content/3-caderno-de-pesquisa-em-engenharia-de-saude-publica?inheritRedirect=false. Acesso em: 02 mai. 2022.

CENTRO DOS EUA PARA CONTROLE E PREVENÇÃO DE DOENÇAS (CDC). **Initiatives for Addressing Antimicrobial Resistance in the Environment: Current Situation and Challenges**. 2018.

CHAGAS, T.P.; SEKI, L.M.; CURY, J.C.; OLIVEIRA, J.A.; DÁVILA, A.M.; SILVA, D.M.; ASENSI, M.D. **Multiresistance, beta-lactamase-encoding genes and bacterial diversity in hospital wastewater in Rio de Janeiro, Brazil**. J. Appl. Microbiol., v. 111, p.572–581, 2011.

CHANCEY, S.T.; ZÄHNER, D.; STEPHENS, D.S. **Acquired inducible antimicrobial resistance in Gram-positive bacteria**. Future Microbiol., v. 7, p. 959–978, 2012.

CHEN, Q.; AN, X.; LI, H.; SU, J.; MA, Y.; ZHU, Y.G. **Long-term field application of sewage sludge increases the abundance of antibiotic resistance genes in soil**. Environ. Int., p. 1–10, 2016.

CHUKWU, V. A.; OTI, V. B.; NNADOZIE, T. N.; NSEMOH, H. E.; AJEGENA, B. K. **Microbiological and Antimicrobial Analysis of Hospital Wastewater Discharged into the Soil Environment**. South Asian Journal of Research in Microbiology, 2018.

COMISSÃO EUROPEIA. **Abordagem Estratégica da União Europeia relativa aos Produtos Farmacêuticos no Ambiente**. Bruxelas, 2019. Disponível em: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:52019DC0128&from=EN>. Acesso em: 20 mai. 2022.

COMISSÃO EUROPEIA. Diretiva 2020/1161 da Comissão de 4 de agosto de 2020 que estabelece uma lista de vigilância das substâncias a monitorizar a nível da União no domínio da política da água, nos termos da Diretiva 2008/105/CE do Parlamento Europeu e do Conselho. **Jornal Oficial das Comunidades Europeias**. Disponível em: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32020D1161&from=EN>. Acesso em: 20 mai. 2022.

COMISSÃO EUROPEIA. Diretiva 60/2000/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 23 de outubro de 2000, que estabelece um quadro de ação comunitária no domínio da política da água. **Jornal Oficial das Comunidades Europeias**. Disponível em: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32000D0060&from=EN>.

content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:02000L0060-20141120&from=GA. Acesso em: 20 mai. 2022.

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO - CETESB. **Guia nacional de coleta e preservação de amostras: água, sedimento, comunidades aquáticas e efluentes líquidos**, 2011.

COMPANHIA DE SANEAMENTO ESPÍRITO SANTANSE, CESAN, 2013. **Cesan divulga regras para receber esgoto dos estabelecimentos de saúde**. Disponível em: <https://www.cesan.com.br/noticias/cesan-divulga-regras-para-receber-esgoto-dos-estabelecimentos-de-saude/>. Acesso em: 07 set. 2021.

CONAMA. **Conselho Nacional do Meio Ambiente**. Resolução nº. 358, de 29 de abril de 2005. Dispõe sobre o tratamento e a disposição final dos resíduos dos serviços de saúde e dá outras providências. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 04 mar. 2005.

COUTINHO, F.H.; PINTO, L.H.; VIEIRA, R.P.; MARTINS, O.B.; SALLOTO, G.R.B.; SANTORO, D. DE O.; CLEMENTINO, M.M.; CARDOSO, A.M. **Antibiotic resistance in aquatic environments of rio de Janeiro, Brazil**. *Perspect. Water Pollut* 1–22, 2013.

COX, G. e WRIGHT, G.D. **Intrinsic antibiotic resistance: mechanisms, origins, challenges and solutions**. *Int. J. Med. Microbiol.*, v. 303, p. 287–292, 2013.

DANNER, M.C.; ROBERTSON, A.; BEHRENDTS, V.; REISS, J. Antibiotic pollution in surface fresh waters: occurrence and effects. **Sci. Total Environ.**, v. 64, p. 793–804, 2019.

DEPIZZOL, F. **Avaliação da resistência a antibióticos em isolados de *Escherichia coli* provenientes de esgotos hospitalar e sanitário**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Universidade Federal do Espírito Santo, p. 144, 2006.

DUAN, Y.; CHEN, Z.; TAN, L.; WANG, X.; XUE, Y.; WANG, S.; WANG, Q.; DAS, R.; LIN, H.; HOU, J.; LI L.; MAO, D.; LUO, Y. **Gut resistomes, microbiota and antibiotic residues in Chinese patients undergoing antibiotic administration and healthy individuals**. *Sci. Total Environ.*, v. 705, 135674, 2020.

EMMANUEL, E.; PERRODIN, Y.; KECK, G.; BLANCHARD, J.M.; VERMANDE, P. **Ecotoxicological risk assessment of hospital wastewater: a proposed**

framework for raw effluents discharging into urban sewer network. J. Hazard Mater., v. 117, p. 1-11, 2005.

FENG, J.; LI, B.; JIANG, X.; YING YANG, G.F. W.; ZHANG, T.; LI, X. **Antibiotic resistome in a large-scale healthy human gut microbiota deciphered by metagenomic and network analyses.** Environ. Microbiol., v. 20, p. 355–368, 2017.

FIGUEIRA, V.; SERRA, E.; MANAIA, C.M. **Differential patterns of antimicrobial resistance in population subsets of *Escherichia coli* isolated from waste- and surface waters.** Sci. Total Environ. 409, p. 1017-1023.,2011

FLANDROY, L.; POUTAHIDIS, T.; BERG, G.; CLARKE, G.; DAO, M.C.; DECAESTECKER, E.; FURMAN, E.; HAAHTELA, T.; MASSART, S.; PLOVIER, H.; SANZ, Y.; ROOK, G. **The impact of human activities and lifestyles on the interlinked microbiota and health of humans and of ecosystems.** Sci. Total Environ., v. 627, p. 1018–1038, 2018.

GALLERT, C.; FUND, K.; WINTER, J. **Antibiotic resistance of bacteria in raw and biologically treated sewage and in groundwater below leaking sewers.** Appl. Microbiol. Biotechnol., v. 69, p. 106-112, 2005.

GASPAR, C.M.; CZISZTER, L.T.; LAZARESCU, C.F.; TIBRU, I.; PENTEA, M.; BUTNARIU, M. **Antibiotic Resistance among *Escherichia coli* Isolates from Hospital Wastewater Compared to Community Wastewater.** Water, v. 13, e. 3449, 2021.

GAUTAM, A.K.; KUMA, S.; SABUMON, P.C. **Preliminary study of physico-chemical treatment options for hospital wastewater.** J. Environ. Manage., v. 83, p. 298-306, 2007.

GIRIJAN, S. K.; PAUL, R.; KUMAR, V.J.R.; PILLAI, D. **Investigating the impact of hospital antibiotic usage on aquatic environment and aquaculture systems: A molecular study of quinolone resistance in *Escherichia coli*.** Science of the Total Environment, v. 748, 2020.

GONÇALVES, V.D.; MEIRELLES, F.P.; CATALDO, M.; OLIVEIRA, B.F.; ARAUJO, B.N.; BOTELHO, JG. **Detection of multidrug-resistant *Enterobacteriaceae* isolated from river waters flowing to the Guanabara Bay and from clinical samples of hospitals in Rio de Janeiro, Brazil.** Biomed., v. 39, p. 135-149, 2019.

GOVERNO DO ESTADO DO ESPÍRITO SANTOa. **Hospital Estadual Jayme dos Santos Neves – HEJSN.** Disponível em: <https://saude.es.gov.br/hospital-estadual-jayme-dos-santos-neves-hejsn>.

GOVERNO DO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO**b. Hospital Estadual de Atenção Clínica - HEAC.** Disponível em: <https://saude.es.gov.br/hospital-estadual-de-atencao-clinica-heac#:~:text=Os%20novos%20servi%C3%A7os%2C%20juntamente%20com,Hospital%20Estadual%20de%20Aten%C3%A7%C3%A3o%20Cl%C3%ADnica.>

GOVERNO DO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO**c. Centro de Reabilitação Física do Espírito Santo – CREFES.** Disponível em: <https://saude.es.gov.br/centro-de-reabilitacao-fisica-do-espírito-santo-crefes.>

GUARDABASSI, L.; PETERSEN, A.; OLSEN, J. E.; DALSGAARD, A. **Antibiotic resistance in *Acinetobacter* spp. isolated from sewers receiving waste effluent from a hospital and a pharmaceutical plant.** Appl. Environ. Microbiol.; v.64, 1998.

GULLBERG, E.; CAO, S.; BERG, O.G.; ILBACK, C.; SANDEGREN, L.; HUGHES, D.; ANDERSSON, D.I. **Selection of resistant bacteria at very low antibiotic concentrations.** Plos Pathogens, n. 7, p., 2011.

GURUGE, K.S.; TAMAMURA, Y.A.; GOSWAMI, P.; TANOUE, R.; JINADASA, K.B.S.N. NOMIYAMA, K.; OHURA, T.; KUNISUE, T.; TANABE, S.; AKIBA, M. **The association between antimicrobials and the antimicrobial resistant phenotypes and resistance genes of *Escherichia coli* isolated from hospital wastewaters and adjacent surface waters in Sri Lanka.** Chemosphere, v.279, e.130591, 2021.

HALLING-SØRENSEN, B.; NIELSEN, S.N.; LANZKY, P.F.; INGERSLEV, F.; HOLTEN, H.C.L.; JØRGENSEN, S.E. **Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment-A review.** Chemosphere, v. 36, p.357-393, 1998.

HASSOUN-KHEIR, N.; STABHOLZ, Y.; ULRICHKREFT, J.; LA CRUZ, R.; ROMALDE, J. L.; NESME, J.; SØRENSEN, S.J.; SMETS, B.F.; GRAHAM, D.; PAUL, M. **Comparison of antibiotic-resistant bacteria and antibiotic resistance genes abundance in hospital and community wastewater: A systematic review.** Science of the Total Environment, v.743, e.140804, 2020.

HELLMER, M.; PAXEUS, N.; MAGNIUS, L.; ENACHE, L.; ARNHOLM, B.; JOHANSSON, A.; BERGSTROM, T.; NORDER, H. **Detection of pathogenic viruses in sewage provided by early warnings of Hepatitis A virus and Norovirus outbreaks.** Appl. Environ. Microbiol. v.80, p.6771-6781, 2014.

HIRSCH, R.; TERNES, T.A.; HABERER, K.; KRATZ, K.L. **Occurrence of antibiotics in the aquatic environment.** Sci Total Environ, v.225, p.109-118, 1999.

HOCQUET, D.; MULLER, A.; BERTRAND, X. **What happens in hospitals does not stay in hospitals: antibiotic-resistant bacteria in hospital wastewater systems.** J. Hosp. Infect., v. 93, p. 395–402, 2016.

- HONDA, R.; WATANABE, T.; SAWAITTAYOTIN, V. et al. **Impacts of urbanization on the prevalence of antibiotic-resistant *Escherichia coli* in the Chaophraya River and its tributaries.** Water Science & Technology, 2016.
- HUIJBERS, P.M.C.; LARSSON, D.G.J.; FLACH, C.F.; **Surveillance of antibiotic resistant *Escherichia coli* in human populations through urban wastewater in ten European countries.** Environmental Pollution, v.261, 2020.
- HUTINEL, M.; FICK, J.D.G.; LARSSON, J.; FLACH, C.F. **Investigating the effects of municipal and hospital wastewaters on horizontal gene transfer.** Environmental Pollution, v. 276, 116733, 2021.
- HOVI, T.; SCHULMAN, L.M.; VAN DER AVOORT, H.; DESHPANDE, J.; ROIVAINEN, M.; DE GOURVILLE, E.M. **Role of environmental poliovirus surveillance in global polio eradication and beyond.** Epidemiol. Infect., v. 140, p.1-13, 2021
- INGERSON-MAHAD, M.; REID, A. *E.coli*: Good, bad, & deadly. **American Academy of Microbiology**, p. 1-13, 2011.
- JELIC, A.; RODRIGUEZ-MOZAZ, S.; BARCELÓ, D.; GUTIERREZ, O. **Impact of in-sewer transformation on 43 pharmaceuticals in a pressurized sewer under anaerobic conditions.** Water Res., v.68, p.98–108, 2015.
- JIA, S.; ZHANG, X.X.; MIAO, Y.; ZHAO, Y.; YE, L.; LI, B.; ZHANG, T. **Fate of antibiotic resistance genes and their associations with bacterial community in livestock breeding wastewater and its receiving river water.** Water Res., v.124, p.259-268, 2017.
- KADYKALO, S.; THOMAS, J.; PARMLEY, E.J.; PINTAR, K.; FLEURY, M. **Antimicrobial resistance of *Salmonella* and generic *Escherichia coli* isolated from surface water samples used for recreation and a source of drinking water in southwestern Ontario, Canada.** Zoonoses Public Health, v.67, p.566–575, 2020.
- KARKMAN, A.; DO, T.T.; WALSH, F.; VIRTÀ, M.P.J. **Antibiotic-resistance genes in wastewater.** Trends Microbiol., v.26, p. 220–228, 2018.
- KAUFMANN, S.H. **Paul Ehrlich: founder of chemotherapy.** Nat Rev Drug Discov, v.7, 2008.
- KHAN, M.T.; SHAH, I.A.; IHSANULLAH, I.; NAUSHAD, M.; ALI, S.; SHAH, S.H.A.; MOHAMMAD, A.W. **Hospital wastewater as a source of environmental contamination: An overview of management practices, environmental risks, and treatment processes.** Journal of Water Process Engineering, v. 41, 101990, 2021.
- KOLOKOTSA, A.; LEOTSINIDIS, M.; KALAVROUZOTIS, I.; SAZAKLI, E. **Effects of tourist flows on antibiotic resistance in wastewater of a Greek island.** Journal of Applied Microbiology, 2020.

KRAUPNER, N.; HUTINEL, M.; SCHUMACHER, K.; GRAY, D.A.; GENHEDEN, M.; FICK, J.; FLACH, C.; LARSSON, D.G.J. **Evidence for selection of multi-resistant *E. coli* by hospital effluent.** Environment International., v. 150, 106436, 2021.

KUMAR, A. e PAL, D. **Antibiotic resistance and wastewater: Correlation, impact and critical human health challenges.** Journal of Environmental Chemical Engineering, v.6, p. 52–58, 2018.

KUMAR, M.; RAM, B.; SEWWANDI, H.; HONDA, R.; CHAMINDA, T. **Treatment enhances the prevalence of antibiotic-resistant bacteria and antibiotic resistance genes in the wastewater of Sri Lanka, and India.** Environmental Research, v.183, 109179, 2020.

KUTILOVA, I.; MEDVECKY, M.; LEEKITCHAROENPHON, P.; MUNK, P.; MASARIKOVA, M.; DAVIDOVA-GERZOVA, L.; JAMBOROVA, I.; BORTOLAIA, V.; PAMP, S. J.; DOLEJSKA, M. **Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and antimicrobial resistance in municipal and hospital wastewaters in Czech Republic.** Environmental Research, v. 193, 110487, 2021.

KWAK, Y.K.; COLQUE, P.; BYFORS, S.; GISKE, C.G.; MEOLLBY, R.; KÜHN, I. **Surveillance of antimicrobial resistance among *Escherichia coli* in wastewater in Stockholm during 1 year: does it reflect the resistance trends in the society?** Int. J. Anti- microb. Agents, v.45, p.25-32., 2015.

KÜMMERER K. **Drugs in the environment: emission of drugs, diagnostic and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources - a review.** Chemosphere, v. 45, p. 957-969, 2001.

KÜMMERER, K. **Antibiotics in the aquatic environment - A review - Part II.** Chemosphere, v.75, p.435-441, 2009.

LAMBA, M.; GRAHAM, D. W.; AHAMMAD, S. Z. **Hospital Wastewater Releases of Carbapenem-Resistance Pathogens and Genes in Urban India.** Environmental Science & Technology, v. 51(23), p. 13906–13912, 2017.

LAMBA, M.; GUPTA, S.; SHUKLA, R.; GRAHAM, D.W.; SREEKRISHNAN, T.R.; AHAMMAD, S.Z. **Carbapenem resistance exposures via wastewaters across New Delhi.** Environ. Int., v. 119, p. 302–308, 2018.

LANDERS, T.F.; COHEN, B.; WITTUM, T.E.; LARSON, E.L. **A review of antibiotic use in food animals: perspective, policy, and potential.** Public Health Rep., v.127, p.4–22, 2012.

LEONARD, A.F.; ZHANG, L.; BALFOUR, A.J.; GARSIDE, R.; GAZE, W.H. **Human recrea- tional exposure to antibiotic resistant bacteria in coastal bathing waters.** Environ. Int., v.82, p.92-100, 2015.

LI, J.; CHENG, W.; XU, L.; STRONG, P.J.; CHEN, H. **Antibiotic-resistant genes and antibiotic-resistant bacteria in the effluent of urban residential**

areas, hospitals, and a municipal wastewater treatment plant system. Environ. Sci. Pollut. Res., v, 22, p.4587–4596, 2015.

LIM, M. Y.; CHO, Y. RHO, M. **Diverse Distribution of Resistomes in the Human and Environmental Microbiomes.** Current Genomics. Bent. Sci. Pub., v. 19, n. 8, p. 701-711, 2018.

LIN, J.; NISHINO, K.; ROBERTS, M.C.; TOLMASKY, M.; AMINOV, R.I.; ZHANG, L.; 2015. Mechanisms of antibiotic resistance. **Front. Microbiol.**, v. 6, p. 2013–2015, 2015.

LIU, X.; ZHANG, G.; LIU, Y.; LU, S.; QIN, P.; GUO, X.; BI, B.; WANG, L.; XI, B.; WU, F.; WANG, W.; ZHANG, T. **Occurrence and fate of antibiotics and antibiotic resistance genes in typical urban water of Beijing, China.** Environmental Pollution, v. 246, p. 163-173, 2019.

MAHON, C.R.; LEHMAN, D.C.; MANUSELIS, G. **Textbook of Diagnostic Microbiology**, 2014.

MANAIA, C.M. **Assessing the risk of antibiotic resistance transmission from the environment to humans: non-direct proportionality between abundance and risk.** Trends Microbiol., v.25, 2017.

MAO, D.; YU, S.; RYSZ, M.; LUO, Y.; YANG, F.; LI, F.; HOU, J.; MU, Q.; ALVAREZ, P.J. **Prevalence and proliferation of antibiotic resistance genes in two municipal wastewater treatment plants.** Water Res., v. 85, p. 458–466, 2015.

MARQUEZI, M. C. **Comparação de metodologias para a estimativa do número mais provável (NMP) de coliformes em amostras de água.** Dissertação para obtenção do título de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade de São Paulo, 2010.

MARTINS, A.; SILVA, R.A.; FERREIRA, L.O.; LICATE, M.M.; DELAFIORI, C.R.; FRANÇA PÔRTO, S.F. **Resistência a antimicrobianos de enterobactérias isoladas de águas destinadas ao abastecimento público na região centro-oeste do estado de São Paulo, Brasil.** Rev. Pan-Amaz. Saúde, v.10, e. 201900065, 2019.

MEDINA, C.; GINN, O.; BROWN, J. **Detection and assessment of the antibiotic resistance of Enterobacteriaceae recovered from bioaerosols in the Choqueyapu River area, La Paz- Bolivia.** Science of the Total Environment, 2020

MONTAGNER, C. C.; VIDAL, C.; ACAYABA, R.D. **Contaminantes emergentes em matrizes aquáticas do Brasil: cenário atual e aspectos analíticos, ecotoxicológicos e regulatórios.** Quim. Nova, v. 40, n. 9, p.1094-1110, 2017.

MOURA, A.P.B.L.; PINHEIRO JUNIOR, J.W.; OLIVEIRA, R.B.A.; DUARTE, D.A.M.; RIBEIRO, A.R.; REIS, E.M.F. **Pesquisa de Coliformes Termotolerantes, Totais e *Salmonella Spp.* em carnes caprinas comercializadas na cidade do Recife, Pernambuco.** *Arq. Inst. Biol.*, v.74, n.4, p.293-299, 2007.

NEUDORF, K.D.; HUANG, Y.N.; RAGUSH, C.M.; YOST, C.K.; JAMIESON, R.C.; TRUELSTRUP, L. H. **Antibiotic resistance genes in municipal wastewater treatment systems and receiving waters in Arctic Canada.** *Sci. Total Environ.*, v. 598, p.1085–1094, 2017.

O'NEIL, Jim. **Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations.** Governo do Reino Unido. Antimicrobial Resistance: Tackling a Crisis for the Health and Wealth of Nations, 2014.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **Guidelines for drinking-water quality.** Geneva, 1993.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Guidelines for Drinking Water Quality - vol 2 Recommendations.** Geneve: WHO, p.8-29, 1998.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **Contengamos la resistencia microbiana,** 2010. Disponível:
http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/42480/WHO_CDS_2000.2_spa.pdf;jsessionid=65F9D0CF42D4C0647B3B12FDE4B2F6B0?sequence=1. Acesso em: 06 fev. 2022.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed, 2017.** Disponível em:<<https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>>. Acesso em 01 mar. 2022.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **WHO report on surveillance of antibiotic consumption: 2016-2018 early implementation.** Geneva, 2018

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **Antimicrobianos Criticamente Importantes para Medicina Humana.** 6th ed.; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2019.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE; EMMANUEL, J.; PIEPER, U.; RUSHBROOK, P.; STRINGER, R.; TOWNEND, W.; WILBURN, S.; ZGHONDI, R. **Safe Management of Wastes From Health-Care Activities.** p. 329, 2014.

ORTOLAN, M.G.S.; CARDOSO, M.R.I.; AYUB, M.A.Z. **Perfil microbiológico de bactérias mesofílicas do efluente do hospital de clínicas de Porto Alegre.** In: XXVII Congresso Interamericano de Engenharia Sanitária e Ambiental. Anais do 27º Congresso Interamericano de Engenharia Sanitária e Ambiental. Porto Alegre, 2000.

- PANTANELLA, F.; LEKUNBERRI, I.; GAGLIARDI, A.; VENUTO, G.; SÀNCHEZ-MELSIÓ, A.; FABIANI, M.; BALCÁZAR, J.L.; SCHIPPA, S.; DE GIUSTI, M.; BORREGO, C.; SOLIMINI, A. **Effect of Urban Wastewater Discharge on the Abundance of Antibiotic Resistance Genes and Antibiotic-Resistant *Escherichia coli* in Two Italian Rivers.** Int. J. Environ. Res. Public Health, v. 17, 2020.
- PAULSHUS, E.; KÜHN, I.; MAOLLBY, R.; COLQUE, P.; O'SULLIVAN, K.; MIDTVEDT, T.; LINGAAS, E.; HOLMSTAD, R.; SÜRUM, H. Diversity and antibiotic resistance among *Escherichia coli* populations in hospital and community wastewater compared to wastewater at the receiving urban treatment plant. **Water Res.** 161, p. 232-241, 2019.
- PAUWELS, B.; VERSTRAETE, W. **The treatment of hospital wastewater: an appraisal.** J. Water Health, v.4, p.405–416, 2006.
- PAZDA, M.; KUMIRSKA, J.; STEPNOWSKI, P.; MULKIEWICZ, E. Antibiotic resistance genes identified in wastewater treatment plant systems – A review. **Sci. Total Environ.**, v. 697, p. 134023, 2019.
- PERSOONS, D.; DEWULF, J.; SMET, A.; HERMAN, L.; HEYNDRICKX, M.; MARTEL, A.; CATRY, B.; BUTAYE, P.; HAESEBROUCK, F. **Antimicrobial use in Belgian broiler production.** Prev. Vet. Med., v. 105, p.320–325, 2012.
- PIERCE, M.L.; WARD, J.E.; HOLOHAN, B.A.; ZHAO, X.; HICKS, R.E. **THE influence of site and season on the gut and pallial fluid microbial communities of the eastern oyster, *Crassostrea virginica* (Bivalvia, Ostreidae): community-level physiological profiling and genetic structure.** Hydrobiologia. v.765, p. 97–113, 2016.
- PNUMA. Fronteras. **Nuevos temas de interés ambiental.** Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente, Nairobi 2017. Disponível em: < https://wedocs.unep.org/bitstream/handle/20.500.11822/27545/Frontiers1819_CH5_SP.pdf?sequence=6&isAllowed=y>. Acesso em: 20 mai. 2022.
- PONS, M. J.; TORO, M.; MEDINA, S.; SAENS, Y.; RUIZ, J. **Antimicrobial agentes, antibacterial resistance and sustainable health.** South Sout., v.1, e. 1, 2020.
- PÄRNÄNEN, K.M.M.; NARCISO-DA-ROCHA, C.; KNEIS, D.; BERENDONK, T.U.; CACACE, D.; DO, T.T.; ELPERS, C.; FATTA- KASSINOS, D. et al. **Antibiotic resistance in European wastewater treatment plants mirrors the pattern of clinical antibiotic resistance prevalence.** Sci. Adv., v. 5, 2019.
- QIAO, M.; YING, G.G.; SINGER, A.C.; ZHU, Y.G. **Review of antibiotic resistance in China and its environment.** Environ. Int., v.110, p.160-172, 2018.

RANDALL, C.P.; MARINER K.R.; CHOPRA, I., O'NEILL, A.J. **The target of daptomycin is absent form *Escherichia coli* and other gram-negative pathogens.** Antimicrob. Agents Ch., v.57, p. 637–639, 2013.

REBELLO, R.C. L. E REGUA-MANGIA, A.H. Potential enterovirulence and antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolates from aquatic environments in Rio de Janeiro, Brazil. **Sci. Total Environ.**, 490, p. 19–27, 2014.

REYGAERT, W. C. **An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bactéria.** AIMS Microbiology, v. 4, p. 482–501. 2018.

REINTHALER, F.F., GALLER, H., FEIERL, G., HAAS, D., LEITNER, E., MASCHER, F., MELKES, A., POSCH, J., PERTSCHY, B., WINTER, I., HIMMEL, W., MARTH, E., ZARFEL, G. **Resistance patterns of *Escherichia coli* isolated from sewage sludge in comparison with those isolated from human patients in 2000 and 2009.** J. Water Health, v.11, p.13-20, 2012.

RIZZO, L.; MANAIA, C.; MERLIN, C.; SCHWARTZ, T.; DAGOT, C.; PLOY, M.C. **Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: a review.** Sci. Total Environ., v. 447, p. 345-360, 2013.

RODRIGUEZ-MOZAZ, S.; CHAMORRO, S.; MARTI, E.; HUERTA, B.; GROS, M.; SANCHEZ- MELSIO, A.; BORREGO, C.M.; BARCELO, D.; BALCAZAR, J.L. **Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in hospital and urban wastewaters and their impact on the receiving river.** Water Res. v.69, p. 234-242, 2015.

ROSENBERG, F.A. **The microbiology of bottled water.** Clin Microbiol Newsl, v. 26, p. 41–44, 2003.

SANTOS, André. **Caracterização fenotípica e genotípica de *Escherichia coli* isoladas de suínos abatidos no Estado de Pernambuco, Brasil.** 2014. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal Tropical) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2014.

SCHWARTZ, T.; KOHNEN, W.; JANSEN, B.; OBST, U. **Detection of antibiotic-resistant bacteria and their resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms.** FEMS Microbiol. Ecol., v. 43, p. 325–335, 2003.

SEGAWA, T.; TAKEUCHI, N.; RIVERA, A.; YAMADA, A.; YOSHIMURA, Y.; BARCAZA, G.; SHINBORI, K.; MOTOYAMA, H.; KOHSHIMA, S.; USHIDA, K. **Distribution of antibiotic resistance genes in glacier environments.** Environ Microbiol Rep, v. 5, p. 127–134, 2013.

SILVA, V. F. V. **Caracterização fenotípica e molecular de *Escherichia coli* isoladas de amostras de água do mar da região costeira do estado de São Paulo, Brasil.** 120 f. 2015. - Universidade de São Paulo, [s. l.], 2015.

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

SURETTE, M. D. E WRIGHT, G. D. **Lessons from the Environmental Antibiotic Resistome.** *Annual Review of Microbiology*. v. 71, p. 309–329, 2017.

TRABULSI, L.R; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O.F.; CANDEIAS, J.A. **Microbiologia.** 3 ed. São Paulo: Atheneu; 1999.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO (UFES). **Pesquisa mapeia número de leitos hospitalares e respiradores no Espírito Santo, 2020.**

Disponível em: <https://ufes.br/conteudo/pesquisa-mapeia-numero-de-leitos-hospitalares-e-respiradores-no-espírito-santo#:~:text=O%20Hospital%20Universit%C3%A1rio%20Cassiano%20Antônio,os%20munic%C3%ADpios%20do%20Esp%C3%ADrito%20Santo>.

VARELA, A.R.; ANDRÉ, S.; NUNES, O.C.; MANAIA, C.M. **Insights into the relationship between antimicrobial residues and bacterial populations in a hospital-urban wastewater treatment plant system.** *Water Res.*, v. 54, p.327–336, 2014.

VAZ-MOREIRA, I.; NUNES, O.C.; MANAIA, C.M. **Bacterial diversity and antibiotic resistance in water habitats: searching the links with the human microbiome.** *FEMS Microbiol. Ver.*, v. 38, p. 761–18, 2014.

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

VON SPERLING, M. **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos.** Editora UFMG, Belo Horizonte. Volume 1, 4ª Edição, 2014.

WALSH, T.R.; WEEKS, J.; LIVERMORE, D.M.; TOLEMAN, M.A. **Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: an environmental point prevalence study.** *Lancet Infect. Dis.*, v. 11, p. 355–362, 2011.

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

WATKINSON, A.J.; MURBY, E.J.; COSTANZO, S.D. **Removal of antibiotics in conventional and advanced wastewater treatment: implications for environmental discharge and wastewater recycling.** *Water Res.*, v.41, p. 4164–4176, 2007.

WEBBER, M.; PIDDOCK, L. The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. **Antimicrob. Chemother.**, v. 51, p. 9–11, 2003.

WEGENER, H.C. **Antibiotic resistance—Linking human and animal health, In: Improving food safety through a One Health approach.** National Academy of Sciences, p. 331– 349, 2012.

WINTERSDORFF, C. J. H.; PENDERS, J.; NIEKERK, J.M.; MILLS, N.D.; MAJUMDER, S.; ALPHEN, L.B.; SVELKOU, P.H.M.; WOLFFS, P.F.G. **Dissemination of Antimicrobial Resistance in Microbial Ecosystems through Horizontal Gene Transfer.** Front. Microbiol., v.7, a.173, 2016.

WOOLHOUSE, M.E.J.; WARD, M.J. **Microbiology. Sources of antimicrobial resistance.** Science, v.341, p.1460–1461, 2013.

XIONG, W.; WANG, Y.; SUN, Y.; MA, L.; ZENG, Q.; JIANG, X.; LI, A., ZENG; Z., ZHANG, T. **Antibiotic-mediated changes in the fecal microbiome of broiler chickens define the incidence of antibiotic resistance genes.** Microbiome, v. 6, 2018.

YAN, T.; O'BRIEN, P.; SHELTON, J.M.; WHELEN, A.C.; PAGALING, E. **Municipal wastewater as a microbial surveillance platform for enteric diseases: a case study for Salmonella and salmonellosis.** Environ. Sci. Technol., v.52, p.4869-4877, 2018.

YUAN, W.; TIAN, T.; YANG, Q.; RIAZ, L. **Transfer potentials of antibiotic resistance genes in Escherichia spp. strains from different sources.** Chemosphere v.246, n.125736, 2020.

ZHUANG, M.; ACHMON, Y.; CAO, Y. LIANG, X.; CHEN, L.; WANG, H.; SIAME, B. A.; LEUNG, K. Y. **Distribution of antibiotic resistance genes in the environment.** Environmental Pollution v.285, e.117402, 2021.