

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
INSTITUTO DE BIODIVERSIDADE E SUSTENTABILIDADE

POLIANA LANDRY DE ALMEIDA SILVA

**PERFIL DE MARCADORES GENÉTICOS DE RESISTÊNCIA A BETA-
LACTÂMICOS NA BACIA HIDROGRÁFICA DO RIO MACAÉ**

MACAÉ/RJ
2024

POLIANA LANDRY DE ALMEIDA SILVA

**PERFIL DE MARCADORES GENÉTICOS DE RESISTÊNCIA A BETA-
LACTÂMICOS NA BACIA HIDROGRÁFICA DO RIO MACAÉ**

Trabalho de conclusão de curso como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas com ênfase em Meio Ambiente pela Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.^a Analy Machado de Oliveira
Leite

Coorientador: Prof. Maurício Mussi Molisani

MACAÉ/RJ
2024

FICHA CATALOGRÁFICA

CIP - Catalogação na Publicação

S766p Silva, Poliana Landry de Almeida
PERFIL DE MARCADORES GENÉTICOS DE RESISTÊNCIA A
BETA-LACTÂMICOS NA BACIA HIDROGRÁFICA DO RIO MACAÉ /
Poliana Landry de Almeida Silva. -- Rio de Janeiro,
2024.
55 f.

Orientadora: Analy Machado de Oliveira Leite.
Coorientador: Maurício Mussi Molisani.
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto
de Biodiversidade e Sustentabilidade, Bacharel em
Ciências Biológicas, 2024.

1. antibiótico. 2. genes de resistência a
antimicrobianos. 3. qualidade da água. 4.
contaminação ambiental por antimicrobianos. 5. saúde
única. I. Machado de Oliveira Leite, Analy ,
orient. II. Mussi Molisani, Maurício, coorient. III.
Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos pelo(a)
autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

FOLHA DE APROVAÇÃO

POLIANA LANDRY DE ALMEIDA SILVA

PERFIL DE MARCADORES GENÉTICOS DE RESISTÊNCIA A BETA- LACTÂMICOS NA BACIA HIDROGRÁFICA DO RIO MACAÉ

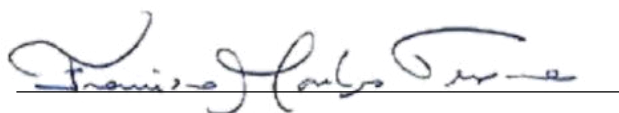
Trabalho de conclusão de curso como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas com ênfase em Meio Ambiente pela Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Aprovada em 23 de fevereiro de 2024

Prof.^a Analy Machado de Oliveira Leite, Professora Adjunta ao Instituto de Biodiversidade e Sustentabilidade – NUPEM, Universidade Federal do Rio de Janeiro- Campus Macaé



Prof. Francisco Martins Teixeira, Professor Associado à Universidade Federal do Rio de Janeiro - Campus Macaé



Prof. José Luciano Nepomuceno da Silva, Professor Associado ao Instituto de Biodiversidade e Sustentabilidade – NUPEM, Universidade Federal do Rio de Janeiro- Campus Macaé

Documento assinado digitalmente
gov.br JOSE LUCIANO NEPOMUCENO DA SILVA
Data: 20/03/2024 23:16:31-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Lais e Eduardo, pela minha vida, pelo incentivo aos estudos, pelo apoio e amor que me foi dado. Tudo o que eu conquistei até agora foi graças a eles e a Deus que me sustentou e me deu forças. Ao meu maior companheiro, Lorrان, que também acreditou em mim e me incentivou durante os momentos difíceis. A minha amiga Mayara que esteve presente durante toda a trajetória acadêmica, sendo um apoio essencial para mim e uma amizade de muitas trocas que com certeza levarei para minha vida! A meus amigos Hericles, Giovanna, Arthur e Matheus que me proporcionaram momentos de muitas risadas, alegrias e companheirismo. Agradeço vocês pela amizade sincera e verdadeira que por todos esses anos foram minha rede de apoio enquanto eu estava distante de casa. Agradeço também a minha grande amiga de infância Giovana, que me traz muitos ensinamentos e me inspira diariamente. Minha eterna gratidão vai além dessas palavras! Agradeço por toda confiança que foi depositada em mim e na minha capacidade, principalmente nos momentos em que eu não acreditava ser capaz. Sempre serei grata por todo esse amor!

À professora Analy, e ao professor Maurício pela confiança e apoio. À toda a equipe do Laboratório Integrado de Microbiologia (LIMB) do NUPEM, especialmente à técnica Paula, que foi fundamental no meu processo de aprendizado do laboratório e acompanhou meu desenvolvimento. Agradeço às professoras Tatiana de Castro Abreu Pinto e Raquel Regina Bonelli do departamento de microbiologia médica do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes (UFRJ), por cederem as estirpes utilizadas como controle positivo neste trabalho. Aos alunos de iniciação científica e mestrado do laboratório: Ana Luiza, Igor, João, Renan, Mari, Patrícia, Bruna e Laura. Todos vocês tornaram o laboratório um ambiente acolhedor, alegre e mais divertido para se estar. Isto fez toda a diferença nas minhas manhãs no laboratório, e foi essencial para o desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

SILVA, Poliana Landry de Almeida. **Perfil de marcadores genéticos de resistência a beta-lactâmicos na bacia hidrográfica do rio Macaé**. Macaé, 2024. Trabalho de Conclusão de Curso- Instituto de Biodiversidade e Sustentabilidade NUPEM UFRJ-Macaé, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Macaé, 2024.

A água é um recurso natural esgotável primordial para a manutenção da natureza e sobrevivência humana. As atividades antrópicas podem gerar diversos impactos nas bacias hidrográficas, como mudanças na microbiota e disseminação de bactérias resistentes a antimicrobianos. A presença destes microrganismos resistentes pode desencadear desequilíbrios na comunidade microbiana, se refletindo em alterações nos diferentes níveis da cadeia trófica, atingindo até mesmo a população humana. Este projeto tem como objetivo detectar genes de resistência a beta-lactâmicos presentes na bacia hidrográfica de Macaé. As amostras foram coletadas em garrafas estéreis nos períodos seco e chuvoso em seis pontos distintos da bacia hidrográfica de Macaé, representados por: S1: São Pedro Alto Curso (pré-transposição); S2: Represa de Tapera/desvio de água; S3: confluência da água de desvio com o Rio São Pedro; S4: Rio São Pedro- BR101 (pós-transposição); S5: Rio Macaé- BR101; S6: Estuário do Rio Macaé. As amostras de água foram filtradas, com auxílio de bomba de vácuo e o filtro utilizado para a extração do DNA microbiano total. As amostras de DNA foram quantificadas para amplificação dos genes de resistência a antibiótico (GRA) por PCR. Após a eletroforese em gel de agarose, as bandas de DNA amplificadas foram visualizadas, com auxílio do transiluminador. Dos dez genes selecionados apenas três genes (30%) foram detectados nas amostras. Os genes *bla-KPC* e *bla-TEM* foram encontrados em duas estações, nos pontos S2 e S6. O gene *bla-KPC* foi detectado no ponto S6 próximo ao estuário, enquanto o gene *bla-TEM* foi detectado nos pontos próximo a represa (S2), pré-transposição (S1) e ponto de confluência (S3). O gene *bla-SHV* foi identificado apenas no ponto S6 durante o período chuvoso. Considerando as amostras de ambas as estações, pelo menos um gene de resistência a beta-lactâmicos foi identificado em 50% das amostras. O gene *bla-TEM* apresentou a maior frequência de detecção nas amostras. Houve uma prevalência de genes de resistência no estuário de Macaé que pode estar relacionada ao lançamento de esgoto não tratado, bem como o descarte incorreto de antibiótico. Esses dados caracterizam o perfil de GRA beta-lactâmicos das bactérias presentes na água do Rio Macaé e contribuem para expandir as noções do potencial impacto da disseminação destes microrganismos resistentes na bacia hidrográfica, que podem levar a consequências críticas à saúde humana e animal.

Palavras-chave: antibiótico, contaminação, genes de resistência a antimicrobianos, qualidade da água

ABSTRACT

SILVA, Poliana Landry de Almeida. **Perfil de marcadores genéticos de resistência a beta-lactâmicos na bacia hidrográfica do rio Macaé**. Macaé, 2024. Trabalho de Conclusão de Curso- Instituto de Biodiversidade e Sustentabilidade NUPEM UFRJ-Macaé, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Macaé, 2024

Water is an exhaustible natural resource essential for the maintenance of nature and human survival. Human activities can have various impacts on hydrographic basins, such as changes in microbiota and the spread of antibiotic resistant bacteria. The presence of these resistant microorganisms can disrupt the microbial community, leading to alterations in different trophic levels, ultimately affecting the human population. This project aims to detect beta-lactam resistance genes present in the Macaé river basin. The samples were collected in sterile bottles during the dry and rainy seasons at six different points in the Macaé river basin, represented by: S1: São Pedro Alto Curso (pre-transposition); S2: Tapera Reservoir/water diversion; S3: confluence of the diversion water with the São Pedro River; S4: Rio São Pedro- BR101 (post-transposition); S5: Macaé River- BR101; S6: Macaé River Estuary. The water samples were filtered using a polysulfone filtration system, and the DNA from each sample was extracted, quantified for PCR amplification. Antibiotic resistance genes (ARG) were detected through electrophoresis, and the amplified DNA bands were visualized using a transilluminator. Of the ten selected genes, only three genes (30%) were detected in the samples. The *bla*-KPC and *bla*-TEM genes were found in two stations, at points S2 and S6. The *bla*-KPC gene was detected at point S6 close to the study, while the *bla*-TEM gene was detected at points close to the dam (S2), pre-transposition (S1) and confluence point (S3). The *bla*-SHV gene was only identified at point S6 during the rainy season. Considering samples from both seasons, at least one beta-lactam resistance gene was identified in 50% of the samples. The *bla*-TEM gene showed a higher frequency of detection in the samples. There was a prevalence of resistance genes in the Macaé estuary that may be related to the discharge of untreated sewage, as well as the incorrect disposal of antibiotics. These data characterize the beta-lactam GRA profile of bacteria present in the Macaé River water and provide comments to expand notions of the potential impact of the spread of resistant microorganisms in the river basin, which can lead to critical consequences for human and animal health.

Keywords: antibiotic, contamination, antimicrobial resistance genetic, water quality

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Disseminação de antibióticos e resistência a antibióticos na agricultura, comunidade, hospital, tratamento de águas residuais e ambientes associados.....	12
Figura 2- Estrutura central dos antibióticos beta-lactâmicos representada em verde.....	14
Figura 3- Mecanismos de resistência a antimicrobianos adotados pelas bactérias resistentes a antimicrobianos.....	17
Figura 4- Principais mecanismos de resistência aos beta-lactâmicos em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.....	19
Figura 5- Mapa de localização do sistema de transposição Macabu/São Pedro e dos pontos de amostragem.....	28
Figura 6- Centro de saúde PSF Tapera no município Trajano de Moraes, próximo a Represa de Tapera.....	30
Figura 7- Gel de agarose mostrando produtos amplificados por PCR de GRA selecionados.....	34
Figura 8- Frequência de detecção de genes de resistência a beta-lactâmicos estudados...	35
Figura 9- Perfil de ocorrência de GRA entre os pontos de coleta das amostras de água do Rio Macaé.....	35

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Quadro 1- Classes de antibióticos e seus respectivos mecanismos de ação.....	13
Quadro 2- Microrganismos resistentes aos beta-lactâmicos, utilizados como controle positivo no presente estudo.....	30
Quadro 3- Características dos primers selecionados para amplificação dos marcadores genéticos de resistência a beta-lactâmicos nas amostras de água do Rio Macaé.....	31
Tabela 1- Quantificação de DNA microbiano total presente nas triplicatas de amostra de água da bacia hidrográfica do Rio Macaé, coletadas no período seco e chuvoso.....	32
Tabela 2- Presença dos GRA beta-lactâmicos nas amostras de água dos diferentes pontos da bacia hidrográfica de Macaé	33

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	9
1.1 INFECÇÕES RELACIONADAS À ASSISTÊNCIA A SAÚDE (IRAS).....	9
1.2 O IMPACTO DO USO INDISCRIMINADO DE ANTIBIÓTICO NA SAÚDE GLOBAL.....	10
1.3 CLASSIFICAÇÃO DOS ANTIMICROBIANOS.....	12
1.4 RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA (RAM) E MECANISMOS DE AÇÃO.....	15
1.5 ENZIMAS BETA-LACTAMASES.....	18
1.5.1 Beta-lactamases de Classe A de Ambler.....	19
1.5.2 Metalo-beta-lactamases.....	20
1.5.3 Beta-lactamases de classe C (AmpC).....	20
1.5.4 Beta-lactamases de classe D.....	20
1.6 RESISTOMA E GENES DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS (GRA).....	21
1.7 DISSEMINAÇÃO DE GRA EM CORPOS HÍDRICOS.....	22
1.7.1 Vias de disseminação de GRA.....	23
1.8 A BACIA HIDROGRÁFICA DO RIO MACAÉ COMO POTENCIAL RESERVATÓRIO DE GRA.....	25
2 OBJETIVOS.....	26
2.1 Objetivos Gerais.....	26
2.2 Objetivos específicos.....	26
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1 ÁREA DE ESTUDO.....	27
3.2 COLETA DAS AMOSTRAS DE ÁGUA DO RIO MACAÉ.....	28
3.3 EXTRAÇÃO DO DNA MICROBIANO TOTAL DAS AMOSTRAS DE ÁGUA.....	29
3.4 MICRORGANISMOS UTILIZADOS COMO CONTROLE POSITIVO.....	29
3.5 AMPLIFICAÇÃO DE GRA POR PCR.....	30

3.6 DETECÇÃO DOS PRODUTOS DA PCR AMPLIFICADOS.....	31
4 RESULTADOS.....	32
4.1 OBTENÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO DNA TOTAL.....	32
4.2 ANÁLISE DA PRESENÇA DE GRA DA CLASSE DOS BETA-LACTÂMICOS.....	33
5 DISCUSSÃO.....	36
6 CONCLUSÃO.....	42
REFERÊNCIAS.....	43

1 INTRODUÇÃO

1.1 INFECÇÕES RELACIONADAS À ASSISTÊNCIA A SAÚDE (IRAS)

Microrganismos como bactérias comensais ou patogênicas estão presentes em diferentes ambientes, assumindo diversos papéis ecológicos. Estes seres podem ser encontrados tanto em ambientes naturais onde vivem outros organismos, quanto em locais quimicamente e fisicamente adversos a outros grupos. A capacidade de microrganismos colonizarem diversos tipos de ambientes se dá à sua versatilidade metabólica atuando em conjunto a múltiplas adaptações morfofisiológicas e a sua eficiente forma de propagação. De maneira geral, o crescimento microbiano está condicionado a fatores como nutrientes, oxigênio, pH, temperatura e luminosidade. Estas variáveis se diferem de acordo com o meio, caracterizando, assim, as diferentes distribuições das comunidades microbianas pelos ambientes. Entretanto, muitas dessas populações microbianas são responsáveis por causar graves infecções nosocomiais, principalmente, quando se trata de bactérias patogênicas (BRASIL, 2020).

As Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) são um problema de saúde pública alarmante no Brasil e no mundo por serem responsável pelo aumento no número de mortes, aumento no tempo de hospitalização, redução da qualidade de serviços de saúde e maiores gastos para o tratamento terapêutico (OMS, 2016). O termo “IRAS” é utilizado para se referir a infecções hospitalares causadas por microrganismos, mas que no sentido mais amplo se refere a infecções que se originam em serviços de saúde, que podem ser transmitidas tanto para os pacientes como para os profissionais da saúde (OPAS, 2017). Esses microrganismos infecciosos incluem bactérias, fungos, parasitas e vírus. No entanto, estes agentes etiológicos também estão presentes no ambiente natural como rios, lagos e solos, podendo ser transmitidos para seu hospedeiro humano ou animal por meio do contato (ANA et al., 2021). Dentre os patógenos que causam IRAS, as bactérias se destacam por meio do grupo denominado “ESKAPE”, o qual inclui: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* spp. (RICE, 2008).

No Brasil, a Anvisa -órgão responsável por ações nacionais para prevenir e controlar o IRAS-, seguindo as orientações da Organização Mundial da Saúde (OMS), vem elaborando e desenvolvendo diversas ações estratégicas com finalidade de reduzir o risco de adquirir as IRAS. Em setembro de 2013, a agência instituiu a primeira versão do Programa Nacional de Prevenção e Controle de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (PNPCIRAS), com

vigência para o período de 2013-2015 (OMS, 2019). Em 2016 foi publicada uma segunda versão do PNPCIRAS 2016-2020, com o objetivo principal de “reduzir, em âmbito nacional, a incidência de IRAS em serviços de saúde” (BRASIL, 2016, p.11). Atualmente, apesar do desenvolvimento e utilização de antimicrobianos mais eficazes possuírem um importante papel na melhoria da saúde humana e animal, tratando ou prevenindo doenças infecciosas, seu uso intensivo, principalmente em ambientes hospitalares, proporcionou um aumento da resistência microbiana, tornando-os menos eficazes no combate às infecções (OMS, 2016).

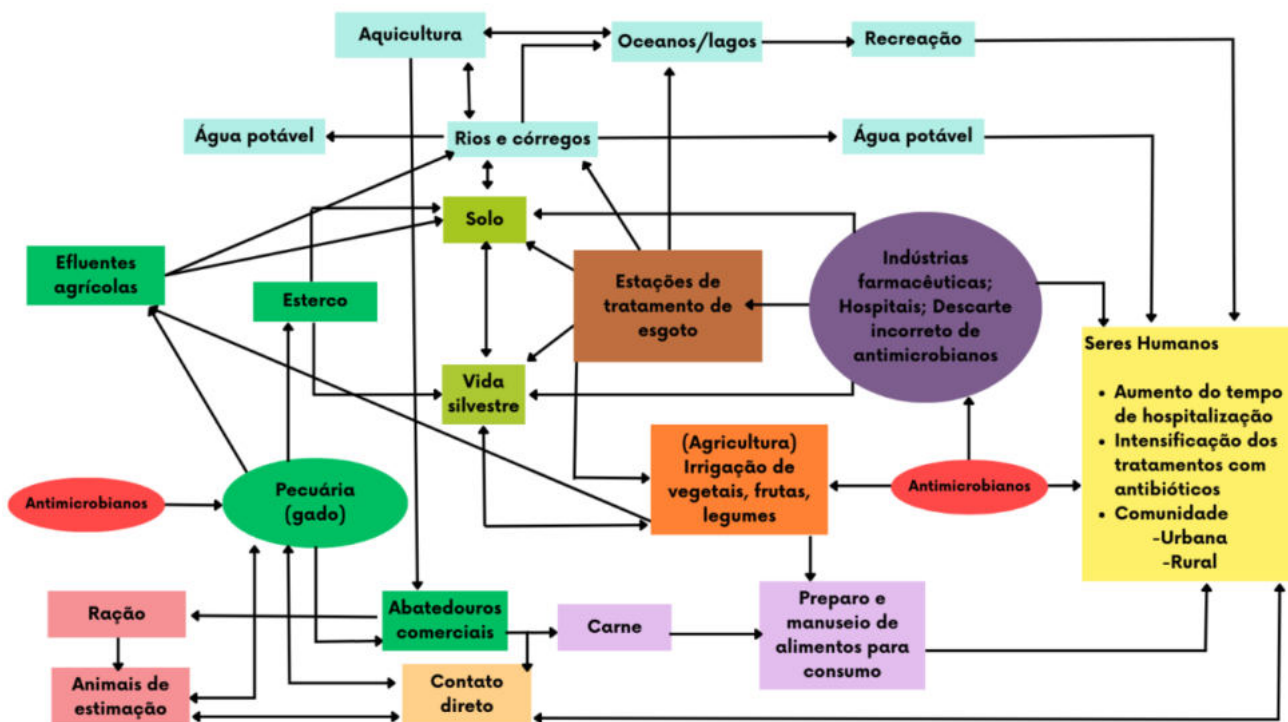
1.2 O IMPACTO DO USO INDISCRIMINADO DE ANTIBIÓTICO NA SAÚDE GLOBAL

A resistência a antimicrobianos (RAM) é um problema mundial crescente de saúde pública, devido ao uso indiscriminado de antibióticos. Essa resistência está ameaçando a capacidade mundial de tratar doenças infecciosas comuns, o que resulta em doenças prolongadas e até mesmo em morte (OPAS, 2020). A RAM também ameaça o cumprimento de vários dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) das Nações Unidas, em particular, porque compromete os objetivos de boa saúde e bem-estar (FIOCRUZ, 2023).

Atualmente, o conceito de *One Health* ou Saúde Única ganhou maior atenção no âmbito científico, justamente pela abordagem integrativa entre a saúde humana, animal e ambiental (Figura 1). Essa abordagem contribui para a implementação dos ODS e é um avanço global com aspectos transdisciplinar, sendo ela integrada e unificadora, e podendo operar em níveis local, regional, nacional e global (WHO, 2017).

O *One Health* ressalta a importância da colaboração entre os setores da saúde no enfrentamento de desafios com as IRAS, a RAM, a segurança alimentar e saúde ambiental (Figura 1). Todavia, a realidade de ambientes nos quais quantidades consideráveis de antibióticos são manipuladas, tais como hospitais, indústrias e atividades veterinárias, funcionam como meios seletivos para as bactérias, contribuindo para o aumento da RAM (PEREIRA et al., 2002).

Figura 1: Disseminação de antibióticos e resistência a antibióticos na agricultura, comunidade, hospitais, tratamentos de águas residuais e ambientes associados.



Fonte: Adaptado de DAVIES et al., 2010.

Os esforços para o combate da RAM são crescentes, conforme o problema se agrava mundialmente. Desde 2010, a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO), a Organização Mundial de Saúde Animal (OMSA) e a Organização Pan Americana da Saúde (OPAS) se uniram com o compromisso de combater a RAM, com o objetivo de mitigar os riscos na interface saúde pública, animal e ao meio ambiente. Sob este cenário, as três organizações implementaram o projeto “Trabalhando juntos para combater a resistência aos antimicrobianos” sob a perspectiva *One Health*, que reconhece a RAM como sendo um assunto multifacetado que exige a necessidade de uma resposta intersetorial. O projeto, com duração de três anos (2020-2022) e apoiado financeiramente pela União Europeia, tem como objetivo estratégico geral ampliar os esforços para combater a RAM por meio da implementação dos Planos de Ação Nacional de sete países: Argentina, Brasil, Chile, Colômbia, Paraguai, Peru e Uruguai (OPAS, 2020). No Brasil, foi elaborado o Plano de Ação Nacional para prevenção e controle da RAM no país (PAN-BR), em convergência com os objetivos definidos pela aliança tripartite. O PAN-BR esteve em vigor durante cinco anos, de 2018 a 2022, e foi avaliado anualmente com possibilidade de ajustes. No PAN-BR (formato executivo) foram apresentados quatorze Objetivos Principais, trinta e três Intervenções Estratégicas e setenta e cinco atividades, alinhados aos cinco Objetivos Estratégicos do Plano

de Ação Global. Dentre os objetivos principais, incluem: aprimorar a formação e a capacitação de profissionais e gestores com atuação nas áreas da saúde humana, animal e ambiental em RAM; promover estratégias de comunicação e educação em saúde; aprimorar e ampliar o conhecimento sobre a RAM por meio da realização de estudos científicos; construir e estabelecer o sistema nacional de vigilância e monitoramento integrado da RAM; fortalecer a implantação de medidas de prevenção e controle de infecções no âmbito da agropecuária; ampliar a cobertura do saneamento básico para prevenção e controle de infecção; promover o uso racional de antimicrobianos no âmbito da saúde humana; promover o gerenciamento adequado de resíduos de medicamentos antimicrobianos; instituir a prevenção e controle da RAM como política de estado, entre outros (BRASIL, 2019).

Devido ao aumento no número de casos de infecções causadas por microrganismos resistentes, estima-se que o número de óbitos alcance mais de dez milhões por ano até 2050, caso não sejam implantadas medidas globais de controle e vigilância (ONU, 2023). Em 2017, a Organização Mundial da Saúde (OMS) criou uma lista denominada de WHO-PPL Global (Global Priority Pathogens List), contendo as principais bactérias resistentes que urgentemente carecem de incentivos à pesquisa e ao desenvolvimento de novos antimicrobianos. De acordo com essa lista, as espécies de bactérias classificadas em estado crítico de prioridade são: *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* (resistência aos carbapenêmicos), *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Proteus* spp., *Providencia* spp. e *Morganella* spp. (resistência as cefalosporinas de 3ª geração) (WHO, 2017).

Nesta lista é evidenciada a prevalência de patógenos de categoria crítica, com resistência a antibióticos pertencentes a classe beta-lactâmicos. Para minimizar o impacto na saúde global e no meio ambiente, um regulamento disposto na RDC nº 222 da Anvisa em 2018 foi publicado recomendando que a descontaminação adequada e o correto descarte dos resíduos gerados da manipulação desses microrganismos, além da descontaminação adequada de ambientes hospitalares e laboratoriais, são medidas fundamentais para evitar a contaminação de efluentes e do meio ambiente (BRASIL, 2018).

Em suma, o aumento da resistência aos antibióticos é considerado uma das ameaças mais significativas à saúde global (WHO, 2020). Nesse sentido, práticas adequadas na manipulação de antimicrobianos são extremamente importantes para conter a RAM. As principais ações que contribuem para a contenção da RAM, de acordo com a Organização Pan-Americana da Saúde, são: prescrição adequada, educação comunitária, vigilância de resistências e infecções associadas à assistência à saúde e cumprimento da legislação sobre o uso e dispensação de antimicrobianos (OPAS, 2022).

1.3 CLASSIFICAÇÃO DOS ANTIMICROBIANOS

Os fármacos antimicrobianos podem ser divididos em aqueles obtidos de microrganismos, denominados de antibióticos, e os de origem sintética ou semissintética, chamados de quimioterápicos ou fármacos antimicrobianos sintéticos (MADIGAN et al., 2016; TIMENETSKY, 2017). A atividade antimicrobiana é denominada bactericida, quando mata os microrganismos, ou bacteriostática, quando inibe seu crescimento, sendo necessária a atuação do sistema imunitário para eliminação do microrganismo (MADIGAN et al., 2016).

Em 1928, o primeiro antibiótico descoberto, denominado penicilina, pertencia à classe dos beta-lactâmicos. O cientista responsável pela descoberta, Alexander Flemming, notou que o fungo *Penicillium notatum* produzia uma substância com ação antimicrobiana à cultura de estafilococos (FLEMING, 1929). A partir disso, iniciou-se a produção de antibióticos, e diversos outros antibióticos foram descobertos. Os antimicrobianos são um grupo diversificado de medicamentos classificados de acordo com sua estrutura química, mecanismo de ação, espectro de atividade ou origem. Existem aqueles denominados de largo espectro, que possuem atividade contra uma ampla gama de microrganismos, e os de curto espectro, que agem contra algumas espécies e grupos específicos de bactérias. Considerando a existência de diversos tipos de fármacos antimicrobianos, estes foram divididos em diferentes classes (Quadro 1), sendo os mais comumente utilizados: os beta-lactâmicos, quinolonas, tetraciclina, macrolídeos, sulfonamidas, aminoglicosídeos, entre outros (DAVIES et al., 2010).

Quadro 1: Classes de antimicrobianos e seus respectivos mecanismos de ação.

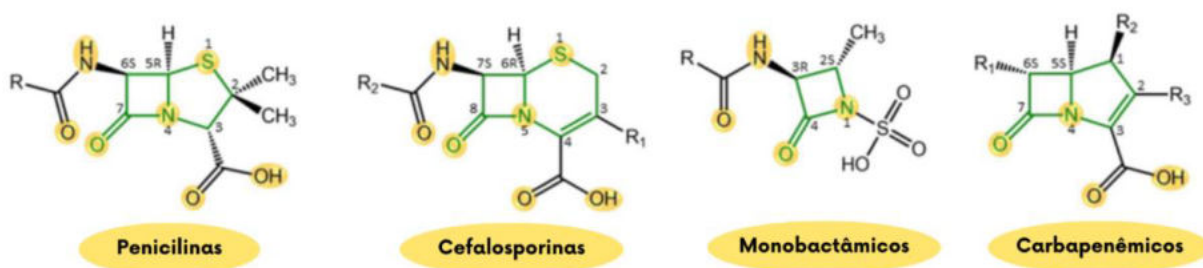
CLASSE	EXEMPLOS	MECANISMO DE AÇÃO
Beta-lactâmicos	penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos	Inibem a síntese da parede celular de peptideoglicano, fixando-se às proteínas de ligação de penicilinas (PBPs), impedindo a produção de peptideoglicano.
Sulfonamidas	sulfadiazina, sulfadoxina e sulfametizol	Inibem a síntese bacteriana de ácido fólico, essencial para a produção de ácidos nucleicos.
Aminoglicosídeos	amicacina, gentamicina, neomicina, plazomicina e estreptomicina	Inibem a síntese proteica, ligando-se à subunidade ribossomal 30S.
Macrolídeos	azitromicina, claritromicina e eritromicina	Inibem a síntese proteica, ligando-se à subunidade ribossomal 50S.
Tetraciclinas	minociclina, tetraciclina e doxiciclina	Inibem a síntese proteica, ligando-se à subunidade ribossomal 30S.
Quinolonas	ciprofloxacina, levofloxacina, moxifloxacina e norfloxacina	Inibem a síntese de DNA, ligando-se às enzimas DNA-girases.

Fonte: MADIGAN et al., 2016.

Os antibióticos beta-lactâmicos representam um dos grupos mais amplamente utilizados na medicina veterinária e humana (GRENNI et al., 2018). Os beta-lactâmicos são assim denominados por conterem um anel beta-lactâmico em sua estrutura química (Figura 2), sendo este anel o responsável pela inibição da síntese da parede celular de peptideoglicano nas bactérias. Os antibióticos beta-lactâmicos são subclassificados em: penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos (Figura 2). Exemplos de penicilinas são a oxacilina, amoxicilina, carbenicilina. Em comparação com as penicilinas, as cefalosporinas possuem

estrutura química semelhantes, mas apresentam menos riscos alérgicos (WERTH, 2022). As cefalosporinas atuam contra um amplo espectro de microrganismos, e ainda são agrupadas em quatro gerações, dependendo do seu espectro de atividade antibiótica. Cada geração possui um espectro mais amplo de atividade, como a cefalexina (1ª geração), ceftriaxona (3ª geração) e ceftazidima (4ª geração). Os monobactâmicos possuem eficácia limitada a bactérias Gram-negativas aeróbios, sem atividade contra bactérias Gram-positivas ou anaeróbios. Os carbapenêmicos, por outro lado, são antibióticos de amplo espectro eficazes contra uma ampla gama de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, incluindo bactérias anaeróbias. Esses medicamentos são considerados como últimos recursos para tratar infecções bacterianas resistentes a outros fármacos antibacterianos. Exemplos desse fármaco são o imipenem e o meropenem (MELO et al., 2012).

Figura 2- As quatro classes de fármacos antimicrobianos beta-lactâmicos. Estrutura central dos antibióticos beta-lactâmicos representada em verde em todas as estruturas.



Fonte: Adaptado de ZABISZAK et al., 2023.

As sulfonamidas foram os primeiros agentes quimioterápicos descobertos na década de 1930. Esses fármacos possuem ação contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, alguns fungos e protozoários, e atuam inibindo a síntese bacteriana de ácido fólico, essencial para a produção de ácidos nucleicos. Alguns exemplos incluem asulfadiazina, sulfadoxina e o sulfametizol (MELO et al., 2012).

Os aminoglicosídeos são comumente utilizados para o tratamento de graves infecções causadas por bactérias aeróbias Gram-negativas. Estes medicamentos apresentam baixo custo e baixo risco alérgico. Em razão de sua ototoxicidade e nefrotoxicidade, as doses desse antibiótico precisam ser bem definidas e o paciente deve ser monitorado durante o tratamento. Os aminoglicosídeos atuam inibindo a síntese proteica bacteriana a partir de sua ligação com as subunidades 30S do ribossomo, que são o alvo deste antimicrobiano na bactéria. Exemplos

de aminoglicosídeos são: amicacina, gentamicina, neomicina, plazomicina e estreptomicina (WERTH, 2022).

Os macrolídeos são antibióticos que inibem a síntese proteica da bactéria, mas diferentemente dos aminoglicosídeos, os macrolídeos ligam-se à subunidade ribossomal 50S. Eles fazem parte de um grupo chamado MLS (Macrolídeos, Lincosamidas e Streptogramina). Estes medicamentos são mal absorvidos por via oral, e incluem azitromicina, claritromicina, eritromicina, fidaxomicina. Esse grupo pode ser usado como alternativa para pacientes alérgicos aos beta-lactâmicos. Assim como os macrolídeos, as tetraciclinas também atuam inibindo a síntese proteica, e são utilizadas para o tratamento de infecções causadas por *Rickettsia*, *Chlamydia* e *Mycoplasma*, bem como variedades de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. Exemplos incluem, minociclina, tetraciclina e doxiciclina (WERTH, 2022).

As quinolonas são ativas contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, atuam inibindo a síntese de DNA bacteriano a partir de sua ligação em enzimas como DNA-girase, que participa do processo de replicação do DNA bacteriano. As quinolonas comuns incluem ciprofloxacina, levofloxacina, moxifloxacina e norfloxacina. No Quadro 1, estão listadas as classes de antibióticos aqui citados e seus respectivos mecanismos de ação (WERTH, 2022).

1.4 RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA (RAM) E MECANISMOS DE AÇÃO

Com o decorrer do tempo, o aumento do consumo e uso indiscriminado de antibióticos levou a um aumento no desenvolvimento da resistência antimicrobiana. Na década de 40, já houve o primeiro relato de resistência bacteriana contra a penicilina, a partir da enzima beta-lactamase AmpC, produzida pela *Escherichia coli* (ABRAHAM; CHAIN, 1940). No discurso de Alexander Flemming ao ganhar o prêmio Nobel de Medicina pela descoberta da penicilina ficou um alerta para o uso cauteloso dos antimicrobianos, pois em seus experimentos já era possível visualizar linhagens bacterianas resistentes aos antibióticos (FLEMING, 1945).

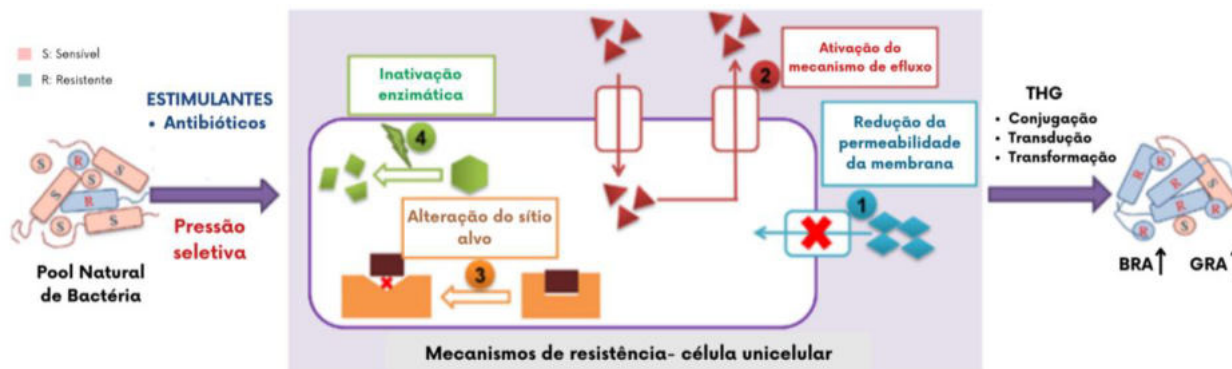
A RAM ocorre quando microrganismos se revelam indiferentes à ação dos fármacos antimicrobianos. A RAM se tornou um problema mundial crescente de saúde pública devido ao uso indiscriminado de antibióticos (OPAS, 2020). Esse tipo de resistência é alarmante, pois dificulta o tratamento de infecções causadas por microrganismos como fungos, bactérias, protozoários e vírus. Os ambientes nos quais quantidades consideráveis de antibióticos são manipuladas, tais como hospitais, indústrias e atividades veterinárias, funcionam como meios seletivos para as bactérias (REGITANO et al., 2010). Assim, como um mecanismo de defesa,

grande parte desses microrganismos desenvolvem estratégias que os tornam resistentes a uma ou mais classes de antibióticos.

O mecanismo de RAM apresenta características codificadas geneticamente, que podem ser intrínsecas ou adquiridas. A resistência intrínseca é caracterizada por ser um mecanismo em que a bactéria é naturalmente resistente a certos antibióticos, e esse gene é herdado por transferência vertical. Por outro lado, a resistência pode ser considerada adquirida quando ocorre da seguinte maneira: transferência horizontal de material genético ou de elementos genéticos móveis (plasmídeos, integrons, transposons, bacteriófagos), mutações da estrutura e fisiologia celular, ou ainda de uma associação de ambas (FORBES, 1998; CHAVARRÍA-BENCOMO, 2023). A transferência horizontal permite que genes de resistência possam mover-se entre bactérias que não estão filogeneticamente próximas. Isso pode ocorrer por meio de processos como conjugação, transformação ou transdução (MCINNIS, 2020).

A microbiota natural do ambiente sofre pressão seletiva por agentes antimicrobianos liberados neste ambiente. As células bacterianas resistentes apresentam alguns mecanismos que impedem a ação dos agentes antimicrobianos. Esses mecanismos são codificados por GRA que são disseminados para outras bactérias suscetíveis por transferência gênica horizontal. Em geral, quatro mecanismos são adotados pelas bactérias para combater o estresse antimicrobiano, tais como: alteração do sítio alvo, inativação enzimática, alteração da permeabilidade da membrana e mecanismo de efluxo (Figura 3). A alteração da permeabilidade da estrutura da membrana plasmática pode impedir a entrada do agente antimicrobiano. Essa alteração corresponde a modificações dos canais de porinas. A alteração do sítio alvo é a alteração do sítio específico de ligação dos antibióticos na bactéria. Esse mecanismo permite que haja uma diminuição na afinidade da droga pelo sítio específico e, conseqüentemente, uma redução da atividade do fármaco. Em relação à inativação enzimática, bactérias podem produzir enzimas, como as beta-lactamases, as quais modificam a estrutura da droga, inibindo ou neutralizando seu efeito antimicrobiano. Outro mecanismo de resistência é a bomba de efluxo, que está associada à propriedade de expulsar de forma ativa os antibióticos para o meio extracelular, promovendo uma inativação do antimicrobiano (ROSSI; ANDREAZZI, 2005).

Figura 3- Mecanismos de resistência a antimicrobianos adotados pelas bactérias resistentes a antimicrobianos.



BRA bactérias resistentes a antimicrobianos; GRA: genes de resistência a antibióticos; THG: transferência horizontal de genes
 Fonte: Adaptado de BOBATE et al., 2023.

Atualmente, os microrganismos resistentes têm ganhado atenção científica devido ao aumento das taxas de RAM, principalmente, na América Latina (OPAS, 2020). O grupo de antibióticos que tem atraído mais preocupação são os beta-lactâmicos, especialmente, imipenem e meropenem, que foram introduzidos em 1985. Durante anos, essa classe foi um dos agentes mais importantes para combater infecções causadas por cepas multirresistentes, porém, devido ao seu uso indiscriminado, sua efetividade terapêutica vem declinando de forma considerável (DIJKSHOORN et al., 2007; MARRA et al., 2011, TSE et al., 2018).

1.5 ENZIMAS BETA-LACTAMASES

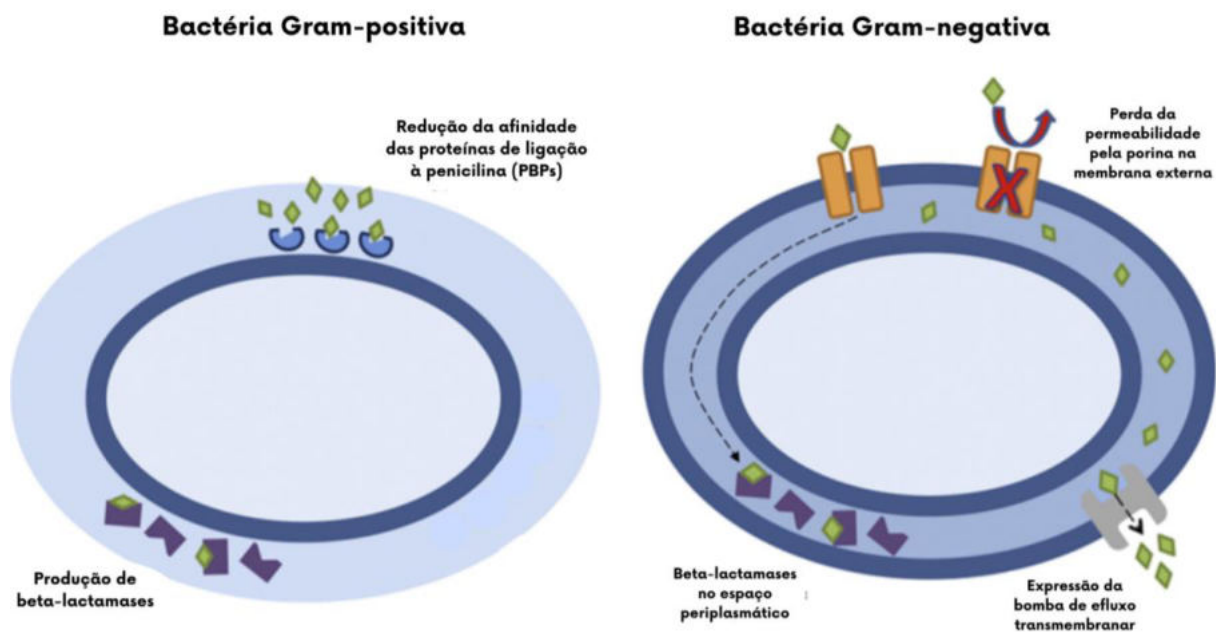
A resistência aos beta-lactâmicos pode surgir de diferentes mecanismos, incluindo a produção das enzimas beta-lactamases. As beta-lactamases podem estar presentes no compartimento extracelular de bactérias Gram-positivas (Figura 4), ou no espaço periplasmático em bactérias Gram-negativas (BUSH, 1988).

Em bactérias Gram-negativas o mecanismo predominante de resistência aos beta-lactâmicos é a síntese de enzimas beta-lactamases, em menor quantidade. Estas enzimas são retidas em pequena quantidade no espaço periplasmático (Figura 4) e a sua presença resulta na redução da permeabilidade da membrana externa (DELCOUR, 2009). Em contrapartida em bactérias Gram-positivas, existe a secreção de penicilinas no meio extracelular em grande quantidade (Figura 4). Este mecanismo resulta em modificações do alvo do agente antimicrobiano, as proteínas de ligação à penicilina (PBPs) (MUNITA; ARIAS, 2016). As PBPs são enzimas essenciais na síntese dos peptidoglicanos presentes na parede celular

bacteriana, e quando inibidas são gerados espaços na parede celular da célula em crescimento pelos quais a água entra e leva ao colapso por lise osmótica (KOHANSKI et al., 2010). Este tipo de mecanismo é geralmente relatado em isolados de *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA) (FERRER-BERGUA et al., 2022).

As enzimas beta-lactamases produzidas pelos microrganismos clivam o anel beta-lactâmico, modificando assim a estrutura do antimicrobiano, e inibem sua ligação efetiva às PBPs, o que permite a continuação da síntese da parede celular bacteriana (FORBES et al., 1998). Esse anel é o principal responsável pela atividade bactericida da droga, de modo que a sua destruição neutraliza a ação do fármaco. Além disso, as beta-lactamases podem apresentar diferentes espectros de atividade devido a sua variedade estrutural. A classificação tradicional das beta-lactamases foi proposta por Ambler, dividindo essas enzimas em quatro grupos: A, B, C e D. (AMBLER, 1980).

Figura 4- Principais mecanismos de resistência aos beta-lactâmicos em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.



Fonte: Adaptado de TANGA et al., 2014.

1.5.1 Beta-lactamases de Classe A de Ambler

Grande parte dos genes que codificam as beta-lactamases de classe A estão codificados nos plasmídeos bacterianos, podendo ser transferidos através da transferência horizontal. As enzimas desta classe podem ser de espectro estreito, de espectro estendido (ESBL) ou serina carbapenemases. Existe uma vasta gama de beta-lactamases de classe A que compreende as enzimas: TEM (temoneira) (CHEN et al., 2006; ENDIMIANI et al., 2007), SHV (*sulphydryl variable*) (NAAS et al., 2007), CTX-M (*cefotaxime hydrolyzing capabilities*) (NAGANO et al., 2004; POTRON et al., 2011) e KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) (ROBLEDO et al., 2010). Cerca de 90% das cepas de *Staphylococcus aureus* são produtoras de enzimas beta-lactamases de classe A (LACEY, 1984).

As beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) são principalmente produzidas pelos Gram-negativos dos gêneros *Klebsiella*, *Escherichia*, *Proteus*, *Enterobacter*, entre outros. Contudo os carbapenêmicos não são hidrolisados pelas ESBL, e são uma alternativa para essa situação. As serina carbapenemases podem inativar todos os beta-lactâmicos, inclusive os carbapenêmicos. Essas enzimas são produzidas principalmente em *Klebsiella pneumoniae*, denominada de enzima KPC (CUNHA, 2014).

1.5.2 Metallo-beta-lactamases de Classe B de Ambler

As metallo-beta-lactamases (MBL) pertencem a classe B de Ambler, com o diferencial das demais classes a presença de um metal em sua estrutura. Geralmente, o metal presente em sua estrutura é o átomo de zinco que participa da catálise sobre os anéis beta-lactâmicos. Os genes que codificam essas enzimas podem estar presentes em plasmídeos, integrons ou no cromossomo. Nesse grupo estão incluídas enzimas do tipo IMP (Imipenemase) e VIM (*Verona integron-encoded metallo-beta-lactamase*) em patógenos Gram-negativos como membros da *Enterobacteriaceae*, *P. aeruginosa* e *A. baumannii* (LARAKI et al., 1999). As bactérias que expressam MBL só não são resistentes aos monobactâmicos. Todavia, as bactérias multirresistentes que expressam tanto MBL quanto ESBL acabam neutralizando a ação de monobactâmicos. Um tipo de MBL descrito em surtos hospitalares no Brasil é a enzima SPM identificada a partir de uma cepa de *P. aeruginosa* resistente, responsável por causar infecção do trato urinário em paciente pediátrico internado no complexo do Hospital São Paulo (TOLEMAN et al., 2002). Os MBL são uma grande ameaça à saúde pública devido a restrição das opções de tratamento.

1.5.3 Beta-lactamases de classe C (AmpC)

As beta-lactamases de classe C são codificadas por genes presentes, normalmente, no cromossomo bacteriano. A principal enzima dessa classe é a cefalosporinase *AmpC*, que hidrolisa as penicilinas. Os carbapenêmicos podem ser uma alternativa por serem capazes de inativar essas enzimas (BUSH et al., 1995). Porém, muitas vezes, esses genes podem permanecer silenciados até que ocorra o contato com um antibiótico indutor, como ampicilina, amoxicilina, cefazolina. O grupo das bactérias que tradicionalmente apresentam esse gene é denominado de MYSPACE: *Morganella*, *Yersinia*, *Proteus*, *Providencia*, *Aeromonas*, *Citrobacter* e *Enterobacter* (BRASIL, 2020, p.114).

1.5.4 Beta-lactamases de classe D

As beta-lactamases de classe D são conhecidas como oxacilinases (OXA), e podem ser codificadas por genes localizados em plasmídeos ou no cromossomo bacteriano. As enzimas dessa classe constituem uma família bem extensa e o espectro de inibição pode ser extremamente variável. Assim, existem aquelas capazes de inibir a oxacilina e outras capazes de conferir resistência a todas as penicilinas e a maioria das cefalosporinas. Estas são chamadas de ESBL tipo *OXA* (*OXA-type ESBLs*) e as enzimas resistentes a carbapenêmicos são do tipo OXA (*OXA-type carbapenemases*). As enzimas mais comumente isoladas são OXA-23 e OXA-58, produzidas, normalmente, por *Acinetobacter baumannii*.

1.6 RESISTOMA E GENES DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS (GRA)

O resistoma de um microrganismo é uma parte de seu material genético que contém uma totalidade de genes de resistência a antimicrobiano. Especificamente, o conceito de resistoma refere-se ao conjunto de genes de um organismo ou ambiente, incluindo genes de bactérias patogênicas e não patogênicas, direta ou indiretamente associados à resistência a antibióticos (PERRY et al., 2014). Os genes que codificam a produção de enzimas beta-lactamases podem estar localizados no cromossomo bacteriano ou em plasmídeos. A mobilidade de genes pode ser ampliada por meio de transposons capazes de transportar genes codificadores de beta-lactamase dos plasmídeos até os cromossomos. Esta mobilidade é essencial na disseminação de GRA entre diversas comunidades bacterianas (WILLIAMS, 1999). Os GRA contidos no resistoma podem ser encontrados em vários ambientes, incluindo solo, água e nos microbiomas de humanos e animais (MCEWEN et al., 2017).

Os GRA não surgiram apenas devido ao uso de antibióticos na medicina, muitos destes genes existem na natureza há milhões de anos como parte dos mecanismos de defesa bacterianos. No entanto, o uso excessivo e indevido de antibióticos nos cuidados de saúde, na agricultura e na pecuária acelerou a propagação e seleção de genes de resistência aos antibióticos no ambiente e dificulta a contenção da RAM (AMINOV; MACKIE, 2007; PEREIRA et al., 2002). Ainda, existem poucos estudos que abordam a questão de GRA em amostras ambientais que, inclusive, podem explicar a origem dessas resistências (AMINOV; MACKIE, 2007).

Em decorrência da diversidade de GRA e do uso excessivo de uma grande variedade de antibióticos, desenvolveram-se GRA contra todas as classes de antibióticos. Além disso, algumas bactérias são capazes de adquirir um perfil de multirresistência, a qual é caracterizada pela resistência a mais de uma classe de antibióticos (SABINO et al., 2019). Em uma pesquisa prévia, foram detectados 754 GRA pertencentes a 10 classes diferentes de antibióticos na microbiota de animais ruminantes, sendo de maior predominância GRA contra beta-lactâmicos, glicopeptídeos, tetraciclina e aminoglicosídeos. Nesse mesmo estudo foi identificado GRA em todos os genomas da família *Enterobacteriaceae*, assim como em todas as espécies do gênero *Enterococcus* e entre cepas de *Staphylococcus epidermidis* (SABINO et al., 2019). A multirresistência ocorre, em geral, pelo acúmulo de genes de resistência em plasmídeos ou transposons, no qual cada gene codifica resistência a uma determinada classe antimicrobiana (NIKAIDO, 2010). As cepas bacterianas mais comumente constatadas com propriedades multirresistentes pertencem às espécies *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas* spp. e *Proteus* spp., que são potencialmente causadoras de graves infecções (BHARADWAJ et al., 2022; JUBEH et al., 2020; MBANGA et al., 2021).

De acordo com estudos recentes, os genes *tet A* e *tet E* que codificam bombas de efluxo à tetraciclina, em sua maioria estão presentes em *E. coli*. Além disso, a produção de beta-lactamase de Espectro Estendido (ESBL) pela expressão dos genes *bla TEM*, *bla SHV* ou *bla CTX-M* também podem ser encontradas em *E.coli* e entre membros da família *Enterobacteriaceae*. Os múltiplos genes em bactérias são frequentemente encontrados em resíduos hospitalares que, geralmente, apresentam bactérias Gram-negativas portadoras de genes *bla* como: *bla KPC*, *bla CTX-M* e *bla SHV*, acompanhados de gene *erm* (macrólido), *sul* (sulfonamidas) e *tet* (tetraciclina) (STACHUROVÁ et al., 2022; MORE et al., 2023). Investigações revelam que mesmo microrganismos geneticamente distintos, com diferentes

linhagens e dos mais variados tipos de suscetibilidade, apresentam GRA a diversos antimicrobianos (NETO et al., 2020).

Dessa forma, a resistência antimicrobiana (RAM) pode ser consequência tanto da liberação e descarte inapropriado de antibióticos no ambiente, quanto da presença de bactérias ambientais que abrigam GRA previamente existentes e disponíveis para serem transferidos no âmbito ambiental, animal e humano (AMINOV; MACKIE, 2007). O aumento da RAM faz com que seja necessário o desenvolvimento de novas opções terapêuticas (BRASIL, 2020, p.9). Logo, compreender os genes de resistência aos antibióticos associados a diversos ambientes é crucial porque sua presença pode representar implicações significativas para a saúde pública.

1.7 DISSEMINAÇÃO DE GRA EM CORPOS HÍDRICOS

As atividades antrópicas como a liberação de efluentes sem tratamento adequado e a pecuária são fatores que contribuem para a ocorrência de GRA em ambientes aquáticos. Dessa forma, os córregos e rios são vias propícias para a contaminação por antimicrobianos e disseminação dos GRA. Estudos já detectaram a presença de microrganismos com genes de resistência antimicrobiana nos ambientes aquáticos (BORTOLOTTI et al., 2018; REGINA et al., 2021; TAO et al., 2010; ROBERTO et al., 2019) e descreveram os efeitos dos antibióticos nos corpos hídricos (PEREIRA et al., 2002; PROIA et al., 2018; REGINA et al., 2021; SAVENKO e KRYVTSOVA, 2021), como a aquisição de resistência aos antibióticos pelos microrganismos presentes nesse reservatório ambiental por meio da transferência e incorporação de GRA. Como resultado dessa contaminação, há uma constante mudança na composição microbiana bem como a alteração no genoma bacteriano pela incorporação de GRA. Consequentemente, esses GRA podem estar presentes na água consumida e utilizada, o que torna essencial a realização do monitoramento e análises dessas comunidades microbianas.

A evolução progressiva de RAM é um indício para implementação de novos critérios de vigilância e controle da qualidade da água. Os padrões de potabilidade estabelecidos, de acordo com Brasil (2021), restringem a avaliação da qualidade da água a partir de critérios microbiológicos, como a presença de *E. coli* e coliformes termotolerantes, além de critérios físico-químicos. Embora o perfil de RAM não seja exigido para as amostras de água potável, tal informação é um fator crucial para determinar o risco de contaminação por bactérias multirresistentes, a fim de apresentar estratégias de manejo para reduzir e controlar a disseminação de RAM em águas doces.

1.7.1 Vias de disseminação de GRA

A pecuária é uma das principais atividades econômicas do Brasil no qual os antibióticos são amplamente utilizados para acelerar o crescimento animal e para o tratamento de doenças. O gado tratado com antibióticos elimina parte do resíduo do medicamento para o solo através de suas excretas, que posteriormente serão direcionadas para o ambiente aquático (AGA et al., 2003; BLACKWELL et al., 2009). Além disso, o esterco é usado como fertilizante na agricultura, podendo, assim, propagar as bactérias resistentes no meio. O uso inadequado do antibiótico em animais e plantas é um grande risco para o desenvolvimento de bactérias multirresistentes (WU et al., 2022).

Nas terras agrícolas, as liberações de resíduos de antibióticos de uma série de práticas agrícolas, que incluem o estrume animal, a reutilização de lamas de esgoto como fertilizantes e a irrigação com águas residuais recuperadas, aceleraram principalmente a ocorrência e prevalência da RAM (Figura 1). Na pesquisa de Wang et al. (2022) foi investigada a transferência de GRA no sistema solo-planta. Foi observado que cento e vinte táxons bacterianos eram compartilhados entre solos fertilizados com esterco e amostras de vegetais. Consequentemente, havia uma bioacumulação de BRA e GRA dentro dos compartimentos vegetais, representando, desta forma, graves ameaças à saúde pública e à segurança alimentar por meio do consumo direto de alimentos (MATAMOROS et al., 2022).

De acordo com a pesquisa de Van Boeckel e Ranya Mulchandani (2023) há uma estimativa que, até 2030, o mundo consumirá cerca de 107.500 toneladas de antibióticos por ano, voltados somente para pecuária. Nesse sentido, há um grande risco na saúde humana ao se tratar da contaminação de fontes de água doce, principalmente nascentes, em decorrência do cenário medicamentoso do gado presente em áreas rurais.

Além das fontes de contaminação provenientes da pecuária, a crescente urbanização contribuiu para liberação de efluentes nos rios, geralmente sem nenhum tratamento prévio (MOLISANI; ESTEVES, 2013). Os esgotos industriais, domésticos e hospitalares são compostos por uma variedade de elementos tóxicos capazes de alterar a qualidade da água e, consequentemente, os padrões de saúde da população que a consome. Essas águas residuais de diversas origens possuem inúmeros poluentes como metais, compostos inorgânicos e orgânicos, microrganismos patogênicos, nutrientes e resíduos de medicamentos, sendo um ambiente propício para a proliferação da RAM. O despejo inadequado desses efluentes pode causar a eutrofização e poluição de rios e córregos, acarretando o processo de anóxia do ambiente pelo aumento da atividade bacteriana (MOLISANI; ESTEVES, 2013; CHOWDHURY et al., 2016; KASSIM et al., 2022). Com o aumento da atividade bacteriana no meio, o GRA pode ser

transferido para os descendentes ou para bactérias taxonomicamente distintas. Quatro ou mais GRA (*int 1*, *bla-TEM*, *tetA*, *sul 1* e *qnr B*) foram detectados em mais de 80% dos isolados de amostras coletadas em três estações de tratamento de esgoto no estado de Minas Gerais (MACHADO et al., 2023). A literatura mostra também que o consumo de alimentos irrigados com a reutilização de águas residuais tratadas oferece grande risco à saúde, principalmente pela presença de patógenos, microrganismos resistentes a antimicrobianos e metais pesados que se impregnam no alimento (PEDRERO et al., 2010).

Além disso, os hospitais são considerados verdadeiros *hotspots* para o desenvolvimento da RAM por conta do alto consumo de antimicrobianos, desempenhando um papel importante na disseminação de GRA (HOCQUET et al., 2016). Nessas condições, as águas residuais hospitalares tendem a concentrar uma quantidade elevada de GRA (LÉPESOVÁ et al., 2020). E ainda, o cenário pode ser agravado quando o hospital lança seus efluentes, sem tratamento prévio, diretamente em estações de tratamento de água ou ainda em corpos hídricos (ZAGUI et al., 2023). Pesquisas relatam uma alta incidência de bactérias intestinais humanas, como *Escherichia coli*, portadoras de ESBL em ambientes hospitalares (CARBONNE et al., 2013). Outras bactérias resistentes, que estão presentes no WHO-PPL Global, também tem sido cada vez mais relatadas em hospitais, como *Klebsiella pneumoniae* e *Acinetobacter baumannii* (PEREZ et al., 2020; OTTER et al., 2017; AMARSY et al., 2021).

1.8 A BACIA HIDROGRÁFICA DO RIO MACAÉ COMO POTENCIAL RESERVATÓRIO DE GRA

A bacia hidrográfica do Rio Macaé é uma importante fonte de água que provê importantes serviços ecossistêmicos e econômicos vinculados a atividades de agricultura, pecuária, turismo, produção agrícola, geração de energia e abastecimento da cidade, além da sua diversidade de fauna e flora (FREITAS, 2015).

A cidade de Macaé é uma das principais bases operacionais de exploração *offshore* de petróleo e gás na Bacia de Campos, que contribuem para a geração de riqueza do Estado do Rio de Janeiro. Essa atividade econômica atraiu investimentos para o município, porém culminou em um crescimento demográfico desordenado. A partir de então, Macaé tem sido alvo da ocupação irregular e da carência de estruturas de saneamento e tratamento de resíduos que causam a poluição e contaminação ambiental. Sendo assim, o uso intensivo e o descarte inadequado de antibióticos no âmbito doméstico ou hospitalar, associado a presença de atividades pecuárias na região, podem estar contribuindo para formação de microrganismos multirresistentes incrementados e disseminados nas águas do Rio Macaé.

O estudo aqui descrito concentra-se em uma família de genes que codificam resistência a antibióticos beta-lactâmicos. Como os beta-lactâmicos representam aproximadamente dois terços, em peso, de todos os antibióticos administrados principalmente em humanos (LACHMAYR, 2007), então, possivelmente essa classe estará presente nas águas do Rio Macaé. Sendo assim, esse trabalho tem como hipótese que genes de resistência a beta-lactâmicos estão presentes no Rio Macaé e seus afluentes. A caracterização de GRA de um ecossistema permite expandir as noções do potencial impacto da disseminação de microrganismos resistentes no local, com consequências críticas à saúde humana, animal e ambiental. A partir desse conhecimento, a elaboração de políticas públicas de prevenção e conscientização contra a RAM se tornam mais viáveis.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Esse projeto tem como objetivo detectar GRA da classe dos beta-lactâmicos no DNA de microrganismos presentes em amostras de água da bacia hidrográfica do Rio Macaé.

2.2 Objetivos Específicos

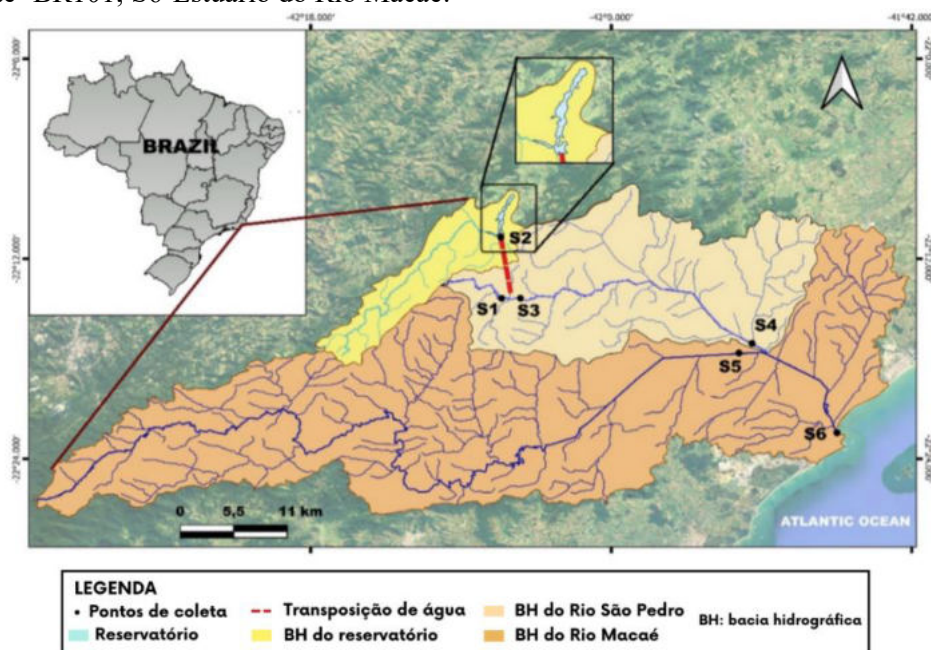
- Avaliar o perfil de genes de resistência a beta-lactâmicos da Represa de Tapera, do Rio São Pedro e do Rio Macaé por PCR;
- Comparar as análises das amostras coletadas no período seco e chuvoso.
- Caracterizar o perfil de RAM desse ecossistema referente a essa classe de antibiótico.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ÁREA DE ESTUDO

A bacia hidrográfica do Rio Macaé está localizada no Estado do Rio de Janeiro e abrange os municípios fluminenses de Nova Friburgo, Casimiro de Abreu, Rio das Ostras, Conceição de Macabu, Carapebus e Macaé. A sua área de drenagem compreende 1.765 km², sendo que 82% estão no município de Macaé. O curso de suas águas se estende cerca de 136 km com sua nascente acima de 1560 m de elevação no município de Nova Friburgo. Na porção inferior, o rio deságua no oceano Atlântico por meio do estuário situado na região urbanizada de Macaé, que recebe efluentes de grande parte da cidade, inclusive esgoto não tratado. A área de estudo situa-se no sistema de transposição dos rios Macabu e São Pedro, na Região Serrana de Macaé (Figura 5). O alto curso da bacia do Rio Macabu abrange parcialmente o município de Trajano de Moraes e se desenvolve formando a Represa de Tapera com 120 km² de área e 30 km de extensão. Suas águas deságuam no alto curso do Rio São Pedro devido ao sistema de transposição por um túnel subterrâneo com aproximadamente 4,9 km de comprimento. Assim, o Rio Macabu serve como ambiente doador e o Rio São Pedro como bacia receptora. A sub-bacia hidrográfica do Rio São Pedro, com 490 km² de área e 50 km de extensão, é integrada à bacia hidrográfica do Rio Macaé no baixo curso, sendo considerado um dos principais afluentes do Rio Macaé.

Figura 5: Mapa de localização do sistema de transposição Macabu/São Pedro e dos pontos de amostragem. S1- São Pedro Alto Curso (pré-transposição); S2- Represa de Tapera/desvio de água; S3- confluência da água de desvio com o Rio São Pedro; S4- Rio São Pedro- BR101 (pós-transposição); S5- Rio Macaé- BR101; S6- Estuário do Rio Macaé.



Fonte: Adaptado de BENASSULY, 2023.

3.2 COLETA DAS AMOSTRAS DE ÁGUA DO RIO MACAÉ

As amostras de água utilizadas para este estudo foram coletadas durante o período seco em outubro de 2021 e no período chuvoso em março de 2022, ao longo do sistema de transposição do Rio São Pedro até a foz do Rio Macaé (Figura 5). Ao todo foram 6 pontos de coleta: montante da descarga do sistema de transposição no Rio São Pedro (S1), Represa de Tapera (S2), jusante da descarga do sistema de transposição no Rio São Pedro (S3), Rio São Pedro-BR101 (S4), Rio Macaé-BR101(S5), estuário do Rio Macaé (S6). Os pontos em que foram coletadas amostras na Represa de Tapera (ponto S2) são próximos do barramento, da casa de máquinas e a jusante da confluência do Rio Macabu (Figura 5). Próximo ao local de amostragem (S2) da Represa de Tapera (Figura 5), no município de Trajano de Moraes, existe um centro de saúde (posto PSF Tapera), indicado na Figura 6. A área rural corresponde aos seguintes pontos de coleta: São Pedro Alto Curso (S1); Represa de Tapera (S2); confluência da água de desvio com o Rio São Pedro (S3); Rio São Pedro- BR101 pós-transposição (S4) e Rio Macaé- BR101 (S5). Somente o ponto S6 (estuário do Rio Macaé) pertence a área urbana.

As amostras foram coletadas em duas estações (seca e chuvosa), de forma estéril e em triplicata, em frascos de vidro transparente esterilizada, com boca larga, e com tampa de plástico esmerilhada, bem ajustada, com capacidade de 1000 mL, previamente autoclavados. Essas amostras foram armazenadas em isopor com gelo e transportadas até o Laboratório Integrado de Microbiologia e Bioprocessos do Instituto de Biodiversidade e Sustentabilidade (NUPEM/UFRJ).

Figura 6: Centro de saúde PSF Tapera no município Trajano de Moraes, próximo a Represa de Tapera.



Fonte: Adaptado de GOOGLE EARTH, 2024.

3.3 EXTRAÇÃO DO DNA MICROBIANO TOTAL DAS AMOSTRAS DE ÁGUA

Para a concentração da biomassa microbiana, cerca de 500 mL de amostra de água foi filtrada com auxílio de uma bomba de vácuo, utilizando sistema de filtração em polisulfona esterilizado (Nalgene®) com filtros de poros de 0,22 µm. Posteriormente, os filtros foram submetidos a extração do DNA, com auxílio do kit DNeasy PowerSoil® (QIAGEN, Hilden, Alemanha), composta pelas etapas de: adição da solução CD1 para o preparo da amostra; lise das células; remoção de inibidores, etapa em que é adicionado a solução CD2; ligação do DNA na coluna, nesta etapa é adicionado a solução CD3; lavagem com solução EA e solução C5; eluição do DNA. As concentrações de DNA em ng/uL de cada amostra foram quantificadas por fluorimetria com o auxílio do equipamento Qubit™2.0® (Life Technologies, EUA), utilizando o kit *Qubit dsDNA HS assay kit®* (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific), de acordo com as instruções do fabricante.

3.4 MICRORGANISMOS UTILIZADOS COMO CONTROLES POSITIVOS

Estirpes previamente isoladas e caracterizadas quanto a presença de genes de resistência antimicrobiana foram cedidas por dois laboratórios do Departamento de Microbiologia Médica do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes (UFRJ), conforme descrito no Quadro 2. Os estoques das culturas bacterianas foram transferidos para o ágar BHI (*Kasvi*, Itália) inclinado e posteriormente as bactérias foram isoladas em placas contendo ágar BHI pelo método de

esgotamento, a fim de verificar a pureza das cepas. As placas foram incubadas a 37 °C/24h e as colônias isoladas foram transferidas para o caldo BHI (*Kasvi*, Itália) e incubadas por aproximadamente 12 horas a 37 °C. Após o crescimento das culturas puras, 1 mL do cultivo foi centrifugado a 16.000 xg por 5 minutos e o precipitado utilizado para extração de DNA, com auxílio do kit *Wizard® Genomic DNA Purification* (PROMEGA, USA), compostas por três etapas: lise das células, precipitação da proteína, precipitação do DNA e reidratação. Para a extração de DNA de *Staphylococcus aureus* as células foram suspensas em 480 µl 50mM de EDTA, e tratadas com as enzimas lisoizima e lisostafina, seguindo as instruções do fabricante. O DNA genômico dos microrganismos foi quantificado no fluorômetro Qubit™2.0® (Life Technologies, EUA) e armazenado a -20 °C até o momento do uso.

Quadro 2: Microrganismos resistentes aos beta-lactâmicos, utilizados como controle positivo no presente estudo.

Gene alvo	Estirpes resistentes
<i>blaCTX-M</i> , <i>blaKPC</i> , <i>blaSHV</i> , <i>blaTEM</i>	<i>Klebsiella pneumoniae SHV KP13</i>
<i>blaOXA-23</i> , <i>blaOXA-51</i>	<i>Acinetobacter baumannii OXA-23</i>
<i>blaSPM-1</i> , <i>ampC</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa SPM</i> , <i>am+D</i>
<i>blaZ</i> , <i>mecA</i>	<i>Staphylococcus aureus mecA+33591</i>

3.5 AMPLIFICAÇÃO DE GRA POR PCR

Os marcadores genéticos de resistência antimicrobiana (GRA) foram amplificados usando oligonucleotídeos iniciadores (primers) específicos a classe dos beta-lactâmicos, de acordo com o Quadro 3. Um total de 10 pares de primers foram selecionados para o estudo, de forma a pesquisar a classe dos beta-lactâmicos (MOZAZ et al., 2015; REGINA et al., 2021). A amplificação foi realizada em um termociclador automatizado *MyCycler™ Thermal Cycler System* (BIO-RAD, USA). O programa básico das reações de PCR consistiu em 1 etapa de 95 °C por 5 minutos; 25 ciclos de desnaturação a 95 °C com 30 segundos cada, seguida da etapa de anelamento que foi realizada em função das características de cada par de primer (Quadro 3). Posteriormente, foi adicionado a etapa de extensão a 72 °C por 30 segundos, finalizando com a extensão final a 72 °C por 5 minutos.

A concentração final dos reagentes para a reação de PCR, em um volume final de 25 µL foi constituída de 1 µL de DNA da amostra alvo (~10 ng/ µL), 0,2 µM de cada primer, 0,2 mM dNTP (*Sinapse inc*), 2,0 mM MgCl₂ (*Promega®*), 0,625 U Taq polimerase (*GoTaq® G2 Flexi DNA Polymerase Promega®*), 1x Buffer Taq DNA polimerase *Promega®*, conforme

instruções do fabricante. As triplicatas das amostras de água de cada ponto de coleta foram unidas para obter um volume maior de DNA total, que foi utilizado como DNA molde para pesquisa dos genes listados no Quadro 3 por PCR.

Quadro 3: Características dos primers selecionados para amplificação dos marcadores genéticos de resistência a beta-lactâmicos nas amostras de água do Rio Macaé.

Gene alvo Resistência Beta- lactâmicos	Primers (5'-3')		Tamanho Amplicon (pb)	Temperatura de Anelamento (°C)	Referência
	Oligonucleotídeo senso	Oligonucleotídeo antisense			
blaCTX-M	ATG TGC AGY ACC AGT AAA G	GGT CAC CAG AAG GAG C	562	56	Jones et al., 2009
blaKPC	ATG TCA CTG TAT CGC CGT CT	TTT TCA GAG CCT TAC TGC CC	892	56	Jones et al., 2009
blaSHV	CTT TAC TCG CCT TTA TCG GC	TTA CCG ACC GGC ATC TTT CC	982	56	Jones et al., 2009
blaTEM	GTG CGC GGA ACC CCT ATT	TTA CCA ATG CTT AAT CAG TGA GGC	968	56	Jones et al., 2009
blaOXA-23	GAT CGG ATT GGA GAA CCA GA	ATT TCT GAC CGC ATT TCC AT	501	52	Woodford et al., 2006
blaOXA-51	TAA TGC TTT GAT CGG CCT TG	TGG ATT GCA CTT CAT CTT GG	353	52	Woodford et al., 2006
blaZ	ACT TCA ACA CCT GCT GCT TTC	TGA CCA CTT TTA TCA GCA ACC	173	55	Martineu et al., 2000
ampC	CTG TTC GAG ATC GGC TC	CGG TAT AGG TCG CGA G	166	60	Xavier et al., 2010
blaSPM-1	CCT ACA ATC TAA CGG CGA CC	TCG CCG TGT CCA GGT ATA AC	649	40	Gales et al., 2003
mecA	GTA GAA ATG ACT GAA CGT CCG ATA A	ACCA ATT CCA CAT TGT TTC GGT CTA A	310	58	Zhang et al., 2004

3.6 DETECÇÃO DOS PRODUTOS DA PCR AMPLIFICADOS

Após a amplificação por PCR, os produtos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% (K9-9100 Kasvi), em tampão 0,5× Tris/ Ácido Acético /EDTA (TAE). A eletroforese foi realizada utilizando-se o equipamento *Mini-Run Gel Electrophoresis System Bioer (GE-100)*. Foram aplicados 2 µL de Safer Dye (1 mL K9-16C Kasvi) e 5 µL dos produtos da PCR no gel de agarose. Em seguida, o perfil de bandas de DNA amplificado foi visualizado com o auxílio de um transiluminador de luz ultravioleta (*LED Transilluminator BK-001 Kasvi*). O padrão de peso molecular comercial (100 pb DNA ladder, *Promega®*) foi utilizado como referência para a comparação dos tamanhos dos fragmentos amplificados obtidos de GRA. O branco foi produzido a partir de reações de PCR sem o DNA molde.

4 RESULTADOS

4.1 OBTENÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO DNA TOTAL

As amostras do DNA extraído foram quantificadas e no período chuvoso de março de 2022 variaram de 1,07 a 65,6 ng/μL, enquanto que, no período seco de outubro de 2021, a variação foi de 0,344 a 14,8 ng/μL, conforme mostra a Tabela 1.

Tabela 1: Quantificação de DNA microbiano total presente nas triplicatas de amostra de água da bacia hidrográfica do Rio Macaé, coletadas no período seco e chuvoso.

Quantificação DNA (ng/μL)		
Amostras	Período Seco	Período Chuvoso
S1.1	0,382	1,07
S1.2	N/D	N/D
S1.3	0,344	N/D
S2.1	7,92	25,6
S2.2	14,8	31,2
S2.3	14,3	30,6
S3.1	2,04	12,4
S3.2	7,34	15,5
S3.3	1,91	11,5
S4.1	5,74	2,58
S4.2	3,38	5,4
S4.3	3,40	4,52
S5.1	4,10	9,9
S5.2	2,96	10,2
S5.3	3,30	7,26
S6.1	10,6	52,4
S6.2	10,7	65,4
S6.3	9,78	65,6

^{S1} São Pedro Alto Curso (pré-transposição); ^{S2}Represa de Tapera/desvio de água; ^{S3}Confluência da água de desvio com o Rio São Pedro; ^{S4}São Pedro baixo curso BR 101(pós-transposição); ^{S5}Macaé baixo curso BR 101; ^{S6}Estuário do Rio Macaé; N/D: não detectado.

Foi possível observar que as quantificações do DNA microbiano extraído das amostras S2 em ambas as estações foram baixas devido ao ponto de coleta estar localizado no alto curso, onde provavelmente há menos impacto antrópico na água e consequentemente menor carga microbiana. Da mesma forma, os pontos localizados em áreas mais urbanizadas, com maior influência antrópica, há valores maiores da quantificação de DNA, como na amostra do ponto S6.

4.2 ANÁLISE DA PRESENÇA DE GRA DA CLASSE DOS BETA-LACTÂMICOS

Na Tabela 2 e na Figura 6 é apresentado o resultado da amplificação dos genes de resistência aos beta-lactâmicos. Três dos dez genes selecionados e analisados foram detectados em quatro pontos de amostragem distintos, o que corresponde a 30% dos genes pesquisados no estudo (Tabela 2 e Figura 6). Entre os beta-lactâmicos, apenas *bla-KPC* e *bla-TEM* foram encontrados em duas estações (Tabela 2). O gene *bla-KPC* foi detectado no ponto S6 tanto no período seco quanto no período chuvoso. O ponto S6 representa o estuário, e foi o ponto que apresentou mais genes de resistência, com 43% de prevalência (Tabela 2). O gene *bla-TEM* foi detectado em quatro amostras, duas da estação seca e duas da estação chuvosa (Tabela 2). É importante destacar que *bla-TEM* foi detectado na represa de Tapera (ponto S2) durante as duas estações, e na pré (S1) e pós-transposição (S3) do Rio São Pedro (S1), durante as estações chuvosa e seca. O gene *bla-SHV* foi detectado apenas no estuário (ponto S6) no período chuvoso.

Tabela 2: Presença dos GRA beta-lactâmicos nas amostras de água dos diferentes pontos da bacia hidrográfica de Macaé.

Genes alvo	Pontos de coleta/estação												Total	
	S1*		S2		S3		S4		S5		S6			
	D**	W	D	W	D	W	D	W	D	W	D	W		
blaCTX-M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	
blaKPC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	2
blaSHV	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	1
blaTEM	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	4
blaOXA-23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
blaOXA-51	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
blaZ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
ampC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
blaSPM-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
mecA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Total	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	2	7
GRA por local (%)	14		29		14		0		0		43		100	

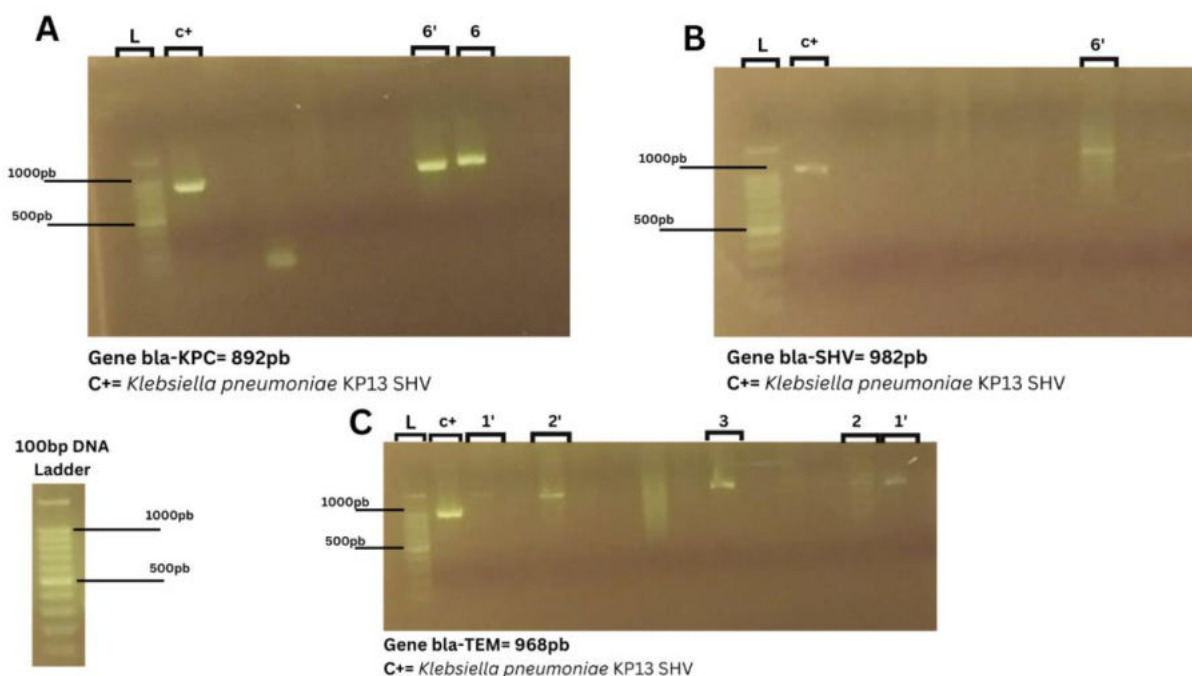
*Pontos: S1- São Pedro Alto Curso (pré-transposição); S2- Represa de Tapera/desvio de água; S3- confluência da água de desvio com o Rio São Pedro; S4-Rio São Pedro- BR101 (pós-transposição); S5-Rio Macaé- BR101; S6-Estuário do Rio Macaé; **Períodos: D- seco e W – chuvoso; +: detectado; -: não detectado.

Os pontos que apresentaram maior prevalência de detecção de GRA, independente da estação coletada, foi o ponto S6 relativo ao estuário, seguido pela represa de Tapera (S2), com 43% e 29%, respectivamente (Tabela 2). As porcentagens foram calculadas considerando a detecção total de gene em um ponto de coleta pela detecção total de genes em todos os pontos (sete detecções totais, Tabela 2). Com relação ao período de coleta, a incidência de GRA foi

um pouco maior para o período chuvoso (57%), com quatro amostras positivas, seguido pelo período seco no qual foram detectadas três amostras, representando 43% do total de genes resistentes a beta-lactâmicos detectados.

Os resultados da amplificação dos GRA no gel de agarose estão ilustrados na Figura 6. O gene *bla-KPC* foi detectado no estuário (ponto S6) em ambas as estações (Tabela 2). O gene *bla-SHV* foi identificado apenas no ponto S6 durante o período chuvoso. E o gene *bla-TEM* esteve presente no ponto S1(pré-transposição) na estação chuvosa, na represa em ambas as estações, e no ponto de confluência no período seco (ponto S3) (Figura 6).

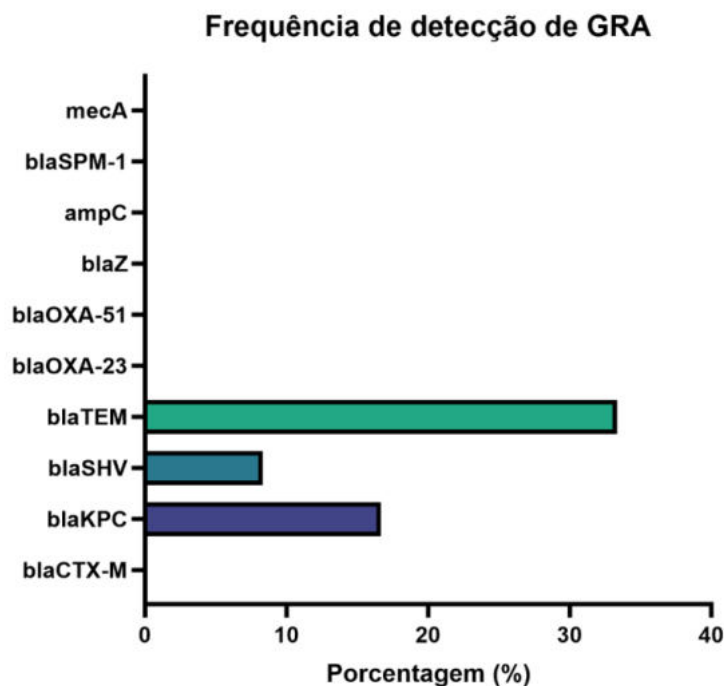
Figura 7: Gel de agarose mostrando produtos amplificados por PCR de GRA selecionados.



L: padrão de DNA de 100 pb; c+: controle positivo; 1': pré-transposição no período chuvoso; 2 e 2': represa nos períodos seco e chuvoso, respectivamente; 3: confluência no período seco; 6 e 6': estuário no período seco e chuvoso, respectivamente. (A) Gene *bla-KPC* (tamanho do fragmento esperado de 892 pb). (B) Gene *bla-SHV* (fragmento esperado de 982 pb). (C) Gene *bla-TEM* (fragmento esperado de 968 pb).

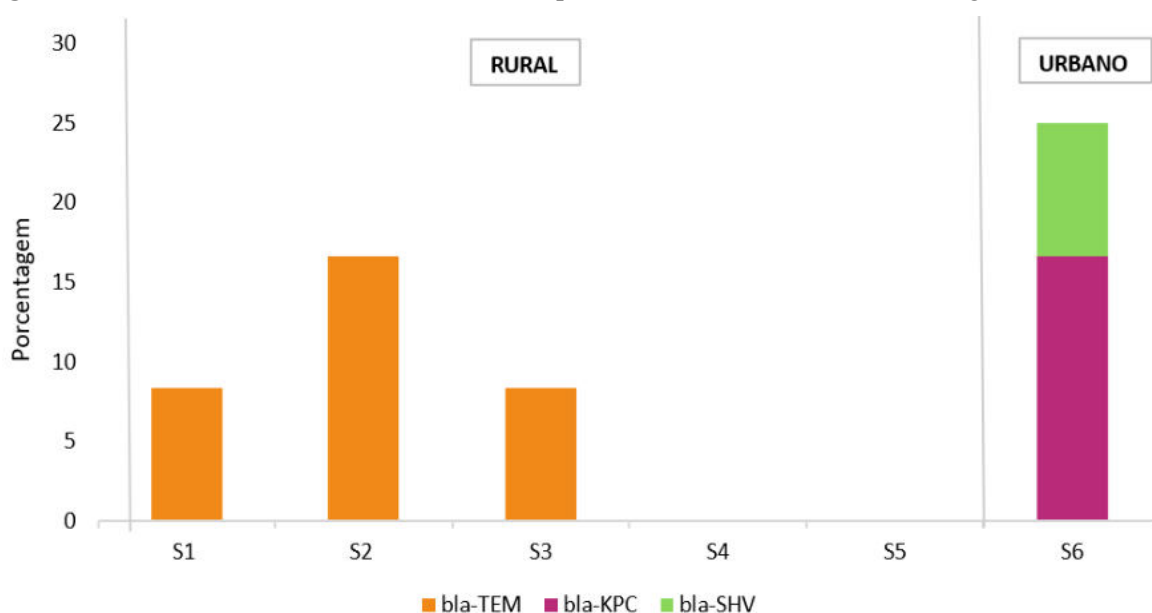
Em 50% das 12 amostras totais coletadas, pelo menos um gene de resistência a beta-lactâmicos foi identificado. Dentre todos os 10 GRA investigados no estudo, houve uma frequência de detecção de 33,3%, 16,7% e 8,3 % para os genes *bla-KPC*, *bla-SHV* e *bla-TEM*, respectivamente para as 12 amostras analisadas (Figura 7). O gene *bla-TEM* foi comum para três pontos (quatro amostras), mas nenhum marcador genético foi comum a todas as amostras.

Figura 8: Frequência de detecção de genes de resistência a beta-lactâmicos estudados.



As amostras coletadas na área urbana do rio apresentaram maior número de GRA, sendo dois marcadores genéticos exclusivos dessas áreas (Figura 8). Em áreas rurais, apenas o gene *bla-TEM* foi exclusivo desta área (Figura 8). Além disso, é importante destacar a presença deste gene (*bla-TEM*) que codifica uma ESBL no ponto 1 do período chuvoso, localizada perto da nascente do rio.

Figura 9: Perfil de ocorrência de GRA entre os pontos de coleta das amostras de água do Rio Macaé.



Pontos: S1- São Pedro Alto Curso (pré-transposição); S2- Represa de Tapera/desvio de água; S3- confluência da água de desvio com o Rio São Pedro; S4-Rio São Pedro- BR101 (pós-transposição); S5-Rio Macaé- BR101; S6-Estuário do Rio Macaé.

5 DISCUSSÃO

Os rios, lagos e córregos representam uma fração essencial da água doce disponível para consumo humano e animal, e sua preservação e qualidade é indispensável quando se trata do conceito *One Health*. Os antibióticos beta-lactâmicos já foram detectados em rios e lagos asiáticos e sua presença foi atribuída principalmente ao lançamento de resíduos domésticos, industriais e agrícolas nestes locais (ANA et al., 2021). Neste estudo, também caracterizamos e detectamos um perfil de resistência aos beta-lactâmicos, ao longo da bacia hidrográfica do Rio Macaé. É importante ressaltar que os resultados desse estudo são baseados em genes contidos no material genético e vale lembrar que, a expressão desses GRA não está necessariamente ligada à detecção do gene amplificado.

Estudos anteriores baseando-se em análises fenotípicas de beta-lactâmicos detectaram prevalência de isolados de *Enterobacteriaceae* produtores de ESBL em amostras fecais, de alimento e de pacientes com doenças infecciosas (MESA et al., 2006). Em amostras de águas de poços rurais, estudos também mostraram a prevalência de *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBL (ZHANG et al., 2015). Entretanto, a desvantagem de um estudo baseado apenas no fenótipo de resistência é que não é possível caracterizar o mecanismo de resistência associado ao fenótipo. Por exemplo, a avaliação fenotípica aos beta-lactâmicos não possibilita distinguir se o mecanismo é mediado por enzimas beta-lactamases ou mediada por proteínas de ligação à penicilina (PBPs). Nesse sentido, o estudo não seria eficaz para auxílio ao tratamento clínico, uma vez que mecanismos diferentes implicam em tratamentos diferentes (U.S, 1995).

O Rio Macaé tem o uso e ocupação do solo associado a áreas de pastagens, agrícolas, urbanização, fragmentos florestais, áreas inundáveis entre outros (MOLISANI et al., 2019). O índice de qualidade da água em diversos pontos pode estar relacionado às atividades potencialmente poluidoras predominantes na área, e à falta de proteção vegetal e de barreiras no entorno de suas nascentes. Nesse cenário, o crescimento econômico e populacional de Macaé intensificou os processos de contaminação do recurso hídrico e, consequentemente, provável desenvolvimento de microrganismos resistentes a antimicrobianos, presentes nas águas residuais lançadas no Rio Macaé.

Entre os três marcadores de resistência encontrados nos locais amostrados, estão genes que codificam beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) (*bla-SHV*, *bla-TEM*) e carbapenemases (*bla-KPC*). Tanto bactérias patogênicas quanto não patogênicas são capazes de codificar essas enzimas, sendo que a expressão desses genes é induzida pela exposição dos

genes a um antibiótico que contenha um anel beta-lactâmico em sua estrutura química (UR-RAHMAN et al., 2018). Estudos recentes também investigaram a disseminação de GRA em águas residuais e monitoraram a presença de cepas multirresistentes nos locais estudados (STACHUROVÁ et al., 2022; ZAGUI et al., 2023). Stachurová et al. (2022) evidenciaram presença de bactérias resistentes a ampicilina e cepas multirresistentes isoladas em águas residuais e de um reservatório de água na República Tcheca, mostrando uma abundância relativa dos genes *bla-TEM*, *blaNDM-1* e *vanA* no inverno. Além disso, o gene *bla-TEM* foi abundante na água da represa, mostrando uma ocorrência massiva deste gene na maioria das bactérias ambientais, assim como encontrado em nosso estudo para amostras da área rural (S1, S2, S3, S4 e S5).

A dispersão de marcadores genéticos de resistência aos beta-lactâmicos em amostras da bacia hidrográfica do Rio Macaé também pode ser explicada pela transferência horizontal de GRA. A transferência horizontal permite que microrganismos que nunca tiveram contato com antimicrobianos adquiram os GRA. Sendo assim, muitos microrganismos presentes em ecossistemas aquáticos podem já ter apresentado o genótipo de resistência, sem ter apresentado o fenótipo. E com o descarte incorreto de antibióticos, esses microrganismos passariam a ter contato com a droga antimicrobiana, com consequente expressão do caráter de resistência bacteriana (BAQUERO et al., 2008). Nesse sentido, a rápida expansão da atividade humana, como a prática de lançamento de efluentes hospitalares e domésticos, áreas de pastagens e agrícolas presentes na região de Macaé, pode exacerbar os riscos para a saúde humana induzidos por GRA.

O estuário de Macaé recebe resíduos de diversas origens e neste ponto amostral foi possível detectar a presença do gene *bla-SHV* e *bla-KPC*. Possivelmente o estuário está sendo alvo de contaminação por antibiótico, assim como na área rural do rio, onde foi detectado apenas o gene *bla-TEM* (Figura 7). A diferença da diversidade de GRA entre as áreas ainda precisa ser melhor caracterizada por meio da seleção e análise de outros marcadores genéticos. Porém, em um estudo realizado na bacia hidrográfica no sudeste da China foi observado que tanto a variedade quanto a abundância de GRA nas águas aumentaram das regiões rurais para as urbanas (PENG et al., 2020). Neste estudo, os autores compararam os GRA presentes a montante e a médio rio, e concluíram que o número e a diversidade de GRA foram significativamente maiores nas águas a jusante. Outros estudos também mostraram que as diversidades de GRA seriam altas em regiões sob condições urbanas dominadas pelo homem com maior densidade populacional (ZHANG et al., 2015). As atividades antropogênicas que podem levar à liberação de

antibióticos e consequentemente a evolução e propagação de GRA no ambiente aquático incluem o tratamento abusivo com antimicrobianos, escoamentos agrícolas e descargas de águas residuais urbanas tratadas ou não tratadas (PENG et al., 2020).

Sendo assim, a maior prevalência de GRA no estuário do Rio Macaé (ponto S6) pode estar relacionada ao lançamento de esgoto não tratado, bem como o descarte incorreto de antibiótico na foz do Rio Macaé. De fato, há uma prevalência de GRA em áreas com maior impacto antrópico do que em áreas menos urbanizadas. Entretanto, no geral, o Rio Macaé e seus afluentes apresentaram uma quantidade detectável relativamente baixa de genes beta-lactâmicos nas amostras analisadas, quando comparado aos marcadores genéticos detectados na bacia hidrográfica de Rio das Ostras (REGINA et al., 2021), município vizinho de Macaé situado a aproximadamente a 39 km da nascente do Rio Macaé. Dentre os 43 GRA investigados por Regina et al. (2021), cinco (12%) GRA pertenciam a classe beta-lactâmicos. Das doze amostras analisadas ao longo da bacia hidrográfica de Rio das Ostras apenas cinco não apresentaram detecção de genes de resistência aos beta-lactâmicos. Além disso, também foi identificado o gene *bla-TEM* na nascente do Rio das Ostras, área rural do estudo (REGINA et al., 2021), corroborando com os nossos resultados. De uma forma geral, estas observações indicam a presença de substâncias antimicrobianas nos ecossistemas aquáticos. Porém, além dos genes aqui selecionados, recomendamos ampliar a investigação para uma gama maior de genes de resistência, estendendo a outras classes de antibióticos. Dessa maneira, será possível caracterizar o perfil completo de GRA no Rio Macaé com um maior número de dados.

No entanto, vale ressaltar que neste estudo, o gene *bla-TEM* apresentou maior frequência de detecção na área rural e, inclusive, foi identificado no ponto perto da nascente do rio (S1). Logo, a presença deste gene pode indicar a presença de contaminantes nas águas da área rural, principalmente na nascente. Outros autores já demonstraram que os antimicrobianos aplicados na pecuária são uma grande fonte de poluição de riachos e nascentes localizados em áreas rurais (GROS et al., 2023; GRAY et al., 2020). Os resíduos de antimicrobianos quando depositados no solo, escoam para os rios podendo aumentar a concentração de antibióticos presentes na água, e consequentemente impondo um meio seletivo para a proliferação de bactérias resistentes no corpo hídrico. Os beta-lactâmicos, aminoglicosídeos e tetraciclina são os grupos de fármacos frequentemente utilizados na pecuária, e quando detectadas em um ambiente rural, pode ser indício de que o esterco seja uma fonte potencial de contaminação por antibióticos (SPISSO et al., 2009). O uso de antimicrobianos na pecuária é mundialmente aceito e consumido em níveis extremamente elevados quando se trata de determinadas classes de

fármacos. Em 2020, China, Brasil, Índia e Estados Unidos permaneceram entre os cinco principais países consumidores de antimicrobianos em função do sistema de pecuária intensiva, sendo que mais de 10.000 toneladas de antibióticos foram utilizadas por esses países nesse ano (MULCHANDANI et al., 2023). Como Macaé tem o uso e ocupação do solo associado a atividades pecuaristas principalmente na área rural da cidade, a presença do gene *bla-TEM* nas amostras S1 e S3 sugerem que a pecuária, atividade predominante no local, está sendo uma possível fonte de contaminação de GRA nas águas do Rio São Pedro.

Em relação a contaminação de efluentes hospitalares, um estudo recente realizado em Ribeirão Preto-SP identificou 14 isolados bacterianos pertencentes a *Enterobacter spp.*, fenotipicamente produtores de ESBL ou carbapenemases, em amostras de águas residuais hospitalares, águas residuais urbanas brutas e tratadas. O trabalho demonstrou que, no geral, foi encontrada resistência generalizada aos antibióticos beta-lactâmicos, o que pode ser atribuído ao seu amplo consumo particularmente em ambientes hospitalares (ZAGUI et al., 2023). Diante deste cenário é importante ressaltar que a pandemia recente de COVID-19 também contribuiu significativamente para o aumento da RAM, devido a intensificação dos tratamentos com antibióticos. Houve uma enorme pressão sobre os sistemas de saúde, a emergência prolongada esgotou recursos e levou a uma alteração nas ações de prevenção e controle de infecções, ocasionando um aumento de infecções nas unidades de saúde (WEINER-LASTINGER et al., 2021). A prescrição e o uso de antimicrobianos aumentaram, principalmente entre os pacientes com COVID-19. Pacientes com COVID-19 em estado crítico necessitavam frequentemente de hospitalização, geralmente associada à intervenção com tratamentos antimicrobianos (FERGUSON et al., 2020). Além disso, não houve incentivos e reforço dos programas de uso racional de antimicrobianos (OPAS, 2022), somado ao fato do uso indiscriminado de azitromicina sem a devida comprovação de eficácia para o tratamento da COVID-19 (BUTLER et al., 2021). Consequentemente, estudos evidenciaram um aumento na resistência de cepas de *Escherichia coli* e *Streptococcus pneumoniae*, após a distribuição em massa da azitromicina, com base na literatura (O'BRIEN et al., 2019).

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados nesse estudo foram descritos por Rodriguez-Mozaz et al. (2015) e Regina et al. (2021). Os produtos do gene *bla-TEM* (Figura 5C) amplificados apresentaram tamanho um pouco acima do esperado (968 pb). De acordo com Volkmann et al. (2007), tal fato pode ocorrer porque as amostras ambientais podem conter compostos que interferem na reação de amplificação, prejudicando a reação de PCR e a

visualização do gel por eletroforese. Tais inibidores incluem substâncias húmicas, sais orgânicos ou detergentes que perturbam a detecção de GRA (VOLKMANN et al., 2007).

O estudo de Rodriguez-Mozaz et al. (2015) evidenciou a poluição por antibióticos e GRA de efluentes hospitalares e de uma estação de tratamento de águas residuais (ETAR) para o Rio Ter em uma cidade da Espanha. Cinco pontos de amostragem localizados: nos efluentes de águas residuais do principal hospital da cidade de Girona (Espanha); afluentes e efluentes da ETAR e a montante e jusante do ponto de descarga da ETAR no rio foram avaliados. Foi observada a ocorrência de nove antibióticos em concentrações elevadas, principalmente em amostras de efluentes hospitalares, incluindo ciprofloxacina, azitromicina, claritromicina e sulfametoxazol, cuja presença pode afetar as comunidades microbianas presentes no rio. Nesse sentido, foi evidenciado que o rio receptor estava sendo afetado pelo aumento dos genes *bla-TEM*, como resultado do tratamento de águas residuais, e que este gene estava presente em maiores concentrações nas amostras de efluentes do hospital (MOZAZ et al., 2015). Além disso, o autor afirma que o gene *bla-TEM* é um GRA transmitido por plasmídeos mais frequentemente detectados, que confere resistência às penicilinas e cefalosporinas de espectro estendido. Levando este estudo em consideração, a presença do gene *bla-TEM* no ponto S2 do nosso estudo também pode ser decorrente da influência de efluentes oriundos de dois postos de saúde próximo ao local de amostragem. Isto sugere que, possivelmente, esse efluente hospitalar esteja contribuindo para a disseminação desse gene no corpo hídrico.

A água representa uma via importante de propagação de bactérias entre diferentes ambientes aquáticos, incluindo habitats de água doce que abrigam uma grande diversidade bacteriana (MOREIRA et al., 2014). Considerando a abordagem *One Health*, o consumo de água potável é uma importante via para a entrada de GRA ambientais no intestino humano (ALAWI et al., 2022). Um estudo feito nas bacias hidrográficas do São João e do Guandu, que fornecem água potável para a cidade do Rio de Janeiro, detectou substâncias das classes de antimicrobianos beta-lactâmicos, macrolídeos e sulfonamidas em amostras de águas não tratadas, sendo a bacia hidrográfica do Guandu a que apresenta os maiores índices de antimicrobianos (BIANCO et al., 2022). Essas bacias são frequentemente impactadas devido à falta de tratamento de esgoto nas cidades vizinhas. Assim como neste trabalho, alguns genes de resistência a beta-lactâmicos também foram detectados na bacia hidrográfica do Rio São João, bacia hidrográfica do Guandu e nas amostras de água potável. No entanto, foram detectados outros genes que codificam enzimas metalo-beta-lactamase, como *bla-AIM*, *bla-GIM*, *bla-IMP* e *bla-VIM* (BIANCO et al., 2022). Além disso, nesta mesma pesquisa foi avaliado os resíduos

de antimicrobianos, em que resíduos de claritromicina, sulfametoxazol e azitromicina foram encontrados na água não tratada e na água potável em todas as amostras (BIANCO et al., 2022). Isso reforça a necessidade de se realizar pesquisas futuras mais amplas abrangendo a pesquisa de outros GRA, além da presença da resíduos de antimicrobianos.

A presença de GRA na água potável desinfetada e descontaminada ainda é pouco estudada. Porém, alguns estudos demonstraram que a água potável tratada pode conter bactérias dos gêneros *Sphingomonas*, *Pseudomonas* e *Acinetobacter* ou da família *Enterobacteriaceae* não fecais capazes de resistir a diferentes antibióticos e tratamentos (MOREIRA et al., 2017; ROCHA et al., 2013). Já se sabe que bactérias resistentes podem sobreviver às pressões seletivas que ocorrem durante o processo de tratamento da água por cloração (GUO et al., 2014). Entretanto, a remoção de GRA varia dependendo do esquema de tratamento de água. A desinfecção com cloro é capaz de reduzir muitos GRA, mas sem destruí-los, resultando em sua descarga em ambientes aquáticos. Isso faz com que o DNA de bactérias mortas ou inativas provavelmente possa persistir no ambiente (GUO et al., 2014).

A produção da enzima beta-lactamase é o mecanismo bastante comum de resistência bacteriana aos antimicrobianos beta-lactâmicos. A carbapenemase bla-KPC foi aqui identificada na bacia hidrográfica do Rio Macaé. Esse resultado condiz com o estudo de Bianco et al. (2022) em que foi encontrado genes que codificam as carbapenemases na bacia hidrográfica do Rio Guandu (BIANCO et al., 2022). Ademais, bactérias portadoras de genes de resistência a carbapenêmicos possuem um alto potencial de disseminação na microbiota ambiental (ROSSOLINI et al., 2001). Sob a perspectiva *One Health*, existe uma intersecção entre a água e o microbioma associado ao ser humano. A expressão “microbioma associado ao ser humano” se refere a todos os microrganismos capazes de colonizar ou infectar o hospedeiro humano, independente de qual seja o seu habitat principal (ROBERTO et al., 2014). Nesse sentido, há duas possibilidades de intersecção entre o microbioma associado ao homem e os ambientes aquáticos. Um refere-se à liberação de bactérias dos seres humanos nas águas residuais e o outro, compreende bactérias que estão presentes na água potável, mas também são encontradas no microbioma associado ao homem (MOREIRA et al., 2014).

O entendimento da ocorrência de bactérias resistentes a antibióticos na água potável é importante devido aos efeitos nocivos na saúde humana. Nesse caso, a transmissão poderia acontecer diretamente, no qual bactérias aquáticas resistentes seriam transmitidas para os seres humanos ou, indiretamente, através da transmissão de GRA de bactérias aquáticas para bactérias relacionadas ao microbioma humano (MOREIRA et al., 2014). Portanto, o rastreamento de genes de resistência a antibióticos em diferentes compartimentos ambientais é

uma ferramenta importante para avaliar a ecologia e epidemiologia da resistência a antibióticos e fornecer informações para a gestão de antibióticos e de GRA, a fim de facilitar a melhoria da qualidade da água potável.

6 CONCLUSÃO

Este estudo forneceu uma análise da presença de GRA da classe dos beta-lactâmicos da bacia hidrográfica do Rio Macaé. Nessa análise, a detecção de GRA apresentou uma distribuição uniforme entre os períodos seco e chuvoso. O gene *bla-TEM* apresentou maior ocorrência nas amostras rurais, enquanto os genes *bla-SHV* e *bla-KPC* foram detectados exclusivamente no estuário do Rio Macaé. O estuário do Rio Macaé foi o ponto de maior prevalência de detecção de GRA.

Entretanto, esses dados reforçam a importância da realização de mais estudos em ambientes aquáticos, a fim de identificar outras classes de GRA e possíveis fontes de contaminação. Além disso, estudos adicionais utilizando *qPCR* podem ser realizados a fim de aumentar a sensibilidade. O perfil do resistoma do Rio Macaé aqui descrito pode refletir a realidade de outros rios, lagos e córregos que sofrem com o impacto antrópico, especialmente com o déficit de redes de tratamento de esgoto no Brasil.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, E. P., e CHAIN, E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. **Nature** 146, 837.1940. Disponível: <https://doi.org/10.1038/146837a0>. Acesso em: 16 set. 2024.
- AGA, D. S. et al. Application of ELISA in determining the fate of tetracyclines in land-applied livestock wastes. **Analyst**, v. 128, n. 6, p. 658–662, 1 jun. 2003. Disponível em: 10.1039/b301630g. Acesso em: 10 set. 2024.
- ALAWI, Mawa. Plasmid-mediated antimicrobial resistance in drinking water. **Environmental Advances**. v. 8. 2022.
- AMBLER RP. The structure of beta-lactamases. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**.1980.
- AMINOV, Rustam e MACKIE, Roderick. Evolution and ecology of antibiotic resistance genes. **FEMS Microbiology Letters**. v.271, ed.2. 2007. p.147–161.
- ANA, K. et al. b-Lactam antibiotics and antibiotic resistance in Asian lakes and rivers. **Environmental Pollution**, v. 275, 2021.
- BAQUERO, Fernando et al. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 19, 2008. p.260-265.
- BENASSULY, CAROLINA. Avaliação da influência da transposição do Rio Macabu na disponibilidade hídrica, no transporte de sedimento e na qualidade da água do Rio São Pedro (Macaé-RJ). Relatório Anual 2020. Macaé: Nupem/UFRJ, 2021.
- BHARADWAJ, Alok et al. Multidrug-Resistant Bacteria: Their Mechanism of Action and Prophylaxis. **Biomed Res Int**. 2022.
- BIANCO, K et al. Mobile resistome of microbial communities and antimicrobial residues from drinking water supply systems in Rio de Janeiro, Brazil. **Sci Rep**. 2022.
- BLACKWELL, P. A. et al. Effects of agricultural conditions on the leaching behaviour of veterinary antibiotics in soils. **Chemosphere**, v. 75, n. 1, p. 13–19, mar. 2009.
- BOBATE, Shishir, et al. Emergence of environmental antibiotic resistance: Mechanism, monitoring and management. **Environmental Advances**, v. 13, 2023.
- BORTOLOTI, K. DA C. S. et al. Microbiological quality of natural waters on the resistance profile of heterotrophic bacteria to antimicrobials. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 23, n. 4, p. 717–725, 2018.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Boletim Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde nº 14, 2016. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa>. Acesso em: 22 de outubro, 2023.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Gerência Geral de Tecnologia em Serviços de Saúde – GGTES/ Gerência de Regulamentação e Controle Sanitário em Serviços de Saúde-GRECS. Brasília, 2018.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Laboratório de Microbiologia Clínica, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Plano de ação nacional de prevenção e controle da resistência aos antimicrobianos no âmbito da saúde única 2018-2022 (PAN-BR) [recurso eletrônico]. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Brasília, 2019. p. 8-21.

BRASIL. Ministério da Saúde. Procedimento de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Cap. 5, art. 27, § 1-8. 2021.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Resolução CONAMA nº 357, de 15 de junho de 2005.

BUSH, K. et al. A functional classification scheme for b-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1995.

BUSH, K. b-lactamase inhibitors from laboratory to clinic. *Clin. Microbiol. Rev.*, 1: 109-123, 1988.

BUTLER, CHRISTOPHER C. et al. Azithromycin for community treatment of suspected COVID-19 in people at increased risk of an adverse clinical course in the UK (PRINCIPLE): a randomised, controlled, open-label, adaptive platform trial. *The Lancet*, v.397, ed. 10279, p. 1063-1074, 2021.

CARBONNE, Anne et al. National multidrug-resistant bacteria (MDRB) surveillance in France through the RAISIN network: a 9-year experience. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 68, Issue 4.2013. p. 954–959.

CDC. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Healthcare-Associated Infections (HAIs): *Acinetobacter* in Healthcare Settings. 2019. Disponível em: <https://www.cdc.gov>. Acesso em: 21 de outubro, 2023.

CHAVARRÍA-BENCOMO, Inés, et al. Antibiotic resistance in tick-borne bacteria: A One Health approach perspective. *Journal of Infection and Public Health*, v.16, 2023. p.153-162.

CHOWDHURY, S. et al. Heavy metals in drinking water: Occurrences, implications, and future needs in developing countries. *Science of the Total Environment*, 2016.

CUNHA, Vinícius. Bactérias multirresistentes: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase – ENZIMA KPC nas Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS). Belo Horizonte, MG, 2014.

DAVIES, J, et al. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, v. 74, n. 3, 2010. p. 417–433. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/mmbr.00016-10>. Acesso em: 2 set. 2024.

DAVIN-REGLI et al. Enterobacter spp.: Update on Taxonomy, Clinical Aspects, and Emerging Antimicrobial Resistance. *ASM Journals Clinical Microbiology Reviews*. v.32, n. 4. 2019.

DELCOUR, A. H. Outer membrane permeability and antibiotic resistance. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**. 2009.

DIJKSHOORN, L. et al. An increasing threat in hospitals multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Nat Rev Microbiol**. 2007. p.939-951.

FERGUSON, N. M. et al. Impact of non-pharmaceutical interventions (NPIs) to reduce COVID-19 mortality and healthcare demand. **Imperial College COVID-19 Response Team**, 2020.

FERRER-BERGUA, Lucía, et al. Rate of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pediatric emergency departments in Spain. **Anales de Pediatría**. v. 97, n.2, 2022. p. 95-102.

FIOCRUZ. 17ª CNS: Fiocruz Brasília apresenta Agenda 2030 e seus ODS. 2023. Disponível em: <https://www.fiocruzbrasil.fiocruz.br/>. Acesso em: 20 nov. 2023.

FLEMING, Alexander. Classics in infectious diseases: on the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. **Brit. J. Exp. Pathol**. 1929.

FLEMING, Alexander. Penicillin. Nobel Lecture, 1945.

FORBES, BA. et al. Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. 10 ed. St. Louis: Mosby; 1998.

FREITAS, LEONARDO. Atlas Ambiental da Bacia Hidrográfica do Rio Macaé. Rio de Janeiro: Editora Nova Triade do Brasil Ltda, ed. 1, p.53-57, 2015.

GOOGLE EARTH. Centro de saúde PSF Tapera. 2024. Disponível em: <https://www.google.com.br/earth/index.html>. Acesso em: 18 mar. 2024.

GOÑI-URRIZA, M, et al. Impact of an urban effluent on antibiotic resistance of riverine Enterobacteriaceae and *Aeromonas* spp. **Appl Environ Microbiol**. 2000.

GRENNI, et al. Ecological effects of antibiotics on natural ecosystems: A review. **Microchemical Journal**. v. 136. 2018. p. 25-39.

GRAY, Austin D. et al. The seasonal distribution and concentration of antibiotics in rural streams and drinking wells in the piedmont of North Carolina. **The Science of the total environment**. 2020.

GROS, M. et al. Antibiotics, antibiotic resistance and associated risk in natural springs from an agroecosystem environment. **Science of The Total Environment**. v.857. 2023.

GUO, Xueping. Prevalence of sulfonamide and tetracycline resistance genes in drinking water treatment plants in the Yangtze River Delta, China. **Science of The Total Environment**. v. 493. 2014. p. 626-63.

HOCQUET, D. et al. What happens in hospitals does not stay in hospitals: antibiotic-resistant bacteria in hospital wastewater systems. **J Hosp Infect**. 2016. p. 395-402.

JONES, Annie et al. The changing epidemiology of resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 64. 2009. p. 3-10.

JUBEH, Buthaina. Resistance of Gram-Positive Bacteria to Current Antibacterial Agents and Overcoming Approaches. **Molecules**. 2020.

KASSIM, N. S. A. et al. Assessment of heavy metals in wastewater plant effluent and lake water by using atomic absorption spectrophotometry. **Materials Today: Proceedings**, 2022.

KOHANSKI, M.A et al. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. **Nature Reviews Microbiology**. 2010. p.423.

LACEY, R.W. Antibiotic resistance in Staphylococcus aureus and streptococci. **Br. Med. Bull.** 1984.

LACHMAYR, K. Anthropogenically induced reservoirs of antibiotic resistance: the case of Massachusetts Bay. Harvard University, Boston, MA, 2007.

LARAKI, N. et al. Structure of In31, a blaIMP-containing Pseudomonas aeruginosa integron phyletically related to In5, which carries an unusual array of gene cassettes. **Antimicrob Agents Chemother**. 1999.

LIMA, J. A. et al. Potencial da economia de água potável pelo uso de água pluvial: análise de 40 cidades da Amazônia. **Eng Sanit Ambient**. v.16, n.3, 2011.

LÉPESOVÁ K. et al. Hospital Wastewater-Important Source of Multidrug Resistant Coliform Bacteria with ESBL-Production. **Int J Environ Res Public Health**. 2020.

MACHADO, E. et al. Antibiotic resistance profile of wastewater treatment plants in Brazil reveals different patterns of resistance and multi resistant bacteria in final effluents. **Science of The Total Environment**, v.857. 2023.

MADIGAN, Michael, et al. Microbiologia de Brock. 14. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.

MARRA, AR, et al.; BRAZILIAN SCOPE STUDY GROUP. Nosocomial bloodstream infections in Brazilian hospitals: analysis of 2,563 cases from a prospective nationwide surveillance study. **J Clin Microbiol**. 2011.

MATAMOROS, V. et al. Occurrence of antibiotics in Lettuce (*Lactuca sativa L.*) and Radish (*Raphanus sativus L.*) following organic soil fertilisation under plot-scale conditions: Crop and human health implications. **Journal of Hazardous Materials**, v.436. 2022.

MBANGA, et al. Genomic Insights of Multidrug-Resistant Escherichia coli From Wastewater Sources and Their Association With Clinical Pathogens in South Africa. **Frontiers in Veterinary Science**. 2021.

MCEWEN, SA e COLLIGNON, PJ. Antimicrobial Resistance: A One Health Perspective. **Microbiol Spectr**. 2017.

MCINNES, Ross, et al. Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in the human gut microbiome. **Current Opinion in Microbiology**. 2020.

MELO, Vivianne, et al. Guia Antimicrobianos. Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás (HC-UFG), 1.ed. Goiânia, 2012.

MESA, RJ, et al. Extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in different environments (humans, food, animal farms and sewage). **J. Antimicrob. Chemother.** 2006. p. 211-215.

MOLISANI, M.; ESTEVES, F. Emissões naturais e antrópicas de nitrogênio, fósforo e metais para a bacia do Rio Macaé (Macaé, RJ, Brasil) sob influência das atividades de exploração de petróleo e gás na bacia de Campos. **Quim. Nova**, Vol. 36, n. 1, p. 27-33, 2013.

MOLISANI, M. et al. Bacia hidrográfica do Rio Macaé (Macaé, RJ) como interface para a proteção da biodiversidade: necessidade de uma gestão integrada costeira. p. 315–336, 2019.

MOREIRA, Ivone et al. Bacterial diversity and antibiotic resistance in water habitats: searching the links with the human microbiome. **FEMS Microbiology Reviews**. v. 38. 2014. p. 761–778.

MOREIRA, Ivone et al. Ubiquitous and persistent Proteobacteria and other Gram-negative bacteria in drinking water. **Science of The Total Environment**.v. 586. 2017. p.1141-1149

MOZAZ, Sara, et al. Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in hospital and urban wastewaters and their impact on the receiving river. **Water Research**, v.69, 2015. p.234-242.

MUNITA, J. M.; ARIAS, C. A. Mechanisms of Antibiotic Resistance. **Microbiology Spectrum**. v. 4, n. 2, 2016.

MULCHANDANI, R. et al. Global trends in antimicrobial use in food-producing animals: 2020 to 2030. **PLOS Glob. Public Health**. 2023.

NIKAIDO, H. Multidrug resistance in bacteria. **Annu Rev Biochem**. 2010.

NETO, Lauro et al. Alternative drugs against multiresistant Gram-negative bacteria. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**. v.23, 2020. p. 33-37.

O'BRIEN, K. S. et al. Antimicrobial resistance following mass azithromycin distribution for trachoma: a systematic review. **The Lancet Infectious Diseases**, 2019.

ONU. Mortes por resistência antimicrobiana podem subir em 10 milhões até 2050. 2023. Disponível em: <https://news.un.org/>. Acesso em: 8 nov. 2023.

OMS. Organização mundial da saúde. Guidelines on Core Components of Infection Prevention and Control Programmes at the National and Acute Health Care Facility Level. World Health Organization, 2016. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/251730/9789241549929-eng.pdf>. Acesso em: 20 de maio 2023.

OPAS. ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE (OPAS). A resistência aos antimicrobianos, acelerada pela pandemia de COVID-19. 2022.

OPAS. ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE (OPAS). Início do trabalho conjunto na luta contra a resistência aos antimicrobianos na América Latina. 2020. Disponível em: <https://www.paho.org>. Acesso em: 8 nov. 2023.

OPAS. ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE (OPAS). Prevenção e controle de infecções relacionadas à assistência à saúde. Recomendações Básicas. Washington, D.C: OPAS. 2017.

OPAS. ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE (OPAS). Preventing antimicrobial resistance together. 2022. Disponível em: <https://www.paho.org/en/campaigns/world-antimicrobial-awareness-week-2022>. Acesso em: 8 nov. 2023.

OTTER, J. et al. Counting the cost of an outbreak of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: an economic evaluation from a hospital perspective. *Clinical Microbiology and Infection*. v.23, Issue 3, 2017, p.188-196.

PEDRERO, F. et al. Use of treated municipal wastewater in irrigated agriculture-Review of some practices in Spain and Greece. **Agricultural Water Management**. 2010.

PENG, Feng et al. Urbanization drives riverine bacterial antibiotic resistome more than taxonomic community at watershed scale. **Environment International**. v.137. 2020.

PEREIRA, F. et al. Ecological aspects of the antimicrobial resistance in bacteria of importance to human infections. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, p. 287–293, 2002.

PEREZ, S. et al. Increase in Hospital-Acquired Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Infection and Colonization in an Acute Care Hospital During a Surge in COVID-19 Admissions - New Jersey. 2020.

PROIA, L. et al. Antibiotic resistance along an urban river impacted by treated wastewaters. **Science of the Total Environment**, v. 628–629, p. 453–466, 2018.

REGINA, A. L. A. et al. A watershed impacted by anthropogenic activities: Microbial community alterations and reservoir of antimicrobial resistance genes. **Science of the Total Environment**, v. 793, 2021.

REGITANO, Jussara, et al. Performance and environmental impact of antibiotics in animal production in Brazil. **Rev. Bras. Ciênc. Solo**. 2010.

RICE, LB. Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE. **J Infect Dis**. 2008.

ROBERTO, A. A. et al. Distribution and co-occurrence of antibiotic and metal resistance genes in biofilms of an anthropogenically impacted stream. **Science of the Total Environment**, v. 688, p. 437–449, 2019.

ROBERTO, Alescia et al. Distribution and co-occurrence of antibiotic and metal resistance genes in biofilms of an anthropogenically impacted stream. **Science of The Total Environment**. v. 688. 2019. p. 437-449.

ROBERTS, M. C. Resistance to tetracycline, macrolide-lincosamide-streptogramin, trimethoprim, and sulfonamide drug classes. **Mol. Biotechnol.** v.20. 2002. p 261–284.

ROBINSON, DA e ENRIGHT, MC. Evolutionary models of the emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob Agents Chemother.** 2003.

ROCHA, Carlos. Diversity and antibiotic resistance of *Acinetobacter* spp. in water from the source to the tap. **Applied microbial and cell physiology.** v. 97. 2013. p.329–340.

ROSSI, F. e ANDREAZZI, DB. Resistência Bacteriana: Interpretando o Antibiograma. São Paulo: Atheneu; 2005.

ROSSI, R. et al. Glossário de Termos Científicos para Elaboração do Consentimento Informado. Revista de Medicina ATM. 1999.

ROSSOLINI, Gian et al. Metallo- β -Lactamase Producers in Environmental Microbiota: New Molecular Class B Enzyme in *Janthinobacterium lividum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy.** v. 45, n. 3. 2001.

SABINO, Y.N.V. et al. Characterization of antibiotic resistance genes in the species of the rumen microbiota. **Nat Commun.** 2019.

SAVENKO, M e KRYVTSOVA, M. Urban Aquatic Ecosystems as a Factor of the Spread of Antibiotic Resistant Microorganisms and Resistance Genes. **Transylvanian Review of Systematical and Ecological Research**, v. 23, n. 2, p. 1–12, 2021.

SCHATZ, A. e WAKSMAN, S. A. Effect of streptomycin and other antibiotic substances upon *Mycobacterium tuberculosis* and related organisms. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** v.57. 1944. p 244–248.

SPISSO, BF et al. Resíduos e contaminantes químicos em alimentos de origem animal no Brasil: histórico, legislação e atuação da vigilância sanitária e demais sistemas regulatórios. **Ciências e Saúde Coletiva.** 2009. p. 2091-2106.

STACHUROVÁ, et al. Resistant Genes and Multidrug-Resistant Bacteria in Wastewater: A Study of Their Transfer to the Water Reservoir in the Czech Republic. **Life.** 2022.

STORTEBOOM, H, et al. Identification of antibiotic-resistance-gene molecular signatures suitable as tracers of pristine river, urban, and agricultural sources. **Environ. Sci. Technol.**, v.44, 2010. p. 1947-1953.

STROMMINGER B. et al. Multiplex PCR assay for simultaneous detection of nine clinically relevant antibiotic resistance genes in *Staphylococcus aureus*. **J Clin Microbiol**, 2003.

TANGA, Sarah et al. Mechanisms of β -lactam antimicrobial resistance and epidemiology of major community- and healthcare-associated multidrug-resistant bacteria. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.78, 2014. p. 3-13

TAO, R. et al. Detection of antibiotic resistance and tetracycline resistance genes in Enterobacteriaceae isolated from the Pearl rivers in South China. **Environmental Pollution**, v. 158, n. 6, p. 2101–2109, 2010.

TIMENETSKY, Jorge. Antimicrobianos (antibióticos e quimioterápicos). Departamento de Microbiologia, USP. São Paulo, 2017.

TSE, A. et al. Post-appendectomy pelvic abscess with extended-spectrum beta-lactamase producing Escherichia coli: a case report and review of literature. **World Journal of Clinical Cases**. v.6, n.16. 2018. p.1175-118.

TOLEMAN, MA. et al. Caracterização molecular de SPM-1, uma nova metalo-beta-lactamase isolada na América Latina: relatório do programa de vigil. 2002.

UNITED NATIONS CHILDREN’S FUND (UNICEF). Progress on household drinking water, sanitation and hygiene I 2000-2017. Special focus on inequalities. New York: United Nations Children’s Fund (UNICEF) and World Health Organization. p. 6-9, 2019. Disponível em: <<https://washdata.org>>. Acesso em: 10 maio, 2022.

UNITED NATIONS. UN World Water Development Report 2021: Valuing Water. 2021. Disponível em; <https://www.unwater.org/publications/un-world-water-development-report-2021/>. Acesso em: 5 maio, 2022.

UR-RAHMAN, et al. The growing genetic and functional diversity of extended spectrum Beta-Lactamases. **Biomed. Res. Int.**, 2018.

U.S. Congress, Office of Technology Assessment. Impacts of antibiotic-resistant bacteria, OTA-H-629. U.S. Government Printing Office, Washington, DC, 1995.

VAN BOECKEL, T. P. et al. Global trends in antimicrobial use in food animals. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 18. 2015. p. 5649–5654.

VOLKMANN, H, et al. Evaluation of inhibition and cross-reaction effects on real-time PCR applied to the total DNA of wastewater samples for the quantification of bacterial antibiotic resistance genes and taxon-specific targets. Molecular and cellular probes. 2007.

VÖRÖSMARTY, C. J. et al. Global Water Resources: Vulnerability from Climate Change and Population Growth Downloaded from. **Science**, v.289, 2000. Disponível em: <<http://science.sciencemag.org/>>. Acesso em: 7 de maio, 2022.

WANG, Fenghua, et al. The overlap of soil and vegetable microbes drives the transfer of antibiotic resistance genes from manure-amended soil to vegetables. **Science of The Total Environment**, v. 828. 2022.

WEINER-LASTINGER, LM. et al. The impact of coronavirus disease 2019 (COVID-19) on healthcare-associated infections in 2020: A summary of data reported to the National Healthcare Safety Network. Infect Control Hosp Epidemiol [Internet]. 2021. Disponível em: <https://www.cambridge.org>. Acesso em: 9 nov. 2023.

WERTH, Brian. Cefalosporinas. 2022. Disponível em: <https://www.msdmanuals.com/>. Acesso em: 15 nov. 2022.

WILLIAMS, J.D. β -lactamases and β -lactamase inhibitors. *Inter. J. Antimicrob. Agents*. 1999. p.3-7

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Antibiotic resistance, 2020. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>. Acesso em 19 set, 2023.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Guidelines for drinking-water quality: fourth edition incorporating the first addendum. 2017. Disponível em: Acesso em: 5 de maio, 2022.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). One Health. 2017. Disponível em: <https://www.who.int>. Acesso em: 9 nov. 2023

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Ten threats to global health. 2019. Disponível em: <https://www.who.int/news-room>. Acesso em: 21 de outubro, 2023.

WU, Jie, et al. Antibiotics and antibiotic resistance genes in agricultural soils: A systematic analysis. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**. v.53. 2022. p. 847-864.

ZABISZAK, Michal et al. Complexes of β -lactam antibiotics and their Schiff-base derivatives as a weapon in the fight against bacterial resistance. **Coordination Chemistry Reviews**, v.493, 2023.

ZAGUI, et al. Multidrug-resistant *Enterobacter* spp. in wastewater and surface water: Molecular characterization of β -lactam resistance and metal tolerance genes. **Environmental Research**. v. 233. 2023.

ZHANG, Hongna, et al. Prevalence and characteristics of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Enterobacteriaceae* isolated from rural well water in Taian, China, 2014. **Environ Sci Pollut Res Int**. 2015.

ZHANG, K., et al. New quadriplex PCR assay for detection of methicillin and mupirocin resistance and simultaneous discrimination of *Staphylococcus aureus* from coagulase-negative staphylococci. **J. Clin. Microbiol**. 2004.

ZHANG, Qian-Qian, et al. Comprehensive Evaluation of Antibiotics Emission and Fate in the River Basins of China: Source Analysis, Multimedia Modeling, and Linkage to Bacterial Resistance. **Environmental Science & Technology**. 2015.