

Perfil de resistência aos antibióticos e prevalência dos genes *qacEΔ1* e *sul1* em *Pseudomonas aeruginosa* de efluente hospitalar

Antibiotic resistance pattern and prevalence of *qacEΔ1* and *sul1* genes in *Pseudomonas aeruginosa* from hospital wastewater

RESUMO

Rosa Maria Pinto Novaes^{1,II}
Mariana de Melo Rodrigues Sobral^I
Camila Barreto^I
Ana Paula Alves Nascimento^I
Mychelle Alves Monteiro^I
Bernardete Ferraz Spisso^I
Kayo Bianco^I
Célia Maria Carvalho Pereira Araujo Romão^I
Maysa Mandetta Clementino^{I,*}

Introdução: Efluentes hospitalares representam riscos à saúde pública e ambiental devido à presença de microrganismos patogênicos, drogas e produtos químicos. *Pseudomonas aeruginosa* é um patógeno oportunista frequentemente encontrado no ambiente hospitalar. **Objetivo:** Avaliar o resistoma de isolados de *P. aeruginosa* da estação de tratamento de esgoto hospitalar (ETE) de um complexo hospitalar na cidade do Rio de Janeiro. **Método:** Vinte isolados dos cinco estágios da ETE foram identificados como *P. aeruginosa* pelo sequenciamento do gene 16S rRNA. A suscetibilidade aos antibióticos foi determinada segundo o CLSI e os genes *qacEΔ1* e *sul1* foram detectados pela PCR. Resíduos de sulfonamidas foram pesquisados por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial. **Resultados:** Foi demonstrada a presença de sulfametoxazol em nível inferior a 50 ng·L⁻¹, resistência às sulfonamidas (80%) seguida pelas quinolonas (50%) e 13 perfis de suscetibilidade aos antimicrobianos. Os genes *qacEΔ1-sul1* foram detectados em 100% dos isolados, sugerindo a presença de integrons de classe 1 em toda a ETE. **Conclusões:** Os resultados sinalizaram limitações no tratamento e a propagação de genes de resistência nas etapas da ETE. Esses dados contribuem com órgãos competentes no desenho de ações preventivas frente aos impactos negativos à saúde pública.

PALAVRAS-CHAVE: Efluente Hospitalar; *Pseudomonas aeruginosa*; Bactérias Multirresistentes; Integron de Classe 1

ABSTRACT

Introduction: Hospital effluents may pose great environmental risk due to the presence of pathogenic microorganisms, drugs and chemical components. *Pseudomonas aeruginosa* is an opportunistic pathogen frequently found in hospital environment. **Objective:** To evaluate the resistome of *P. aeruginosa* from the hospital wastewater treatment plant (HWTP) in a hospital complex of Rio de Janeiro city. **Method:** Twenty isolates from the five stages of the HWTP were identified as *P. aeruginosa* by 16S rRNA gene sequencing analysis. Susceptibility to antibiotics was determined according to CLSI and *qacEΔ1* and *sul1* genes were detected by PCR. Sulphonamide residues were investigated by high performance liquid chromatography coupled to sequential mass spectrometry. **Results:** The sulfamethoxazole has been demonstrated at a level below 50 ng L⁻¹. Sulfonamide resistance (80%) has been demonstrated followed by quinolone class (50%) and 13 susceptibility patterns to antimicrobials. The *qacEΔ1-sul1* genes were detected in 100% of isolates suggesting the presence of class 1 integrons in the whole HWTP. **Conclusions:** The results signaled limitations of HWTP and propagation of resistance genes in all stages of the HWTP. These data also contribute to the environmental sanitary surveillance in the design of prevention actions against negative impact on the public health.

KEYWORDS: Hospital Sewage; *Pseudomonas aeruginosa*; Multidrug-Resistant Bacteria; Class 1 Integrons

^I Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz (INCQS/Fiocruz), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

^{II} Subsecretaria de Vigilância, Fiscalização Sanitária e Controle de Zoonoses (SubVISA), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

* E-mail: maysa.mandetta@incqs.fiocruz.br



INTRODUÇÃO

O desenvolvimento e a propagação da resistência aos antibióticos entre bactérias são considerados uma ameaça para a saúde humana e ambiental. Muitos estudos têm demonstrado a importância de cenários ambientais, como por exemplo, água e solo, no ciclo da resistência aos antibióticos na natureza^{1,2}.

As águas residuais provenientes de hospitais e encaminhadas para a estação de tratamento de efluente hospitalar (ETE) contêm em sua composição altas concentrações de bactérias, nutrientes, oxigênio, produtos químicos, metais pesados, agentes antimicrobianos e outras drogas não metabolizadas³. Esse ambiente proporciona o aumento da pressão seletiva e, com isso, a transferência horizontal e a disseminação de genes de resistência e de organismos resistentes para o meio ambiente^{4,5,6}.

Dentre as bactérias encontradas em efluentes hospitalares, a *Pseudomonas aeruginosa* se destaca como um patógeno nosocomial oportunista geralmente envolvido em infecções hospitalares⁷. É conhecido não só por seu metabolismo versátil, mas também por sua excepcional capacidade de se adaptar e colonizar uma ampla variedade de ambientes (águas, solo, rizosfera, animais). Além disso, sua resistência natural (intrínseca) e adquirida a uma ampla gama de agentes antimicrobianos resulta no surgimento de cepas resistentes a múltiplos fármacos^{8,9}. Essa multirresistência tem sido extensivamente descrita e envolve diferentes mecanismos, tais como sistemas bombas de efluxo, baixa permeabilidade da membrana, alteração do alvo do agente antimicrobiano, alteração de proteínas da membrana externa, produção de β-lactamases e outras enzimas^{6,10}.

No Brasil, estudos referentes à avaliação de perfis de suscetibilidade aos antimicrobianos em isolados bacterianos de efluentes hospitalares revelaram a presença de linhagens multidroga resistentes em todas as etapas do sistema e até mesmo após o tratamento^{1,6,11,12}. Além disso, outro estudo revelou a presença de cepas produtoras de enzimas β-lactamases de espectro estendido (ESBL), *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPC) e metalo-β-lactamases (MBL)¹³. Miranda et al.¹¹ detectaram os genes *blaSHV*, *blaCTX-M-1*, *blaCTX-M-2* e *blaTEM*, *blaVIM*, *blaSPM* e *blaKPC* em isolados clínicos e na ETE de um mesmo hospital. O gene *blaSPM-1* é o mais prevalente no Brasil, sua disseminação epidemiológica em amostras ambientais no sul do Brasil foi confirmada em isolados de *P. aeruginosa* de um efluente hospitalar e em água superficial do rio receptor¹⁴.

Problemas associados à baixa suscetibilidade microbiana aos antibióticos datam de longo tempo. A resistência às sulfonamidas surgiu logo após sua introdução na prática clínica (1930) e pode ter sido resultado de mutações no sítio-alvo ou por aquisição de genes de resistência à antissintetase (*sul*)^{15,16}. Essa resistência é primariamente mediada pelos genes *sul1*, *sul2* e *sul3* que codificam a *dihydropteroate synthetase* (DHPS) e que apresenta baixa afinidade às sulfonamidas^{17,18}. Diversas espécies bacterianas abrigam esses genes, localizados em transposons ou em plasmídeos autotransfeteáveis ou mobilizáveis com ampla gama de hospedeiros; eles apresentam resistência antibiótica múltipla, que é cosseleccionada por sulfonamidas^{19,20}.

O gene *sul1* faz parte do segmento 3' conservado do integron de classe 1, enquanto o gene *sul2* aparece associado com genes que conferem resistência à estreptomicina. Em alguns estudos, 70% da resistência à sulfonamida poderiam ser conferidas a esses genes²¹. Posteriormente, a disseminação de *sul3*, detectado em uma cepa de *Escherichia coli* na Suíça, parece estar relacionado com transposons²². O sistema integron/cassete é tido como um dos melhores exemplos de captura e expressão de novos genes^{23,24}, ocupando lugar de destaque na pesquisa de resistência aos antibióticos e biocidas^{25,26}.

A resistência bacteriana aos antibióticos é um problema global e vem progressivamente aumentando com o uso indiscriminado e crescente de substâncias com ação antimicrobiana. Em contrapartida, a resistência aos biocidas é uma questão emergente, uma vez que essas substâncias são amplamente utilizadas na descontaminação, desinfecção e esterilização visando o controle da disseminação de microrganismos^{27,28}.

Dentre essas substâncias, os compostos quaternários de amônio (QAC) são utilizados rotineiramente como antissépticos e desinfetantes em ambientes domésticos, veterinários, industriais e hospitalares^{29,30}. Esses compostos são biodegradáveis em condições aeróbicas e, assim, suas concentrações nos diversos ambientes podem flutuar continuamente. No esgoto, efluentes de estação de tratamento de esgoto, águas superficiais e sedimentos geralmente encontram-se em concentrações subinibitórias, tornando esses ambientes seletivos, o que pode resultar na emergência e disseminação de microrganismos com suscetibilidade diminuída a esses compostos entre diferentes gêneros microbianos, incluindo patógenos de interesse médico³¹.

Dentre os mecanismos de resistência aos QAC, a expressão de bombas de efluxo por *P. aeruginosa* pode abranger sistemas de efluxo multidroga, incluindo as proteínas QacE e QacEA1. O gene *qacEA1* está incluído no segmento conservado 3' do integron de classe I, inicialmente descrito como uma variante do gene *qacE*³².

Até o momento, diversos genes *qac* foram descritos, como *qacA*, *qacB*, *smr* (antigos *qacC* e *qacD*), *qacE*, *qacF*, *qacG*, *qacH*, *qacJ* e *qacZ*. Em bactérias Gram-negativas, como enterobactérias e *P. aeruginosa*, o gene *qacE* (incluindo a variante atenuada *qacEA1*) é amplamente difundido. Esses genes também podem ser encontrados em outras espécies, como *Aeromonas* spp., *Vibrio* spp. e *Acinetobacter* spp.³³. Isto se deve à alta prevalência de integrons de classe I, que em bactérias Gram-negativas geralmente incluem o gene *qacEA1*³⁴. Desta forma, existe a preocupação de que a exposição de microrganismos a compostos quaternários de amônio pode selecionar isolados resistentes a diversos antimicrobianos, favorecendo o surgimento de cepas multirresistentes^{27,35}. Publicações recentes descrevem o aumento nos níveis de resistência associados aos genes *qac*, demonstrando a diminuição do poder de eficácia de compostos como cloreto de benzalcônio e clorhexidina^{36,37}. Além disto, os genes *qacEA1* e *qacE* têm sido detectados em águas superficiais³⁸ e em ambientes poluídos com QAC³⁹.



Este estudo teve como objetivo avaliar os perfis de resistência aos antibióticos em *P. aeruginosa* isoladas de uma ETEH e investigar a presença de genes de resistência aos compostos quaternários de amônio e sulfonamidas (*qacE*, *qacEA1* e *qacEA1-sul1*) associados ao cassete de genes do *integron* de classe I.

MÉTODOS

Local de estudo e obtenção de amostras

O estudo foi realizado na ETEH que atende um complexo hospitalar localizado na Barra da Tijuca, no Rio de Janeiro, Brasil (22°59'42.36"S 43°21'49.62"O). Este complexo é formado por duas unidades de saúde que possuem um total de 322 leitos e realizam 30 mil atendimentos mensais. A estação de tratamento deste complexo tem capacidade para tratar 220 m³ de esgoto por dia. A coleta foi realizada em dezembro de 2010, quando foram retiradas alíquotas (500 mL de cada ponto) dos cinco pontos correspondentes às etapas do tratamento do efluente (Figura 1). As alíquotas foram coletadas em frascos estéreis de polietileno, refrigeradas a 4°C e transportadas para o laboratório.

Dosagens dos parâmetros físicos e químicos

Os parâmetros físicos e químicos, temperatura, pH, condutividade, oxigênio dissolvido (OD), turbidez, salinidade e cloro das amostras foram analisados utilizando os equipamentos portáteis *Water Quality Checker U-10* (Horiba) e medidor de cloro (Homis), respectivamente.

Deteção de antimicrobianos por cromatografia

A metodologia de extração das sulfonamidas foi baseada no método oficial da *United States - Environmental Protection Agency* (U.S. EPA) - Método 1694⁴⁰ e no método descrito por Monteiro et al.⁴¹. Uma alíquota de 25 mL de amostra filtrada foi acidificada com HCl concentrado para ajuste do pH a 2,5. Em seguida foram adicionados 25 mg de Na₂EDTA e prosseguiu-se para a etapa de extração por fase sólida, empregando-se cartuchos Oasis HLB 500 mg/6 mL (Waters, Millford, MA), previamente condicionados com 5 mL de metanol, 5 mL de água ultrapura e 5 mL de água acidificada com HCl concentrado a pH 2,5. Após uma lavagem com duas porções de 2,5 mL de água ultrapura para eliminação de interferentes, aplicou-se vácuo por 2 minutos para secar o cartucho na pressão de

aproximadamente 35 kPa e, em seguida, os analitos foram eluídos com duas porções de 3 mL de metanol e em seguida com duas porções de 2 mL de solução de metanol:acetona (1:1, v/v). Cinco mL do eluato foram separados para análise das sulfonamidas e evaporados à secura com N₂ à temperatura de, no máximo, 47,5°C. O extrato seco contido no tubo de centrifuga foi reconstituído com 1 mL do solvente de reconstituição (80:20 [v/v] de 0,1% v/v de ácido fórmico em água e metanol). Em seguida, foi agitado em vórtex, filtrado em filtro de fibra de vidro/nylon 0,2 µm e transferido para *vial*, para injeção no sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplado à Espectrometria de Massas Sequencial (LC-MS/MS)⁴¹. O sistema de LC-MS/MS é composto de cromatógrafo a líquido de alta eficiência *Shimadzu Prominence* (com os seguintes módulos: bomba quaternária LC-20AD, desgaseificador de membrana DGU-20A5, autoamostrador SIL-20AC, forno de coluna CTO-20AC e controladora CBM-20A) e detector API5000 Applied Biosystems/MDS Sciex com fonte Turbo V® e sonda TurbolonSpray®, controlado pelo *software* Analyst versão 1.4.2 do mesmo fabricante. Os antimicrobianos foram separados a 25°C em coluna C18 (Pursuit™ RS, 2,0 mm x 100 mm x 3 µm - Agilent), com coluna de guarda do mesmo tipo (2,0 mm x 3 µm). As fases móveis utilizadas no programa de eluição gradiente foram 0,1% v/v de ácido fórmico em água (fase móvel A), 0,1% v/v de ácido fórmico em acetonitrila (fase móvel B) e 0,1% v/v de ácido fórmico em metanol (fase móvel C). A programação de eluição gradiente, bem como os parâmetros do espectrômetro de massas encontram-se descritos em Monteiro et al.⁴¹.

Isolamento e identificação bioquímica de *P. aeruginosa*

Após homogeneização, alíquotas de 2 mL, de cada ponto da ETEH foram inoculadas em 5 mL de caldo nutriente e incubadas por 24 h a 37°C. A alíquota da etapa ETEH 1 também foi inoculada em meio de cultura líquido Lethen (DIFCO™) e incubada por 72 h a 37°C. Em seguida, as culturas bacterianas foram semeadas por esgotamento em ágar nutriente e ágar cetrimide (DIFCO™), e incubadas nas mesmas condições. A coloração de Gram e provas bioquímicas convencionais foram realizadas para identificação das cepas, de acordo com o Manual Bergey's⁴². Bastonetes Gram-negativos (BGN) foram submetidos às seguintes provas bioquímicas: Sulfureto, Indol e Motilidade (SIM), catalase, oxidase, OF-glicose, xilose, manitol, lactose, lisina, arginina, ornitina descarboxilase, gelatina e incubação a 42°C.

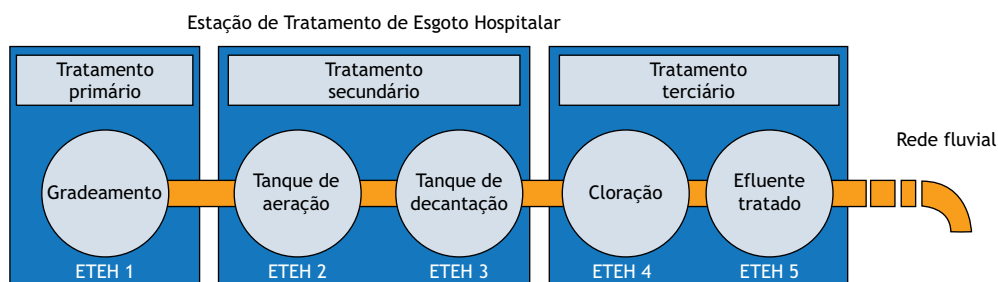


Figura 1. Esquema da estação de tratamento de esgoto do complexo hospitalar (Hospital Municipal Lourenço Jorge e Maternidade Leila Diniz).



Extração de DNA e identificação molecular

Os isolados, previamente identificados fenotipicamente foram certificados por metodologia molecular. A extração do DNA genômico foi realizada utilizando o *kit Dnaeasy® Blood&Tissue* (Qiagen GmgH, Hilden, Germany), de acordo com as instruções do fabricante. A identificação de isolados foi confirmada pela amplificação do gene que codifica a subunidade 16S do rRNA específico de *P. aeruginosa*. As reações foram realizadas com 50 µL de mistura de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) nas seguintes condições: 50 ng de DNA molde, 50 pmol de cada iniciador (PA-SS-F e PA-SS-R) descritos por Spilker et al.⁴³, 0,2 mmol.l⁻¹ de cada desoxinucleotídeo trifosfatado (dNTPs), 1X PCR *buffer* (pH 9,0), 2,5 mmol.l⁻¹ MgCl₂ e 2U de *Taq Platinum DNA Polymerase* (Invitrogen) (Tabela 1). Foram utilizadas como controle das PCR as cepas de referência *P. aeruginosa* INCQS 0024 (ATCC 29336) e *E. coli* INCQS 0033 (ATCC 25922). Os produtos da PCR foram analisados após eletroforese por 1 h a 50 V em gel de agarose 1% no tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) 0,5X, que foi corado com brometo de etídio (3 mg/mL). Utilizou-se o 100 bp DNA *ladder* (Invitrogen) como padrão de peso molecular. Após a eletroforese, a imagem do gel foi visualizada pelo *software* de vídeo documentação ImageQuant 300 (GE *Healthcare*). A especificidade dos iniciadores e da PCR foi estabelecida anteriormente com cepas de referência. O fragmento foi purificado com o *kit QIAquick PCR Purification* (Qiagen) e sequenciado com o *kit BigDye® Terminator Cycle Sequencing Standard Version 3.1* (Applied Biosystems™), por eletroforese capilar em aparelho ABI 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems™), na Plataforma do Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde da Fundação Oswaldo Cruz (PDTIS/Fiocruz). A análise de similaridade das sequências foi realizada pelo programa BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), no *GenBank*.

Suscetibilidade aos antibióticos

O perfil de suscetibilidade aos antibióticos foi determinado pela técnica de disco-difusão (método de Kirby-Bauer), segundo os

critérios estabelecidos pelo *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI)⁴⁴. A turvação das suspensões utilizadas para testes de sensibilidade foi ajustada em solução salina estéril (NaCl 0,85%) para a obtenção do padrão de turbidez 0,5 na escala de McFarland e foram inoculadas em meio ágar Mueller-Hinton (DIFCO). Os isolados obtidos foram testados quanto à resistência frente a 13 antimicrobianos (CEFAR®). Os antibióticos empregados foram os seguintes: Piperacilina/tazobactam (PPT-110 µg), ticarcilina/ácido clavulânico (TIC-85 µg), ceftazidima (CAZ-30 µg), cefepime (CPM-30 µg), imipenem (IPM-10 µg), meropem (MER-10 µg), aztreonam (ATM-30 µg), gentamicina (GEN-10 µg), tobramicina (TOB-10 µg), sulfonamida (SUL-300 µg), ciprofloxacina (CIP-5 µg), norfloxacina (NOR-10 µg) e polimixina B (POL-300 UI). O controle de qualidade dos discos de antibióticos foi realizado usando-se as cepas de referência *P. aeruginosa* INCQS 00099 (ATCC 853), *Staphylococcus aureus* INCQS 00015 (ATCC 25923) e *E. coli* INCQS 00033 (ATCC 25922). Foram estabelecidos três padrões de resistência (Sensível - S, Resistente - R e Multidroga resistente - MDR) para os isolados analisados⁴⁵.

Detecção dos genes *qacE*, *qacEΔ1* e *qacEΔ1-sul1*

A mistura da PCR teve o volume final de 50 µL contendo os seguintes reagentes: 50 ng de DNA molde, 50 pmol de cada iniciador (Tabela 1), 0,2 mmol.l⁻¹ de cada dNTP, 1X PCR *buffer* (pH 9,0), 1,5 mmol.l⁻¹ MgCl₂ e 1U de *Taq Platinum DNA Polymerase* (Invitrogen). Os programas utilizados para cada iniciador estão descritos na Tabela 1. Foi utilizada como controle positivo do gene *qacEΔ1*, *P. aeruginosa* 531-95²⁷ (*Genbank* GU182337). O produto da PCR foi analisado em gel de eletroforese por 1 h a 50 V em gel de agarose 1% no tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) 0,5X, que foi corado com brometo de etídio (3 mg/mL). Utilizou-se o 100 bp DNA *ladder* (Invitrogen) como padrão de peso molecular. Após a eletroforese, a imagem do gel foi realizada usando-se o *software* de vídeo documentação ImageQuant 300 (GE *Healthcare*).

Tabela 1. Iniciadores e programas de amplificação utilizados.

Gene alvo	Iniciadores	Sequência	Programa	Tamanho do Fragmento	Referência	
16S rRNA	PA-SS_F	5'-GGGGATCTTCGACCTCA-3'	95°C - 2' 94°C - 20'' 55°C - 1' 72°C - 1'	25X	956 pb	43
<i>P. aeruginosa</i>	PA-SS_R	5'-TCCTTAGAGTGCCACCG-3'	72°C - 7'			
<i>qacE</i>	F1N	5'-GCCCTACACAAATTGGGAGA-3'	94°C - 3' 94°C - 30'' 57°C - 90''	30X	319 pb	46
	R2B	5'-TACTACACCACTAACTATGA-3'	72°C - 1' 72°C - 10'			
<i>qacEΔ1</i>	FQ1	5'-CCCGAATTCATGAAAGGTGG-3'	94°C - 3' 94°C - 30'' 57°C - 90''	35X	350 pb	35
	FQ2	5'-TATAAGCTTTCACCTGGCG-3'	72°C - 1' 72°C - 10'			
<i>qacEΔ1</i> e <i>sul1</i>	P1_Qdelta1	5'-TAGCGAGGGCTTTACTAAGC-3'	94°C - 5' 94°C - 30'' 60°C - 1'	35X	800 pb	Este estudo
	<i>Sul1</i> R	5'-GCCGATCGCGTAAGTTCCG-3'	72°C - 2' 72°C - 7'			

Pb: pares de bases



Tabela 2. Parâmetros físico-químicos.

Parâmetro	Pontos de Coleta da Estação de Tratamento de Esgoto Hospitalar					
	Resolução Conama n° 430/2011	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4	Ponto 5
pH	5,0 a 9,0	7,6	7,9	8,2	8,4	8,4
Condutividade (mS/cm)	-	0,82	0,38	0,38	0,48	0,35
Turbidez (UNT ^a)	< 100	10	99	6	4	7
Oxigênio Dissolvido (mg/L)	-	4,5	9,2	9,3	9,2	3,7
Temperatura (°C)	< 40	29	29	29	29	29
Salinidade (%)	-	0	0	0	0	0
Cloro (ppm)	-	1,0	1,0	1,0	> 10	0,01

^a Unidades Nefelométricas de Turbidez; Conama: Conselho Nacional do Meio Ambiente; ppm: partes por milhão.

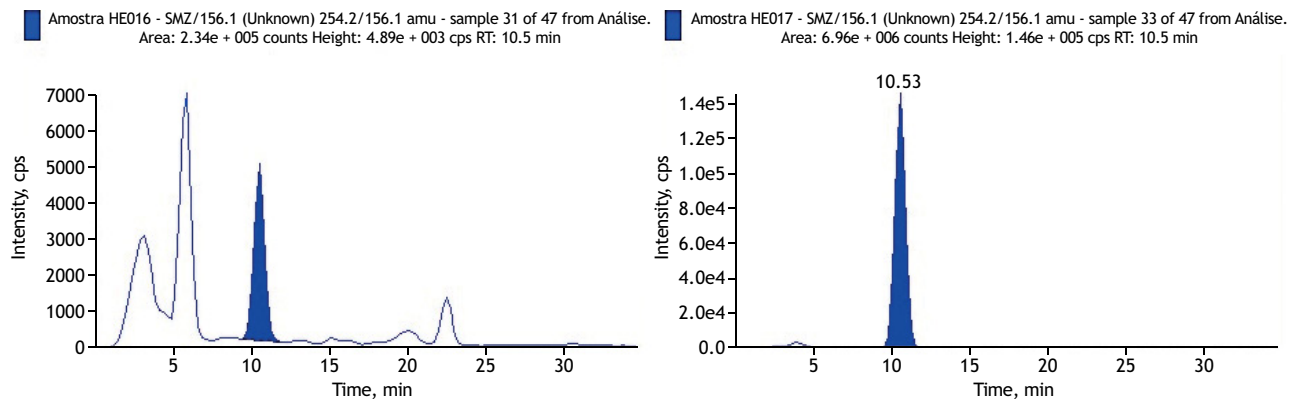


Figura 2a. Detecção de sulfametoxazol no afluente da ETEH (Amostra HE016) e no efluente tratado (Amostra HS017).

RESULTADOS

Dosagem dos parâmetros físico-químicos

O pH das amostras apresentou variação entre 7,6 e 8,4. A condutividade variou entre 0,82 mS/cm e 0,35 mS/cm. O índice de turbidez apresentou maior índice no ponto 2 (99 UNT) em face da injeção de O₂ e o índice de oxigênio dissolvido (DO) iniciou em 4,5 mg/L, posteriormente manteve índices entre 9,2-9,3 mg/L e reduziu para 3,7 mg/L no efluente tratado. A concentração de cloro ativo iniciou em 1,0 ppm, e teve um aumento significativo no ponto onde houve a adição do composto químico. A temperatura e o nível de salinidade permaneceram iguais em todos os pontos (Tabela 2).

Detecção de antimicrobianos por cromatografia

O antimicrobiano sulfametoxazol foi identificado em duas amostras, uma do afluente hospitalar da ETEH e outra do efluente tratado, ambas em concentração inferior a 50 ng·L⁻¹ (limite de quantificação do método) (Figura 2a). A Figura 2b apresenta a injeção de uma solução padrão contendo o sulfametoxazol que também foi injetada no LC-MS/MS, para fins de comparação.

Isolamento de *P. aeruginosa*

Foram isoladas 21 cepas de BGN, móveis; H₂S, indol e lactose negativas; xilose variáveis; oxidativas; manitol, lisina, arginina, ornitina, gelatina, catalase e crescimento a 42°C positivas.

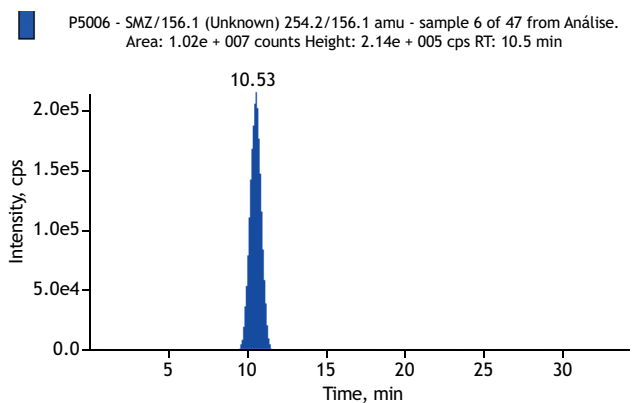


Figura 2b. Detecção de Sulfametoxazol em solução padrão.

A PCR das cepas de *P. aeruginosa* resultou na amplificação de um fragmento de 956 pb em 95% (20/21) das cepas.

Suscetibilidade aos antimicrobianos

A suscetibilidade aos antibióticos apresentou maiores percentuais de resistência às sulfonamidas e às quinolonas, seguido pelas outras três classes analisadas (Figura 3). A análise dos dados do antibiograma revelou 13 perfis de resistência distintos entre os isolados (Tabela 3). Quarenta e cinco por cento apresentaram o fenótipo MDR, destes 44% foram da etapa de cloração da estação (Figura 4).

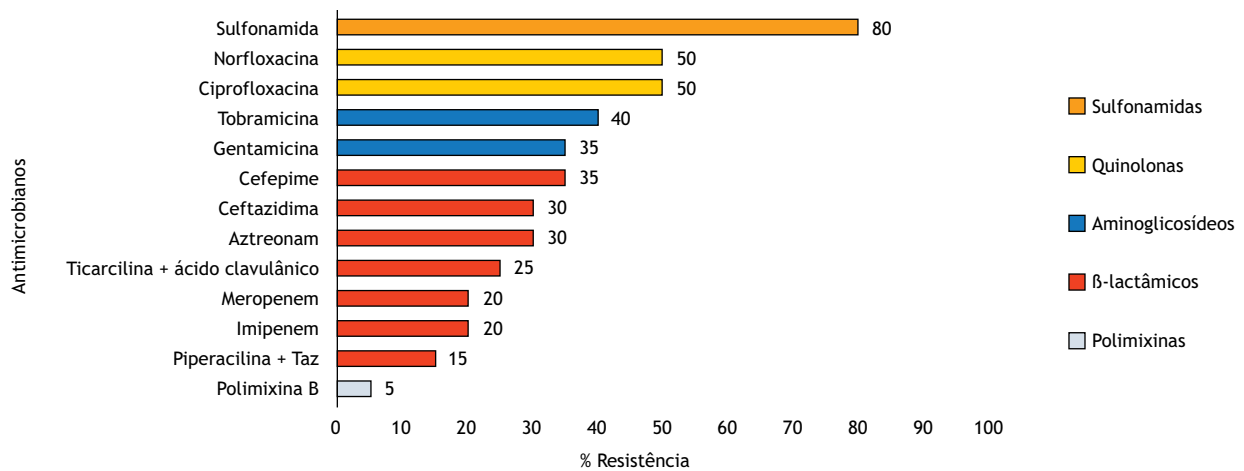
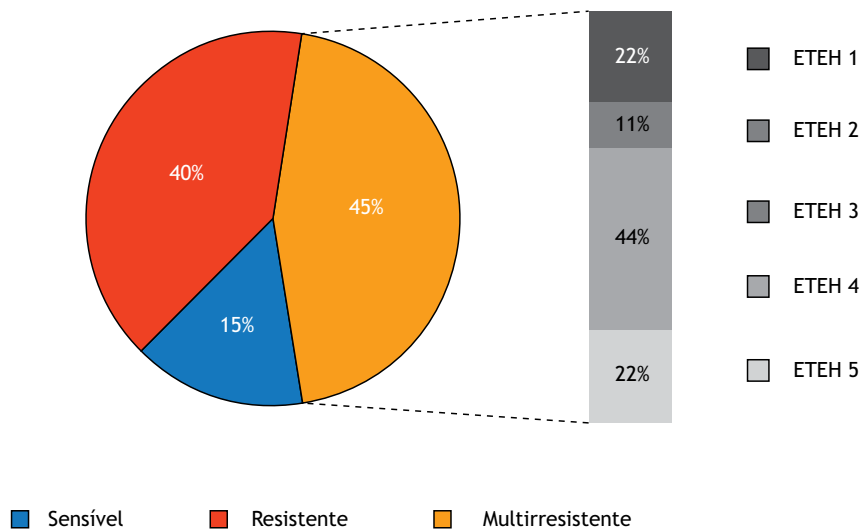


Figura 3. Suscetibilidade às classes de antibióticos nas cepas de *P. aeruginosa*.

Tabela 3. Perfil de resistência aos antimicrobianos das cepas de *P. aeruginosa* de acordo com o ponto de coleta das cepas.

Perfil	Resistência	N° de isolados	Origem
I	SUSCETÍVEL A TODOS	2	ETEH 2, 3, 5
II	SUL	6	ETEH 2, 5
III	TOB, CIP	1	ETEH 3
IV	CAZ, CPM	1	ETEH 5
V	GEN, NOR, SUL	1	ETEH 2
VI	TOB, CIP, NOR, SUL	1	ETEH 1
VII	TIC, ATM, CIP, NOR, SUL	1	ETEH 1
VIII	CPM, GEN, TOB, ATM, CIP, NOR, SUL	2	ETEH 5
IX	TIC, CAZ, CPM, ATM, CIP, NOR, SUL	1	ETEH 1
X	CAZ, GEN, TOB, IPM, MER, CIP, NOR, SUL	1	ETEH 4
XI	PPT, TIC, CAZ, CPM, GEN, TOB, IPM, MER, CIP, NOR, SUL	1	ETEH 4
XII	PPT, TIC, CAZ, CPM, GEN, TOB, ATM, IPM, MER, CIP, NOR, SUL	1	ETEH 4
XIII	PPT, TIC, CAZ, CPM, GEN, TOB, ATM, IPM, MER, CIP, NOR, SUL, POL	1	ETEH 4

PPT: Piperacilina+Tazobactam; TIC: Ticarcilina + Ácido Clavulânico; CAZ: Ceftazidima; CPM: Cefepime; GEN: Gentamicina; TOB: Tobramicina; ATM: Aztreonam; IPM: Imipenem; MER: Meropenem; CIP: Ciprofloxacina; NOR: Norfloxacina; SUL: Sulfonamida; POL: Polimixina. ETEH: Estação de tratamento de esgoto hospitalar; ETEH 1: entrada do esgoto; ETEH 2: tanque de aeração; ETEH 3: tanque de decantação; ETEH 4: cloração; ETEH 5: efluente tratado.



ETEH 1: entrada do esgoto; ETEH 2: tanque de aeração; ETEH 3: tanque de decantação; ETEH 4: cloração; ETEH 5: efluente tratado.

Figura 4. Fenótipos de suscetibilidade aos antimicrobianos dos isolados de *P. aeruginosa*.



Detecção dos genes *qacE*, *qacEA1* e *qacEA1-sul1*

As 20 cepas de *P. aeruginosa* foram submetidas à PCR para verificar a presença dos genes *qacE*, *qacEA1* e *qacEA1-sul1*. O gene *qacE* não foi detectado em nenhum dos isolados. No entanto, o gene *qacEA1* foi verificado em 90% (18/20) dos isolados analisados apresentando um fragmento de 400 pb. Enquanto os genes *qacEA1-sul1* amplificados em conjunto, apresentaram um fragmento único de aproximadamente 800 pb em 100% (20/20) das cepas. O fragmento da cepa *P. aeruginosa* P5520, utilizada como controle positivo da PCR, foi sequenciado e demonstrou identidade de 96%-98% com sequências do banco de dados. Esta sequência foi depositada no *GenBank* sob o número de acesso MF801598.

DISCUSSÃO

Os hospitais são considerados nichos ecológicos para bactérias resistentes aos antibióticos e desempenham um papel importante no surgimento e disseminação de resistência. Essas bactérias deixam hospitais por meio de pacientes colonizados e também através dos sistemas de tratamento de águas residuais⁴⁸.

No presente estudo, foram isoladas cepas de *P. aeruginosa* em todos os pontos de coleta da estação de tratamento de esgoto hospitalar, inclusive na etapa final na qual o efluente já se encontra tratado e apto a ser liberado para os corpos hídricos. Um fato intrigante foi a ausência de células viáveis de *P. aeruginosa*, na 1ª etapa da estação (chegada do afluente). Porém, a presença de crescimento bacteriano após cultivo em meio de cultura contendo inibidores de alguns princípios ativos de antissépticos e desinfetantes, nos permitiu constatar que os microrganismos estavam sob ação bacteriostática desses produtos e de outros antimicrobianos. Os QAC são um dos surfactantes mais utilizados na desinfecção do ambiente hospitalar e que quando liberados nos ambientes aquáticos apresentam ação antimicrobiana em concentrações relativamente baixas^{49,50}. Além da atividade bactericida e/ou bacteriostática, esses produtos podem aumentar a pressão seletiva e a resistência aos antibióticos e biocidas⁵¹.

Nossos resultados revelaram alta diversidade nos perfis de resistência e alta frequência de cepas MDR nas diferentes etapas do tratamento do esgoto hospitalar. O maior índice de cepas com fenótipo MDR no ponto da cloração, provavelmente está relacionado ao favorecimento da transferência de plasmídeos de resistência durante o processo de cloração, etapa crítica do tratamento. Desde a década de 1970, estudos sobre o efeito da cloração em bactérias resistentes aos antibióticos descrevem um aumento considerável de bactérias resistentes a múltiplos antibióticos na água e no esgoto^{52,53,54}. Além de apresentar o maior número de cepas MDR, no ponto ETEH 4 foi encontrado um isolado resistente a todos os antibióticos testados, inclusive à polimixina B, que é considerada altamente eficaz frente a cepas de *P. aeruginosa*, segundo o Programa de Vigilância Epidemiológica (SENTRY - 2001 a 2004)⁵⁵.

A presença de cepas MDR na etapa onde o efluente já se encontra tratado demonstra certa limitação do tratamento na eliminação

desses patógenos. Essa limitação pode estar associada ao tamanho da população microbiana inicial, aos diferentes estágios de desenvolvimento do microrganismo, à concentração do desinfetante, ao potencial hidrogeniônico do efluente (pH) e ao tempo de exposição ao desinfetante⁵⁶. A avaliação da suscetibilidade aos antibióticos de *Pseudomonas* spp. em afluentes e efluentes de uma estação de tratamento de esgoto demonstrou a presença de cepas resistentes aos antibióticos carbapenêmicos somente no efluente tratado⁵⁷.

Nossos resultados demonstraram claramente que as condições físico-químicas do ambiente e a presença de antimicrobianos provavelmente afetaram os fenótipos de suscetibilidade aos antibióticos dessas bactérias. Além disso, sabe-se que os antibióticos em concentrações subinibitórias podem ter um impacto sobre as funções celulares e alterar a expressão de fatores de virulência ou a transferência de genes de resistência aos antibióticos⁵⁸.

Por outro lado, a baixa suscetibilidade observada frente às sulfonamidas (80%), seguida pela ciprofloxacina e norfloxacina (50%), merece destaque. Embora não tivéssemos informações sobre as prescrições terapêuticas nesses hospitais, a presença de uma sulfonamida, a sulfametoxazol, tanto no esgoto bruto quanto no tratado, observada em nossos dados nos permite sugerir que a utilização de altas concentrações desses antimicrobianos pode interferir na indução de mutações na enzima DNA girase ou na superexpressão do sistema de efluxo, contribuindo para essa resistência^{17,59}. As sulfonamidas também podem resistir fortemente à biodegradação natural, como refletido na alta frequência de sua detecção em ambientes aquáticos. Pesquisadores do *U. S. Geological Service* (USGS) demonstraram a detecção de sulfametoxazol em rios e córregos com frequências de até 27%⁶⁰. Além disso, sua baixa tendência para partição em sedimentos permite que eles sejam transportados por longas distâncias em águas correntes. Perez et al.⁶¹ realizaram a avaliação da degradabilidade da sulfamethazine, sulfametoxazol e sulfatiazol em amostras de águas superficiais. Após mais de um mês, as sulfonamidas não foram degradadas por microrganismos de águas superficiais em um reator de batelada.

Considerando a composição do esgoto hospitalar e a baixa suscetibilidade encontrada às sulfonamidas em nossos isolados (60%), resolvemos investigar a presença dos genes *sul1*, *qacE* e *qacEA1*, que conferem resistência à sulfonamida e aos QAC, respectivamente. Verificamos então que a detecção do gene *sul1* não coincidiu com os resultados revelados pelo fenótipo, nos quais 80% dos isolados apresentaram resistência à sulfonamida e 100% deles apresentaram o gene *sul1*. Esse percentual de resistência pode ter ocorrido devido à ausência de expressão do gene *sul1*. Grape et al.⁶² demonstraram que dentre 105 isolados clínicos da família Enterobacteriaceae, 64 foram resistentes às sulfonamidas. O gene *sul1* foi encontrado em 14 isolados, o gene *sul2* em 23 isolados, os genes *sul1* e *sul2* foram simultaneamente detectados em 25 isolados e o gene *sul3* foi encontrado somente em dois isolados.

A distribuição dos genes *qacE* e *qacEA1* foi avaliada em isolados Gram-negativos de origem clínica e ambiental por Kazama et al.⁴⁶



O percentual de cepas positivas para esses dois genes em isolados clínicos de *P. aeruginosa* (n = 63) foi 65% para *qacEA1* e 24% para *qacE*. Já em cepas ambientais de *P. aeruginosa* (n = 5) a distribuição foi de 40% para *qacEA1* e nenhum para *qacE*. Outro estudo também detectou a presença de *qacEA1* em 48% dos isolados clínicos de *P. aeruginosa* (n = 60), sendo encontrado em 88% das cepas MDR e em 35% das não multirresistentes, o que reforça a associação da presença deste gene com a multirresistência aos antimicrobianos²⁷.

O presente estudo demonstrou a presença dos genes *qacEA1-sul1* em 100% dos isolados do esgoto hospitalar (45% MDR, 40% R e 15% S) e a ausência do gene *qacE*. Essa ausência, muito provavelmente, se deve à inserção do segmento contendo o gene de resistência à sulfonamida (*sul1*) próximo a região 3' do gene *qacE*, transformando-o em *qacEA1*³².

Os genes *qacEA1* e *sul1* estão frequentemente associados a integrons classe 1^{63,64,65}. A associação desses genes em integron classe 1 foi detectada em 97% de isolados de bactérias do gênero *Salmonella* em Portugal⁶⁶. Assumindo que a presença desses genes sugere fortemente a presença de um integron de classe 1, podemos concluir que estes elementos estão amplamente distribuídos nas diferentes etapas do sistema de tratamento desse esgoto hospitalar.

Compostos à base de QAC estão frequentemente presentes em formulações de biocidas catiônicos. Assim sendo, o uso desses produtos pode ter um papel importante, porém indireto, na seleção de bactérias resistentes aos antibióticos⁶⁷. Genes de resistência aos QAC, especialmente relacionados às bombas de efluxo, são amplamente encontrados em estabelecimentos de assistência à saúde humana e animal. Bombas de efluxo específicas ou multidroga são importantes determinantes de resistência intrínseca e/ou adquirida aos antimicrobianos. Alguns desses elementos acomodam resistência a ambos antibióticos e biocidas. Este fato, ainda não bem compreendido, pode conduzir à seleção de organismos antibiótico-resistentes via seleção por biocidas^{31,68}.

A exposição a antibióticos, biocidas ou metais pesados e muitos outros fatores ambientais diferentes resulta em um aumento de células contendo integrons^{39,69,70}. Além disso, a exposição a diferentes antibióticos (aminoglicosídeos, β -lactâmicos, fluoroquinolonas, entre outros) facilita a recombinação de casete de genes; envolvendo ocasionalmente a superexpressão da integrase *IntI1* desencadeada pelo sistema SOS que induz a

desativação de *LexA*^{71,72}. A tendência atual, de uso mais amplo e indiscriminado de biocidas, pode conduzir à emergência de novos elementos genéticos, com consequências imprevisíveis para o bem-estar humano².

É evidente que, embora exista uma compreensão geral sobre as origens, os mecanismos de aquisição e a disseminação de genes de resistência aos antibióticos nas populações microbianas, ainda faltam muitos detalhes a serem esclarecidos a esse respeito. Esses aspectos pouco esclarecidos, em grande parte, ocorrem porque os estudos se concentram principalmente nas propriedades de patógenos de origem clínica e pouco esforço tem sido despendido para estabelecer o comportamento de cepas ambientais.

CONCLUSÕES

De acordo com os resultados apresentados foi possível concluir que a presença de *P. aeruginosa* resistente aos antibióticos em todas as etapas da ETEH do complexo hospitalar estudado tem caráter relevante na avaliação da eficiência do tratamento biológico de efluentes hospitalares. A detecção do maior percentual de cepas MDR na etapa de cloração sugere aumento da transferência horizontal e a disseminação de genes e organismos de resistência.

A presença de cepas de *P. aeruginosa* resistentes e de MDR no efluente tratado indica que o tratamento apresentou limitações na eliminação desses patógenos e alerta para os riscos à comunidade local, uma vez que o destino final desse efluente é um complexo lagunar utilizado como recreação e pesca de subsistência.

Embora com limitações em função do número reduzido de cepas estudadas, os resultados obtidos são altamente impactantes, pois foram detectadas cepas microbianas resistentes a antibióticos utilizados no tratamento de infecções graves, como as cefalosporinas de quarta geração, drogas carbapenêmicas e até resistência à polimixina, um dos últimos recursos no arsenal terapêutico antimicrobiano.

Os dados obtidos no presente estudo colaboram com a interpretação da eficiência do tratamento do resíduo líquido hospitalar. Além disso, poderão contribuir com a Vigilância Ambiental em Saúde no que se refere ao desenho de ações preventivas aos impactos negativos desses efluentes nos sistemas aquáticos e na saúde pública.

REFERÊNCIAS

1. Fuentefria DB, Ferreira AE, Corção G. Antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* from hospital wastewater and superficial water: are they genetically related? *J Environ Manage*. 2011;92(1):250-5. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2010.09.001>
2. Gillings MR. Evolutionary consequences of antibiotic use for the resistome, mobilome and microbial pangenome. *Front Microbiol*. 2013;22;4:4. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00004>
3. Emmanuel E, Perrodin Y, Keck G, Blanchard JM, Vermande P. Ecotoxicological risk assessment of hospital wastewater: a proposed framework for raw effluents discharging into urban sewer network. *J Hazard Mater*. 2005;14;117(1):1-11. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2004.08.032>
4. Perron GG, Gonzalez A, Buckling A. The rate of environmental change drives adaptation to an antibiotic sink. *J Evol Biol*. 2008;21(6):1724-31. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2008.01596.x>



5. Rizzo L, Fiorentino A, Anselmo A. Advanced treatment of urban wastewater by UV radiation: effect on antibiotics and antibiotic-resistant *E. coli* strains. *Chemosphere*. 2013;92(2):171-6. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.03.021>
6. Santoro DO, Cardoso AM, Coutinho FH, Pinto LH, Vieira RP, Albano RM et al. Diversity and antibiotic resistance profiles of *Pseudomonads* from a hospital wastewater treatment plant. *J Appl Microbiol*. 2015;119(6):1527-40. <https://doi.org/10.1111/jam.12936>
7. Garcia LP, Zanetti-Ramos BG. Gerenciamento dos resíduos de serviços de saúde: uma questão de biossegurança. *Cad Saude Publica*. 2004;20(3):744-52. <https://doi.org/10.1590/S0102-311X2004000300011>
8. Livermore DM. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clin Infect Dis*. 2002;1;34(5):634-40. <https://doi.org/10.1086/338782>
9. McGowan JE Jr. Resistance in nonfermenting gram-negative bacteria: multidrug resistance to the maximum. *Am J Med*. 2006;119(6 Suppl 1):S29-36.
10. Alekshun MN, Levy SB. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell*. 2007;128(6):1037-50. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.03.004>
11. Miranda CC, Filippis I, Pinto LH, Coelho-Souza T, Bianco K, Cacci LC et al. Genotypic characteristics of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* from hospital wastewater treatment plant in Rio de Janeiro, Brazil. *J Appl Microbiol*. 2015;118(6):1276-86. <https://doi.org/10.1111/jam.12792>
12. Magalhães MJ, Pontes G, Serra PT, Balieiro A, Castro D, Pieri FA et al. Multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* survey in a stream receiving effluents from ineffective wastewater hospital plants. *BMC Microbiol*. 2016;24;16(1):193. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0798-0>
13. Prado T, Pereira WC, Silva DM, Seki LM, Carvalho AP, Asensi MD. Detection of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in effluents and sludge of a hospital sewage treatment plant. *Lett Appl Microbiol*. 2008;46(1):136-41. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02275.x>
14. Fuentefria DB, Ferreira AE, Gräf T, Corção G. *Pseudomonas aeruginosa*: disseminação de resistência antimicrobiana em efluente hospitalar e água superficial. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2008;41(5):470-3. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822008000500007>
15. Huovinen P, Sundström L, Swedberg G, Sköld O. Trimethoprim and sulfonamide resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995;39(2):279-89. <https://doi.org/10.1128/AAC.39.2.279>
16. Enne VI, Livermore DM, Stephens P, Hall LM. Persistence of sulphonamide resistance in *Escherichia coli* in the UK despite national prescribing restriction. *Lancet*. 2001;28;357(9265):1325-8. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)04519-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)04519-0)
17. Sköld O. Sulfonamide resistance: mechanisms and trends. *Drug Resist Updat*. 2000;3(3):155-60. <https://doi.org/10.1054/drup.2000.0146>
18. Yun MK, Wu Y, Li Z, Zhao Y, Waddell MB, Ferreira AM, et al. Catalysis and sulfa drug resistance in dihydropteroate synthase. *Science*. 2012;335(6072):1110-4. <https://doi.org/10.1126/science.1214641>
19. Heuer H, Szczepanowski R, Schneiker S, Pühler A, Top EM, Schlüter A. The complete sequences of plasmids pB2 and pB3 provide evidence for a recent ancestor of the IncP-1beta group without any accessory genes. *Microbiology*. 2004;150(Pt 11):3591-9. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27304-0>
20. Byrne-Bailey KG, Gaze WH, Kay P, Boxall AB, Hawkey PM, Wellington EM. Prevalence of sulfonamide resistance genes in bacterial isolates from manured agricultural soils and pig slurry in the United Kingdom. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(2):696-702. <https://doi.org/10.1128/AAC.00652-07>
21. Lanz R, Kuhnert P, Boerlin P. Antimicrobial resistance and resistance gene determinants in clinical *Escherichia coli* from different animal species in Switzerland. *Vet Microbiol*. 2003;91(1):73-84. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00263-8](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00263-8)
22. Perreten V, Boerlin P. A new sulfonamide resistance gene (*sul3*) in *Escherichia coli* is widespread in the pig population of Switzerland. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;47(3):1169-72. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.3.1169-1172.2003>
23. Hall RM, Collis CM, Kim MJ, Partridge SR, Recchia GD, Stokes HW. Mobile gene cassettes and integrons in evolution. *Ann N Y Acad Sci*. 1999;870:68-80. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1999.tb08866.x>
24. Harbottle H, Thakur S, Zhao S, White DG. Genetics of antimicrobial resistance. *Anim Biotechnol*. 2006;17(2):111-24. <https://doi.org/10.1080/10495390600957092>
25. Hendrickx L, Hausner M, Wuertz S. Natural genetic transformation in monoculture *Acinetobacter* sp. strain BD413 biofilms. *Appl Environ Microbiol*. 2003;69(3):1721-7. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.3.1721-1727.2003>
26. Barlow RS, Pemberton JM, Desmarchelier PM, Gobius KS. Isolation and characterization of integron-containing bacteria without antibiotic selection. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48(3):838-42. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.3.838-842.2004>
27. Romão C, Miranda CA, Silva J, Mandetta Clementino M, de Filippis I, Asensi M. Presence of *qacEΔ1* gene and susceptibility to a hospital biocide in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* resistant to antibiotics. *Curr Microbiol*. 2011;63(1):16-21. <https://doi.org/10.1007/s00284-011-9934-0>
28. Mahzounieh M, Khoshnood S, Ebrahimi A, Habibian S, Yaghoobian M. Detection of antiseptic-resistance genes in *Pseudomonas* and *Acinetobacter* spp: isolated from burn patients. *Jundishapur J Nat Pharm Prod*. 2014;9(2):e15402.
29. Bjorland J, Sunde M, Waage S. Plasmid-borne *smr* gene causes resistance to quaternary ammonium compounds in bovine *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*. 2001;39(11):3999-4004. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.11.3999-4004.2001>
30. Wassenaar TM, Ussery D, Nielsen LN, Ingmer H. Review and phylogenetic analysis of *qac* genes that reduce susceptibility to quaternary ammonium compounds in



- Staphylococcus* species. Eur J Microbiol Immunol (Bp). 2015;5(1):44-61. <https://doi.org/10.1556/EuJMI-D-14-00038>
31. Tezel U, Pavlostathis SG. Quaternary ammonium disinfectants: microbial adaptation, degradation and ecology. Curr Opin Biotechnol. 2015;33:296-304. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2015.03.018>
 32. Paulsen IT, Brown MH, Skurray RA. Proton-dependent multidrug efflux systems. Microbiol Rev. 1996;60(4):575-608.
 33. Jaglic Z, Cervinkova D. Genetic basis of resistance to quaternary ammonium compounds - the *qac* genes and their role: a review. Vet Med (Praha). 2012;57(6):275-81.
 34. Cervinkova D, Babak V, Marosevic D, Kubikova I, Jaglic Z. The role of the *qacA* gene in mediating resistance to quaternary ammonium compounds. Microb Drug Resist. 2013;19(3):160-7. <https://doi.org/10.1089/mdr.2012.0154>
 35. Kücken D, Feucht H, Kaulfers P. Association of *qacE* and *qacEDelta1* with multiple resistance to antibiotics and antiseptics in clinical isolates of Gram-negative bacteria. FEMS Microbiol Lett. 2000;183(1):95-8. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(99\)00636-9](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(99)00636-9)
 36. Kampf G. Acquired resistance to chlorhexidine - is it time to establish an 'antiseptic stewardship' initiative? J Hosp Infect. 2016;94(3):213-27. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2016.08.018>
 37. Jennings MC, Forman ME, Duggan SM, Minbiole KPC, Wuest WM. Efflux pumps might not be the major drivers of QAC resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. ChemBiochem. 2017;18(16):1573-1577. <https://doi.org/10.1002/cbic.201700233>
 38. Canal N, Meneghetti KL, Almeida CP, Bastos MR, Otton LM, Corção G. Characterization of the variable region in the class 1 integron of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* isolated from surface water. Braz J Microbiol. 2016;47(2):337-44. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.01.015>
 39. Gaze WH, Abdoulsam N, Hawkey PM, Wellington EM. Incidence of class 1 integrons in a quaternary ammonium compound-polluted environment. Antimicrob Agents Chemother. 2005;49(5):1802-7. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.5.1802-1807.2005>
 40. U. S. Environment Protection Agency. EPA. 821-R-08-002. Method 1694: Pharmaceuticals and personal care products in water, soil, sediment, and biosolids by HPLC/MS/MS. Washington, DC: U. S. Environment Protection Agency; 2007.
 41. Monteiro MA, Spisso BF, Santos JR, Costa RP, Ferreira RG, Pereira UM et al. Occurrence of antimicrobials in river water samples from rural region of the state of Rio de Janeiro, Brazil. J Environ Prot (Irvine Calif). 2016;7(2):230-41. <https://doi.org/10.4236/jep.2016.72020>
 42. Garrity G, Brenner DJ, Krieg NR, Staley JR, editors. Bergey's Manual® of systematic bacteriology. New York: Springer; 2005. Volume 2: The Proteobacteria, Part B: The Gammaproteobacteria. Chapter 9: Pseudomonadales Orla-Jensen 1921, 270AL, p. 323-342.
 43. Spilker T, Coenye T, Vandamme P, LiPuma JJ. PCR-based assay for differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* from other *Pseudomonas* species recovered from cystic fibrosis patients. J Clin Microbiol. 2004;42(5):2074-9. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.5.2074-2079.2004>
 44. Clinical and Laboratory Standards Institute. M100S-26: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, twenty-sixth informational supplement. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015.
 45. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. Clin Microbiol Infect. 2012;18(3):268-81. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>
 46. Kazama H, Hamashima H, Sasatsu M, Arai T. Distribution of the antiseptic-resistance genes *qacE* and *qacE delta 1* in gram-negative bacteria. FEMS Microbiol Lett. 1998;159(2):173-8.
 47. Frank T, Gautier V, Talarmin A, Bercion R, Arlet G. Characterization of sulphonamide resistance genes and class 1 integron gene cassettes in Enterobacteriaceae, Central African Republic (CAR). J Antimicrob Chemother. 2007;59(4):742-5. <https://doi.org/10.1093/jac/dkl538>
 48. Rizzo L, Manaia C, Merlin C, Schwartz T, Dagot C, Ploy MC et al. Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: a review. Sci Total Environ. 2013;447:345-60. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.01.032>
 49. Maillard JY. Antimicrobial biocides in the healthcare environment: efficacy, usage, policies, and perceived problems. Ther Clin Risk Manag. 2005;1(4):307-20.
 50. Singh M, Sharma R, Gupta PK, Rana JK, Sharma M, Taneja N. Comparative efficacy evaluation of disinfectants routinely used in hospital practice: india. Indian J Crit Care Med. 2012;16(3):123-9. <https://doi.org/10.4103/0972-5229.102067>
 51. Santoro DO, Romão CM, Clementino MM. Decreased aztreonam susceptibility among *Pseudomonas aeruginosa* isolates from hospital effluent treatment system and clinical samples. Int J Environ Health Res. 2012;22(6):560-70. <https://doi.org/10.1080/09603123.2012.678000>
 52. Grabow WO, Middendorff IG, Prozesky OW. Survival in maturation ponds of coliform bacteria with transferable drug resistance. Water Res. 1973;7(11):1589-97. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(73\)90130-9](https://doi.org/10.1016/0043-1354(73)90130-9)
 53. Armstrong JL, Calomiris JJ, Seidler RJ. Selection of antibiotic-resistant standard plate count bacteria during water treatment. Appl Environ Microbiol. 1982;44(2):308-16.
 54. Murray GE, Tobin RS, Junkins B, Kushner DJ. Effect of chlorination on antibiotic resistance profiles of sewage-related bacteria. Appl Environ Microbiol. 1984;48(1):73-7.
 55. Gales AC, Jones RN, Sader HS. Global assessment of the antimicrobial activity of polymyxin B against 54 731 clinical isolates of Gram-negative bacilli: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme (2001-2004). Clin Microbiol Infect. 2006;12(4):315-21. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2005.01351.x>



56. Nwachuku N, Gerba CP. Emerging waterborne pathogens: can we kill them all? *Curr Opin Biotechnol.* 2004;15(3):175-80. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2004.04.010>
57. Luczkiewicz A, Kotlarska E, Artichowicz W, Tarasewicz K, Fudala-Ksiazek S. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas* spp. isolated from wastewater and wastewater-impacted marine coastal zone. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2015;22(24):19823-34. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5098-y>
58. Bernier SP, Surette MG. Concentration-dependent activity of antibiotics in natural environments. *Front Microbiol.* 2013;4:20. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00020>
59. Sköld O. Resistance to trimethoprim and sulfonamides. *Vet Res.* 2001;32(3-4):261-73. <https://doi.org/10.1051/vetres:2001123>
60. Kolpin DW, Furlong ET, Meyer MT, Thurman EM, Zaugg SD, Barber LB et al. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: a national reconnaissance. *Environ Sci Technol.* 2002;36(6):1202-11. <https://doi.org/10.1021/es011055j>
61. Pérez S, Eichhorn P, Aga DS. Evaluating the biodegradability of sulfamethazine, sulfamethoxazole, sulfathiazole, and trimethoprim at different stages of sewage treatment. *Environ Toxicol Chem.* 2005;24(6):1361-7. <https://doi.org/10.1897/04-211R.1>
62. Grape M, Sundström L, Kronvall G. Sulphonamide resistance gene *sul3* found in *Escherichia coli* isolates from human sources. *J Antimicrob Chemother.* 2003;52(6):1022-4. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg473>
63. Arabi H, Pakzad I, Nasrollahi A, Hosainzadegan H, Azizi Jalilian F, Taherikalani M et al. Sulfonamide resistance genes (*sul*) M in extended spectrum beta lactamase (ESBL) and non-ESBL producing *Escherichia coli* isolated from Iranian Hospitals. *Jundishapur J Microbiol.* 2015;8(7):e19961. <https://doi.org/10.5812/jjm.19961v2>
64. Sandvang D, Aarestrup FM, Jensen LB. Characterisation of integrons and antibiotic resistance genes in Danish multiresistant *Salmonella enterica* Typhimurium DT104. *FEMS Microbiol Lett.* 1998;160(1):37-41. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1998.tb12887.x>
65. Toleman MA, Walsh TR. Combinatorial events of insertion sequences and ICE in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 2011;35(5):912-35. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00294.x>
66. Antunes P, Machado J, Sousa JC, Peixe L. Dissemination of sulfonamide resistance genes (*sul1*, *sul2*, and *sul3*) in Portuguese *Salmonella enterica* strains and relation with integrons. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(2):836-9. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.2.836-839.2005>
67. Hegstad K, Langsrud S, Lunestad BT, Scheie AA, Sunde M, Yazdankhah SP. Does the wide use of quaternary ammonium compounds enhance the selection and spread of antimicrobial resistance and thus threaten our health? *Microb Drug Resist.* 2010;16(2):91-104. <https://doi.org/10.1089/mdr.2009.0120>
68. Poole K. Efflux-mediated antimicrobial resistance. *J Antimicrob Chemother.* 2005;56(1):20-51. <https://doi.org/10.1093/jac/dki171>
69. Wright MS, Baker-Austin C, Lindell AH, Stepanauskas R, Stokes HW, McArthur JV. Influence of industrial contamination on mobile genetic elements: class 1 integron abundance and gene cassette structure in aquatic bacterial communities. *ISME J.* 2008;2(4):417-28. <https://doi.org/10.1038/ismej.2008.8>
70. Stalder T, Barraud O, Casellas M, Dagot C, Ploy MC. Integron involvement in environmental spread of antibiotic resistance. *Front Microbiol.* 2012;9;3:119. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00119>
71. Guerin E, Cambray G, Sanchez-Alberola N, Campoy S, Erill I, Da Re S et al. The SOS response controls integron recombination. *Science.* 2009;324(5930):1034. <https://doi.org/10.1126/science.1172914>
72. Hocquet D, Llanes C, Thouverez M, Kulasekara HD, Bertrand X, Plésiat P et al. Evidence for induction of integron-based antibiotic resistance by the SOS response in a clinical setting. *PLoS Pathog.* 2012;8(6):e1002778. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002778>
73. Wellington EM, Boxall AB, Cross P, Feil EJ, Gaze WH, Hawkey PM et al. The role of the natural environment in the emergence of antibiotic resistance in gram-negative bacteria. *Lancet Infect Dis.* 2013;13(2):155-65. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(12\)70317-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(12)70317-1)

Conflito de Interesse

Os autores informam não haver qualquer potencial conflito de interesse com pares e instituições, políticos ou financeiros deste estudo.



Esta publicação está sob a licença Creative Commons Atribuição 3.0 não Adaptada. Para ver uma cópia desta licença, visite http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/deed.pt_BR.