

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

**Estudo da prevalência de *Staphylococcus aureus* resistentes à
meticilina (MRSA) isolados de águas residuais hospitalares**

Dissertação de Mestrado em Biologia Clínica Laboratorial

Jessica Lampreia Ribeiro

Professora Doutora Patrícia Poeta

Mestre Vanessa Silva



Vila Real, 2020

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

**Estudo da prevalência de *Staphylococcus aureus* resistentes à
meticilina (MRSA) isolados de águas residuais hospitalares**

Dissertação de Mestrado em Biologia Clínica Laboratorial

Jessica Lampreia Ribeiro

Professora Doutora Patrícia Poeta

Mestre Vanessa Silva

Composição do Júri:

Vila Real, 2020

A orientadora:

[Professora Doutora Patrícia Alexandra Curado Quintas Dinis Poeta]

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

A co-orientadora:

[Mestre Vanessa Natália dos Santos Silva]

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

*"It always seems impossible
Until it's done"*

Nelson Mandela

Agradecimentos

Com a conclusão desta dissertação, quero manifestar o meu sincero agradecimento ao conjunto de pessoas que tornou possível, direta ou indiretamente, a sua realização.

À Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro agradeço pela disponibilização do espaço pois sem ele não era possível iniciar este estudo.

À minha orientadora, Professora Doutora Patrícia Poeta, agradeço por ter disponibilizado o seu laboratório e material, pela orientação prestada ao longo de todo o trabalho, pela constante disponibilidade e simpatia e por todo o apoio demonstrado.

Ao Engenheiro Carlos Faria agradeço por ter autorizado a recolha das várias amostras.

À minha co-orientadora, Mestre Vanessa Silva, agradeço não só pela imprescindível orientação e disponibilidade, mas também por todo o apoio, carinho e amizade.

Às minhas colegas de trabalho, em especial à Andreia Monteiro e Cláudia Alfarela, agradeço por todo o apoio, amizade e companheirismo.

A toda a equipa do MicroART agradeço pela ajuda, companhia e boa disposição.

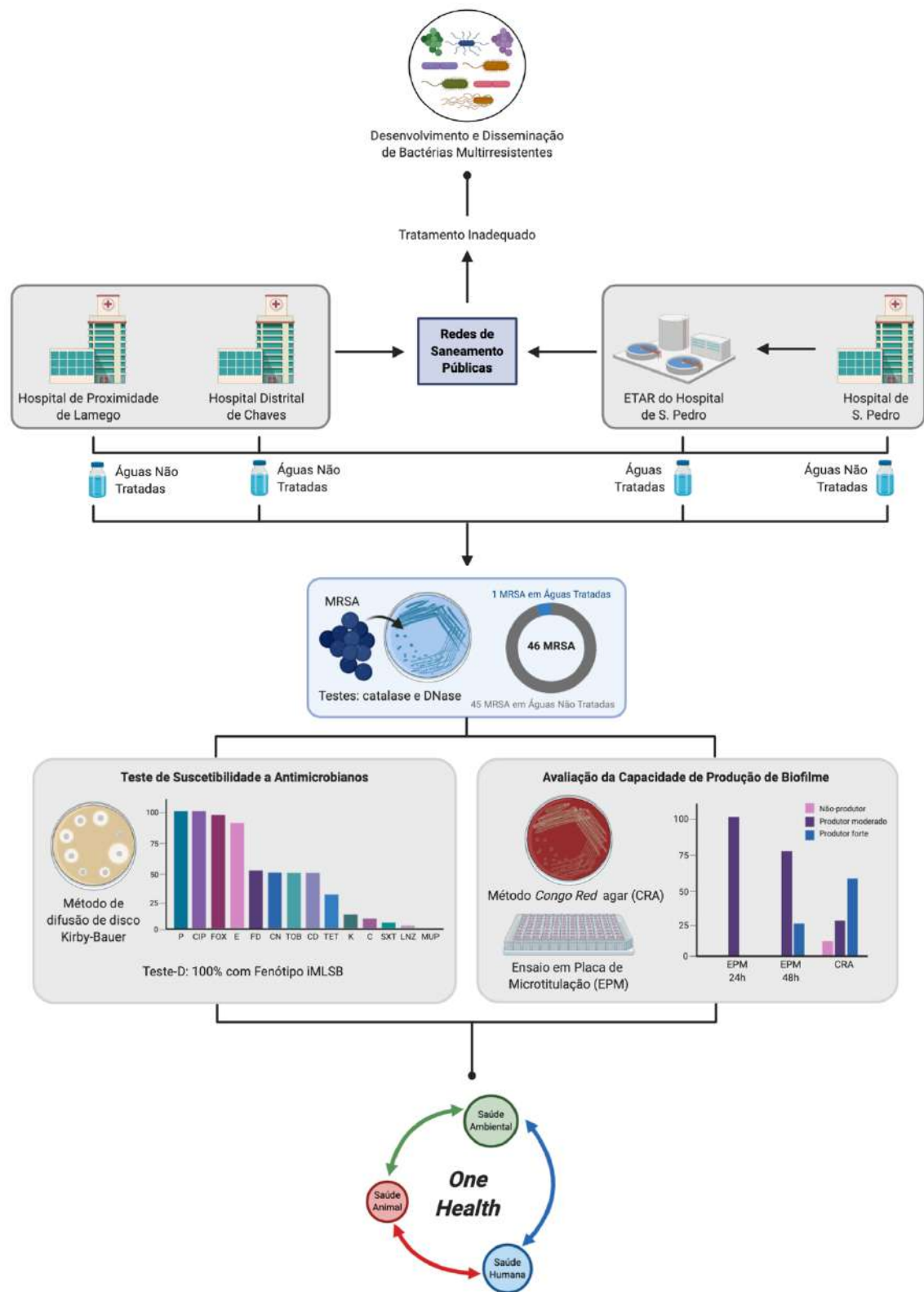
Às técnicas do Laboratório de Microbiologia Médica agradeço por toda a ajuda.

Ao Professor Doutor Gilberto Igrejas agradeço por me acolher no seu grupo de investigação e por toda a disponibilidade e preocupação ao longo deste trabalho.

À minha mãe, Fernanda Ribeiro, agradeço por toda a paciência, por acreditar em mim e por me incentivar a seguir os meus sonhos.

Por fim, ao meu namorado, Carlos Santos, agradeço pelo apoio, pela paciência, pela motivação e por acreditar sempre nas minhas capacidades.

Resumo Gráfico



Resumo

As águas residuais hospitalares são frequentemente descarregadas em redes de saneamento públicas e, quando não são sujeitas a um tratamento adequado, conduzem ao desenvolvimento e disseminação de bactérias resistentes a antibióticos. Estas bactérias são capazes de entrar em contacto com o ser humano, direta ou indiretamente, podendo levar a uma infeção com consequências graves.

Este trabalho teve como principal objetivo o estudo da prevalência de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) em águas residuais do Centro Hospitalar de Trás-os-Montes e Alto Douro (CHTMAD). Para além disso, foi também analisada a prevalência de MRSA em águas tratadas na Estação de Tratamento de Águas Residuais (ETAR) do Hospital de S. Pedro com o intuito de verificar a sua eficácia. Cada um dos isolados foi sujeito a testes de suscetibilidade a antibióticos e foi avaliada a sua capacidade de formação de biofilme.

Noventa e seis amostras foram recolhidas entre outubro de 2019 e março de 2020: 24 do Hospital de S. Pedro, 24 do Hospital de Proximidade de Lamego, 24 do Hospital Distrital de Chaves e 24 da ETAR do Hospital de S. Pedro. O isolamento das bactérias foi realizado através de meios seletivos de crescimento e testes bioquímicos para confirmação. A suscetibilidade foi determinada através do método de difusão de disco Kirby-Bauer e, para além disso, foi realizado ainda o Teste-D. Por fim, a capacidade de formação de biofilme das bactérias foi analisada através do ensaio em placa de microtitulação e do método Vermelho do Congo agar.

Foram isolados 45 MRSA dos efluentes hospitalares e 1 MRSA das águas residuais tratadas na ETAR do Hospital de S. Pedro, o que revela que o tratamento realizado não é totalmente eficaz. 96% dos isolados foram considerados multirresistentes e 43% apresentou o fenótipo iMLS_B. Todos apresentam capacidade de produção de biofilme.

Assim, o problema das infeções por MRSA resulta não só da ocorrência de multirresistências, mas também do aparecimento de bactérias capazes de formar biofilmes e, para combater esta problemática, devemos implementar uma perspetiva *One Health*, tendo em conta MRSA associados a humanos e a animais e, também, potenciais fontes de contaminação ambiental, como as ETARs, integrando os vários sistemas de saúde e o ecossistema.

Palavras-chave: águas residuais hospitalares; ETAR; MRSA; resistência antimicrobiana; resistência MLS_B; biofilmes.

Abstract

Hospital wastewater is often discharged into public sanitation networks and, when not properly treated, it leads to the development and spread of antibiotic-resistant bacteria. These bacteria are able to come in contact with humans, directly or indirectly, and can lead to an infection with serious consequences.

This work had as main objective the study of the prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from wastewater of Trás-os-Montes and Alto Douro Hospital Center (CHTMAD). In addition, the prevalence of MRSA in water treated by the Wastewater Treatment Plant (WWTP) of S. Pedro's Hospital was also analyzed in order to evaluate its effectiveness. Each strain was subjected to antibiotic susceptibility tests and their ability to form biofilms was assessed.

Ninety-six samples were collected between October 2019 and March 2020: 24 from S. Pedro Hospital, 24 from Lamego Proximity Hospital, 24 from Chaves District Hospital and 24 from S. Pedro Hospital WWTP. The isolation of the bacteria was carried out using selective growth media and biochemical tests for confirmation. The susceptibility test was performed by the Kirby-Bauer disk diffusion method and, in addition, it was also performed the D-Test. Finally, the biofilm production ability was evaluated through the microtiter plate assay and Congo Red agar method.

45 MRSA were isolated from the hospital effluents and 1 MRSA was isolated from treated water from S. Pedro Hospital WWTP, which reveals that the treatment carried out is not totally effective. 96% of the isolates were multidrug-resistant and 43% had the iMLS_B phenotype. In addition, all of the isolates also had the ability to produce biofilm.

Thus, the problem of MRSA infections results not only from the occurrence of multidrug resistance, but also from the appearance of bacteria capable of forming strong biofilms and, to combat this problem we must take into account a One Health perspective, associating MRSA with humans and animals and also potential sources of environmental contamination, such as WWTPs, and integrating the various health systems and ecosystems.

Key words: hospital wastewater; WWTP; MRSA; antimicrobial resistance; MLS_B resistance; biofilms.

Índice

Agradecimentos	viii
Resumo Gráfico	ix
Resumo	xiii
Abstract.....	xiii
Índice de Figuras	xvii
Índice de Tabelas	xix
Lista de Abreviaturas.....	xxi

I. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... 1

1. Introdução	1
2. Águas Residuais Hospitalares.....	1
2.1. Tipos de Águas Residuais Hospitalares.....	2
2.2. Caracterização das Águas Residuais Hospitalares	3
2.3. Estação de Tratamento de Águas Residuais (ETAR)	3
2.3.1. ETAR: Fonte de Bactérias e Genes de Resistência a Antibióticos	4
3. Antibióticos.....	6
3.1. Principais Classes de Antibióticos a Nível Hospitalar	6
3.2. Mecanismos de Ação dos Antibióticos.....	9
3.3. Mecanismos de Resistência a Antibióticos.....	10
3.3.1. Aquisição de Resistência por Mutações Cromossômicas	12
3.3.2. Aquisição de Resistência por Transferência Horizontal	12
3.3.3. Migração Intracelular de Genes de Resistência	13
4. Género <i>Staphylococcus</i>	14
4.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	15
4.1.1. Mecanismos de Patogenicidade	16
4.2. <i>S. aureus</i> Resistente à Meticilina (MRSA).....	21
4.2.1. Mecanismos de Resistência à Meticilina	21
4.2.2. Epidemiologia	22
4.2.3. MRSA: <i>One Health Approach</i>	23

II. OBJETIVOS 25

III. MATERIAL E MÉTODOS 27

1. Recolha de Amostras	27
2. Preparação de Meios de Cultura	27

3. Isolamento de MRSA	27
4. Identificação de MRSA	28
4.1. Teste da Catalase	28
4.2. Teste da DNase	28
5. Suscetibilidade a Antimicrobianos: Método de Difusão de Disco Kirby-Bauer	29
5.1. Suscetibilidade à Eritromicina e à Clindamicina: Teste-D	31
6. Potencial para a Produção de Biofilme.....	31
6.1. Método Vermelho do Congo agar	Erro! Marcador não definido.
6.2. Ensaio em Placa de Microtitulação.....	32
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
1. Caracterização Morfológica.....	33
2. Prevalência de MRSA em Efluentes Hospitalares.....	34
2.1. Eficácia da ETAR do Hospital de S. Pedro	34
3. Caracterização Fenotípica da Resistência.....	35
3.1. Caracterização Fenotípica da Resistência MLS _B	39
4. Caracterização Fenotípica do Potencial para Formação de Biofilme	41
V. CONCLUSÃO.....	45
VI. PERSPETIVAS FUTURAS	47
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
VIII. ANEXOS.....	57
1. Meios de Cultura.....	57
1.1. BHI líquido	57
1.2. BHI agar.....	57
1.3. ORSAB	57
1.4. DNase agar.....	58
1.5. MH agar	58
1.6. LB líquido.....	58
1.7. Vermelho do Congo agar.....	58

Índice de Figuras

Figura 1. O grande problema associado aos efluentes hospitalares (adaptado de Emmanuel et al., 2002).....	2
Figura 2. Estrutura química dos quatro grupos de antibióticos β -lactâmicos: todos apresentam, destacado a azul, o anel β -lactâmico (adaptado de Nordmann et al., 2012). 6	6
Figura 3. Os diferentes mecanismos de ação dos antibióticos (adaptado de Tortora et al., 2012).....	10
Figura 4. Os quatro principais mecanismos de resistência a antibióticos (adaptado de Tortora et al., 2012).	11
Figura 5. Mecanismos de transferência horizontal bacteriana (adaptado de Guardabassi e Dalsgaard, 2002).....	13
Figura 6. Esquematização de espécies de estafilococos de acordo com a sua capacidade de coagular o plasma sanguíneo e o seu impacto na saúde humana (adaptado de Becker et al., 2014).	15
Figura 7. Fatores patogénicos e estrutura celular de <i>S. aureus</i> (adaptado de Kong et al., 2016).....	16
Figura 8. Os três passos principais da formação de biofilme: (i) fixação das bactérias, (ii) formação e maturação do biofilme, (iii) dispersão do biofilme (adaptado de Raafat et al., 2019).....	Erro! Marcador não definido.
Figura 9. Percentagem (%) de isolados de MRSA de cada país europeu em 2018 (adaptado de ECDC, 2018).....	23
Figura 10. Os diferentes impactos sobre a saúde humana (adaptado de Mazet et al., 2009).	24
Figura 11. Colónias de MRSA em meio ORSAB.	28
Figura 12. Teste positivo para a catalase (lado esquerdo): degradação de H_2O_2	28
Figura 13. Teste positivo para a DNase: formação de um halo transparente.	29
Figura 14. Antibiograma de um MRSA: halo de inibição de crescimento (setas a preto).	29
Figura 15. Teste-D positivo: halo de inibição da clindamicina surge com forma achatada.	31
Figura 16. Crescimento de biofilme de MRSA em placas de vermelho do Congo agar: (i) colónias pretas, (ii) colónias castanhas, (iii) colónias vermelhas.	32
Figura 17. Características morfológicas das colónias bacterianas encontradas nas amostras de água.....	33
Figura 18. Representação gráfica do total de amostras recolhidas, evidenciando a percentagem de amostras sem MRSA relativamente a amostras com MRSA isolado de águas tratadas pela ETAR do Hospital de S. Pedro.....	35
Figura 19. Número e percentagem de isolados com resistência a cada um dos antibióticos testados (P – Penicilina, CIP – Ciprofloxacina, FOX – Cefoxitina, E – Eritromicina, FD – Ácido fusídico, CN – Gentamicina, TOB – Tobramicina, CD – Clindamicina, TET – Tetraciclina, K – Canamicina, C – Cloranfenicol, SXT – Trimetoprim-sulfametoxazol, LNZ – Linezolida, MUP – Mupirocina).....	37

Figura 20. Resultados dos dois métodos de avaliação da capacidade de produção de biofilme dos 46 isolados.....	41
Figura 21. Comparação da capacidade de formação de biofilme dos isolados de MRSA em função do período de incubação. O símbolo ■ representa a biomassa média do biofilme formado em três ensaios independentes dos isolados individuais em cada período de incubação. As linhas — representam a biomassa média do biofilme formado por todos os isolados em cada período de incubação. A significância estatística foi determinada utilizando uma análise de variância unidirecional (one-way ANOVA) seguida pelo teste de comparação múltipla de Tukey's. As diferenças significativas são descritas com: * $P < 0,05$; ** $P < 0,005$; *** $P < 0,001$	42

Índice de Tabelas

Tabela 1. Constituintes da parede celular de <i>S. aureus</i> que participam na indução de uma resposta imune e, as respectivas, funções (adaptado de Cervantes-García et al., 2014; A. L. Dos Santos et al., 2007).....	19
Tabela 2. Agentes antimicrobianos utilizados e respectivas quantidades presentes em cada disco (EUCAST, 2018).....	30
Tabela 3. Prevalência de MRSA nos efluentes dos três hospitais do CHTMAD e percentagens relativas.....	34
Tabela 4. Fenótipos de resistência em MRSA e percentagens relativas.....	36
Tabela 5. Suscetibilidade à eritromicina e clindamicina entre todos os isolados de MRSA.	40

Lista de Abreviaturas

AMPs	<i>Antimicrobial Peptides</i> (Peptídeos Antimicrobianos)
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
C	Cloranfenicol
CA-MRSA	<i>Community-Acquired MRSA</i> (MRSA associado à comunidade)
CD	Clindamicina
CHTMAD	Centro Hospitalar de Trás-os-Montes e Alto Douro
CIP	Ciprofloxacina
CLSI	<i>Clinical & Laboratory Standards Institute</i>
cMLS _B	Fenótipo MLS _B Constitutivo
CN	Gentamicina
CoPS	<i>Coagulase-Positive Staphylococci</i> (Estafilococos Coagulase-Positivo)
CoNS	<i>Coagulase-Negative Staphylococci</i> (Estafilococos Coagulase-Negativo)
DGIES	Direção Geral das Instalações de Equipamentos de Saúde
DHFR	Dihidrofolato Redutase
E	Eritromicina
ETA	<i>Exfoliative Toxin A</i> (Toxina Esfoliativa A)
ETAR	Estação de Tratamento de Águas Residuais
ETARI	Estação de Tratamento de Águas Residuais Infetadas
ETB	<i>Exfoliative Toxin B</i> (Toxina Esfoliativa B)
EUCAST	<i>European Committee of Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
FD	Ácido Fusídico
FOX	Cefocitina
HA-MRSA	<i>Hospital-Acquired MRSA</i> (MRSA associado a hospitais)
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina
iMLS _B	Fenótipo MLS _B Induzível
K	Canamicina
kB	<i>Kilo Base-Pair</i> (Quilo Par de Bases)
LA-MRSA	<i>Livestock-Acquired MRSA</i> (MRSA associado a animais de produção)
LB	<i>Luria-Bertani</i>
LNZ	Linezolid
MH	<i>Mueller-Hinton</i>

MLS	Macrólidos, Lincosamidas e Estreptograminas
MRSA	<i>Methicillin-Resistant S. aureus</i> (<i>S. aureus</i> resistente à metilina)
MS	Fenótipo de Resistência a Macrólidos e Estreptograminas
MSSA	<i>Methicillin-Susceptible S. aureus</i> (<i>S. aureus</i> sensível à metilina)
MUP	Mupirocina
ORSAB	<i>Oxacillin Resistance Screening Agar Base</i>
P	Penicilina
PBP	<i>Penicillin Binding Protein</i> (Proteína de Ligação à Penicilina)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia Polimerase)
PIA	<i>Polysaccharide Intercellular Adhesion</i> (Polissacarídeo de Adesão Intercelular)
PVL	<i>Panton-Valentine Leukocidin</i> (Leucocidina de Panton-Valentine)
SXT	Trimetoprim
SMZ	Sulfametoxazol
SCCmec	<i>Staphylococcal Cassette Chromosome mec</i>
TET	Tetraciclina
TOB	Tobramicina
TSST	<i>Toxic Shock Syndrome Toxin</i> (Toxina da Síndrome do Choque Tóxico)

Da presente dissertação resultaram os seguintes trabalhos:

Jessica Ribeiro, Vanessa Silva, Gilberto Igrejas, Patrícia Poeta (2020). "Study of the prevalence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in hospital wastewater". Apresentação de póster em *I Jornadas de Estudo e Proteção do Ambiente*, UTAD, Vila Real, Portugal.

I. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Introdução

Desde a sua introdução na medicina, os antibióticos têm sido os medicamentos mais importantes no tratamento de doenças infecciosas. No entanto, como resposta à pressão seletiva exercida pelo seu uso inadequado e excessivo, agentes patogénicos resistentes a antibióticos surgiram entre populações humanas e animais em todo o mundo. *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA) é uma das diversas bactérias que representa riscos significativos para a saúde humana, não só por apresentar resistência a vários antibióticos mas também por possuir a capacidade de aderir a estruturas ou superfícies sólidas pela produção de biofilme (Karakonstantis e Kalemaki, 2019; Rahimi *et al.*, 2016).

As águas residuais hospitalares são altamente perigosas pois, para além de infecciosas e tóxicas, são ainda uma fonte importante de bactérias resistentes a antibióticos e genes de resistência a antibióticos. Sem tratamento adequado, as bactérias de origem hospitalar que apresentam resistência a antibióticos podem disseminar-se, acelerando o desenvolvimento de bactérias resistentes a múltiplos grupos de antibióticos (Wang *et al.*, 2018). Globalmente, a gestão de águas residuais hospitalares constitui uma tarefa desafiante para as autoridades da saúde pública, pois já foi demonstrado que o efluente das instalações de saúde afeta adversamente o ambiente aquático. Em muitos países, incluindo Portugal, os efluentes hospitalares são combinados com águas residuais domésticas e tratados em estações de tratamento de águas residuais municipais sem qualquer pré-tratamento (Khan *et al.*, 2020).

Dada a gravidade das complicações clínicas provenientes das infeções causadas por MRSA, a resistência a grande parte dos antibióticos e a capacidade de formação de biofilme, é de extrema importância o estudo da prevalência destas estirpes em águas residuais hospitalares de forma a evidenciar a falha existente nas estratégias de tratamento destas águas. Para que estas estratégias apresentem uma maior eficácia, é necessário implementar uma perspetiva *One Health* que tenha em conta não só MRSA associados a humanos e a animais, mas também possíveis fontes de contaminação ambiental.

2. Águas Residuais Hospitalares

As águas residuais hospitalares resultam do funcionamento de serviços e de instalações dos hospitais, essencialmente provenientes do metabolismo humano e das atividades hospitalares (M. H. L. Santos *et al.*, 2005). Os hospitais consomem, diariamente, um significativo volume de

água. O consumo de água doméstica é, em média, 100 litros/pessoa/dia enquanto os valores para os hospitais variam, geralmente, entre 400 a 1200 litros/dia/cama (Emmanuel *et al.*, 2002). São geradas diferentes quantidades de águas residuais hospitalares de acordo com diversos fatores, tais como: número de camas, idade do hospital, serviços prestados dentro do hospital, número e tipos de alas e unidades, políticas de manutenção da instituição, fatores geográficos e culturais, entre outros (L. H. M. L. M. Santos *et al.*, 2013).

Por norma, os efluentes hospitalares são descarregados nas redes de saneamento públicas, sendo simultaneamente tratadas com as águas residuais domésticas em Estações de Tratamento de Águas Residuais (ETAR) municipais (Figura 1). Alguns autores, como Pauwels e Verstraete (2006), questionaram este método, sugerindo a adoção de um tratamento direcionado aos efluentes hospitalares antes destes serem descarregados em redes de saneamento públicas. Assim, não haveria diluição das águas residuais hospitalares com as águas residuais urbanas, evitando a redução da eficiência das ETARs e possíveis perdas para o ambiente.

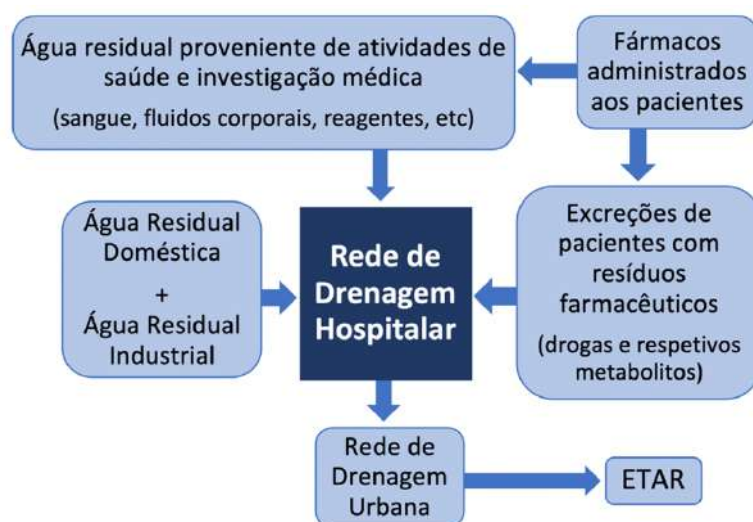


Figura 1. O grande problema associado aos efluentes hospitalares (adaptado de Emmanuel *et al.*, 2002).

2.1. Tipos de Águas Residuais Hospitalares

Segundo as “Recomendações Genéricas para a Gestão de Águas Residuais Hospitalares” de M. H. L. Santos *et al.* (2005), estas águas são classificadas em três tipos:

- Águas residuais hospitalares domésticas: todas aquelas que são produzidas em zonas de Serviços de Apoio (Serviços Administrativos, Conselho de Administração, Bares, Refeitório, entre outros);
- Águas residuais hospitalares poluídas: conjunto de todos os efluentes em que é comum o aparecimento de compostos químicos (tais como, gorduras e metais), os

quais alterando significativamente as características típicas de um efluente doméstico, obrigam à aplicação de tratamentos físicos e/ou químicos específicos;

- Águas residuais hospitalares infetadas: qualquer efluente onde exista componentes biológicos e/ou microbiológicos que alterem significativamente as características típicas de um efluente doméstico (por exemplo, restos de sangue e outros fluídos orgânicos) onde poderão existir quantidades significativas de microrganismos patogénicos, nomeadamente espécies multirresistentes.

2.2. Caracterização das Águas Residuais Hospitalares

Os efluentes hospitalares apresentam um diversificado conjunto de substâncias, que incluem não só fármacos e os seus metabolitos, mas também agentes de diagnóstico, desinfetantes, compostos resultantes de investigações e da excreção de pacientes (L. H. M. L. M. Santos *et al.*, 2013). Entre os vários fármacos, a presença de antibióticos causa uma particular preocupação devido ao constante aumento do seu uso e, consequentemente, o desenvolvimento de bactérias multirresistentes (Grenni *et al.*, 2018). O consumo, o uso e a aplicação de fármacos em hospitais varia de acordo com o ano e o país, devido à predominância de doenças, à atividade do hospital e à diversidade de fármacos sugeridos para o tratamento das diferentes doenças (L. H. M. L. M. Santos *et al.*, 2013).

As bactérias que persistem após os tratamentos das águas residuais hospitalares são expostas a um vasto conjunto de biocidas que atuam como pressão seletiva levando ao desenvolvimento de resistências: grandes quantidades de antibióticos, metais pesados e desinfetantes com propriedades antibacterianas nos efluentes hospitalares exercem pressão seletiva antimicrobiana (Hocquet *et al.*, 2016). Assim, os efluentes hospitalares são um dos principais responsáveis pela introdução de organismos patogénicos em água residuais públicas, apresentando um papel importante no que diz respeito a bactérias multirresistentes e, também, na disseminação de resistências a antibióticos no meio ambiente (Nuñez e Moretton, 2007).

2.3. Estação de Tratamento de Águas Residuais (ETAR)

As ETARs são instalações que promovem a limpeza das águas residuais para que apresentem um nível de pureza aceitável e para que possam retornar ao ambiente ou ser reutilizadas. O tratamento de águas residuais é realizado com o intuito de garantir a saúde e o bem-estar das nossas comunidades (Spellman, 2003).

O tratamento convencional das águas consiste numa combinação de processos físicos, químicos e biológicos, existindo etapas para a remoção de sólidos, matéria orgânica e nutrientes. As diferentes fases do tratamento são designadas por: tratamento preliminar, tratamento primário, tratamento secundário e tratamento terciário.

No tratamento preliminar é realizado um conjunto de operações que permitem a remoção de sólidos e outros materiais grosseiros presentes nas águas residuais. Assim, há eliminação ou redução em tamanho dos sólidos que são arrastados ou que se encontram suspensos. Alguns dos sólidos frequentemente encontrados incluem pedaços de madeira, tecidos, papel, plástico, lixo e alguma matéria fecal. Também são removidos sólidos inorgânicos pesados como a areia, o cascalho, o metal e o vidro.

De seguida, no tratamento primário são removidos sólidos orgânicos e inorgânicos através da sedimentação/decantação e da flotação, tais como: fósforo orgânico, azoto orgânico, metais pesados e óleos. Deste modo, a função do tratamento primário é eliminar o máximo possível de sólidos em suspensão, sendo que elementos coloidais e dissolvidos não são afetados por este tratamento. O tratamento secundário tem como objetivo remover compostos orgânicos e/ou inorgânicos sob a forma coloidal ou dissolvida que não foram removidos na fase primária (Sonune e Ghate, 2004).

Por fim, pretende-se eliminar os poluentes que se mantêm na água mesmo depois de todos os tratamentos anteriores, como partículas dificilmente decantáveis, microrganismos patogénicos, nutrientes (azoto e fósforo, por exemplo) ou outros compostos (herbicidas ou pesticidas). Esta fase designa-se por tratamento terciário e existe devido à exigência de qualidade do meio recetor e pelos usos previstos para o mesmo (Simões *et al.*, 2008).

2.3.1. ETAR: Fonte de Bactérias e Genes de Resistência a Antibióticos

A resistência antimicrobiana constitui um dos principais e mais preocupantes problemas de saúde pública e as ETARs fornecem o cenário ideal para a aquisição e disseminação de genes de resistência (Rodriguez-Mozaz *et al.*, 2015). Estas instalações têm sido consideradas como uma das principais fontes de antibióticos pois foram criadas principalmente para remover contaminantes clássicos (sólidos, nutrientes e matéria orgânica) e não poluentes emergentes como os fármacos (Nakada *et al.*, 2007). Para além disso, de acordo com vários autores, os processos convencionais de tratamento de águas residuais não são eficazes na remoção de microrganismos patogénicos.

Em Portugal, Martins da Costa *et al.* (2006), realizou um estudo em 14 ETARs para investigar a resistência antimicrobiana de enterococos em efluentes não tratados, após o tratamentos e na lama: foi detetada a presença de multirresistência em 49,4% dos 983 isolados e, também, resistência a vários antibióticos (rifampicina, tetraciclina, eritromicina e nitrofurantoína). Para além disso, concluíram que, apesar de haver uma diminuição de enterococos no efluente final, a sua concentração ainda era bastante elevada e, portanto, considerada preocupante. Observaram ainda que ETARs antigas e dias chuvosos tiveram os piores desempenhos na redução da carga bacteriana.

A disseminação de bactérias resistentes é agravada quando os efluentes hospitalares são descarregados diretamente nas redes de tratamento público sem tratamento prévio, sendo o potencial de risco destes efluentes intensificado pelo facto dos hospitais usarem antibióticos de último recurso com bastante frequência (Paulus *et al.*, 2019). Apesar disto, não existem regulamentos para o tratamento destes efluentes na maioria dos países (Paulus *et al.*, 2019). Segundo a Direção-Geral das Instalações de Equipamentos de Saúde (DGIES) “não foram obtidos dados ou informações que indiquem, que na atual situação, os efluentes hospitalares devam ser motivo de preocupação quanto aos seus impactos no ambiente e saúde pública, sempre que as respetivas descargas sejam devidamente tratadas nas ETARs municipais, ou noutras, antes de serem libertadas para o meio ambiente”. Em 2005, foi elaborado um manual de recomendações para a gestão de águas residuais hospitalares mas, não havendo legislação própria, a maioria dos hospitais acaba por não as pôr em prática (M. H. L. Santos *et al.*, 2005).

Posto isto, para combater a disseminação de microrganismos patogénicos e resistentes a antibióticos, é importante investir na otimização das ETARs e em novas estratégias de tratamento. Outra alternativa seria a implementação de ETARs em hospitais, uma vez que os efluentes hospitalares são descarregados em ETARs municipais sem nenhum pré-tratamento (Azar *et al.*, 2010). Em 2011, o Hospital Marien na Alemanha, implementou a primeira ETAR hospitalar da Europa. Foi a primeira estação de tratamento de efluentes a focar-se na eliminação de micropoluentes, bem como na purificação de efluentes provenientes de atividades hospitalares. Nesta ETAR existe uma grande variedade de processos de tratamento, como ultrafiltração, ozonização e filtração por carvão ativado (Casas *et al.*, 2015).

3. Antibióticos

Tal como já foi referido anteriormente, os antibióticos são frequentemente encontrados entre os contaminantes presentes nos efluentes hospitalares. Assim, constituem substâncias de elevada importância pois poderão trazer efeitos adversos à saúde humana e animal, essencialmente, devido ao aumento da resistência bacteriana (Pena *et al.*, 2010).

3.1. Principais Classes de Antibióticos a Nível Hospitalar

Os antibióticos correspondem à segunda classe de substâncias mais administradas devido à elevada frequência com que são prescritos, sendo responsáveis por 20 a 50% das despesas hospitalares. Das diversas classes de antibióticos, as que se destacam mais a nível hospitalar são: β -lactâmicos, tetraciclina, aminoglicosídeos, macrólidos, lincosamidas, estreptograminas, cloranfenicol, glicopéptidos, quinolonas e fluoroquinolonas, sulfamidas e oxazolidinonas (Guimarães *et al.*, 2010).

Os antibióticos β -lactâmicos foram os primeiros a serem descobertos e representam o conjunto de antibióticos mais usado mundialmente. Destes fazem parte quatro grupos: penicilinas (P), cefalosporinas, monobactams e carbapenems (Figura 2) (Nordmann *et al.*, 2012). Atuam inibindo a síntese da parede celular bacteriana através da inativação das proteínas de ligação à penicilina (PBP) (Yin *et al.*, 2014). As PBPs são responsáveis pela polimerização dos peptidoglicanos (transglicosilação) e pela respetiva ligação cruzada entre as várias cadeias de peptidoglicanos (transpeptidação). Cada bactéria apresenta um número variável de PBPs (Sauvage *et al.*, 2008). Como mecanismos de defesa, as bactérias produzem as β -lactamases: enzimas que atuam sobre o anel β -lactâmico dos antibióticos, degradando-o. Devido ao uso prolongado de antibióticos β -lactâmicos, a capacidade de produção de β -lactamases tem vindo a ser adquirida por muitas bactérias, levando a falhas terapêuticas (Yin *et al.*, 2014). Deste modo, com o objetivo de combater estas resistências, foram criadas novas gerações de cefalosporinas, como é o caso da cefoxitina (FOX) (Fair e Tor, 2014).

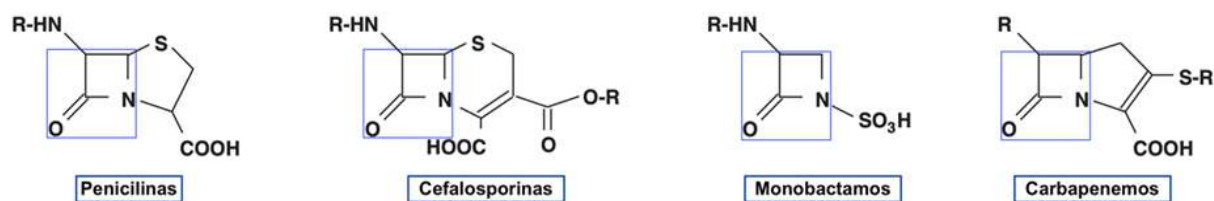


Figura 2. Estrutura química dos quatro grupos de antibióticos β -lactâmicos: todos apresentam, destacado a azul, o anel β -lactâmico (adaptado de Nordmann *et al.*, 2012).

As tetraciclinas (TET) foram descobertas em 1940, contudo, só começaram a ser utilizadas para efeitos terapêuticos a partir de 1950 pois apresentavam efeitos secundários. Constituem agentes de largo espectro, com atividade em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Atuam sobre a subunidade 30S dos ribossomas dos microrganismos, inibindo a sua síntese proteica. Os microrganismos, por sua vez, apresentam bombas de efluxo que evitam a acumulação intracelular de tetraciclina. Para além disso, possuem proteínas citoplasmáticas que protegem os ribossomas da ação da tetraciclina (M. C. Roberts, 2003).

Os aminoglicosídeos foram isolados em 1944 de *Streptomyces griseus* e a canamicina (K), a tobramicina (TOB) e a gentamicina (CN) são alguns exemplos de antibióticos pertencentes a esta classe (Guimarães et al., 2010). São amplamente utilizados a nível clínico pois são eficazes contra bacilos Gram-negativos e apresentam um efeito sinérgico com antibióticos β -lactâmicos para o tratamento de agentes Gram-positivos. Uma desvantagem associada a esta classe de antibióticos é a seu efeito nefrotóxico, muitas vezes associado à mortalidade (Oliveira et al., 2006). Apresentam um efeito bactericida quando se ligam ao ribossoma bacteriano: ligam-se à subunidade 30S do ribossoma, interferindo com a síntese proteica e levando à leitura incorreta do RNA mensageiro. Os mecanismos de resistência a aminoglicosídeos mais frequentes são inativação enzimática do antibiótico, alteração da permeabilidade celular, mecanismos de efluxo e alteração dos ribossomas por mutação (Doi e Arakawa, 2007).

Os macrólidos, lincosamidas e estreptograminas (MLS) são agentes terapêuticos importantes para o tratamento de infeções de MRSA, destacando-se a eritromicina (E) e a clindamicina (CD). Constituem alternativas antibióticas muito utilizadas em pacientes com alergias a β -lactâmicos (Gherardi et al., 2009). São estruturalmente diferentes, porém, apresentam semelhanças relativamente ao seu modo de ação pois todos se ligam à subunidade 50S do ribossoma bacteriano, inibindo a síntese proteica (Szczuka et al., 2016). Desde que *Staphylococcus* spp. se tornou resistente a muitos antibióticos, a possibilidade de compostos como a eritromicina e a clindamicina ainda serem eficazes é muito importante para evitar que novas resistências sejam desenvolvidas. Contudo, ao longo da última década, houve um aumento significativo do número de estafilococos a adquirirem resistência aos macrólidos, lincosamidas e estreptograminas. A resistência MLS é geralmente baseada em três mecanismos: alteração enzimática do ribossoma, mecanismos de efluxo e inativação enzimática do antibiótico (Mišić et al., 2017). O mecanismo mais comum para a resistência à clindamicina em espécies de *Staphylococcus* é a modificação do local alvo mediado pelos genes *erm*,

podendo estes ser expressos constitutivamente (fenótipo MLS_B constitutivo, cMLS_B) ou indutivelmente (fenótipo MLS_B induzível, iMLS_B) (Prabhu *et al.*, 2010).

O primeiro agente microbiano da classe dos fenicóis foi o cloranfenicol (C). Este foi isolado de *Streptomyces venezuelae* em 1947. Devido à sua atividade contra diversas bactérias, tanto Gram-positivas como Gram-negativas, foi considerado um agente antimicrobiano promissor. Contudo, foram observados efeitos adversos e, deste modo, o cloranfenicol é apenas usado em medicina humana para o tratamento de um pequeno número de infecções graves ou para aplicações tópicas. Na medicina veterinária é ainda usado em animais de companhia e em animais cujo objetivo não seja produzir alimento. Esta classe, tal como a classe de macrólidos, lincosamidas e estreptograminas, inibe a síntese proteica pela ligação à subunidade 50S do ribossoma bacteriano. Em adição, apresenta ainda mecanismos de resistência semelhantes: inativação enzimática, bombas de efluxo e modificação do alvo (Schwarz *et al.*, 2016).

Dentro da classe dos fusidanos, o antimicrobiano com maior destaque é o ácido fusídico (FD). Este foi isolado de *Fusidium coccineum* e encontra-se na prática clínica desde 1962. É usado para o tratamento de infecções por bactérias Gram-positivas, essencialmente infecções de estafilococos. Comporta-se como um inibidor da síntese proteica, interferindo com o fator de elongação G envolvido na translocação. Apesar de ser considerado um antibiótico bacteriostático, foi observado que a altas concentrações pode atuar como bactericida. A resistência a estes antibióticos pode surgir devido a mutações espontâneas, alterações da permeabilidade causadas por modificações na parede celular e na membrana plasmática e, também, devido a bombas de efluxo (García-Rodríguez *et al.*, 2003).

A mupirocina (MUP), um antibiótico produzido por *Pseudomonas fluorescens*, é usada contra estreptococos e estafilococos. Atua inibindo a isoleucil-tRNA sintetase, o que interfere com a síntese de proteínas. O mecanismo de resistência mais comum consiste na alteração da enzima alvo através de uma mutação (Patel *et al.*, 2009; Thomas *et al.*, 2010).

As quinolonas e fluoroquinolonas são um grupo de agentes bactericidas sintéticos de largo espectro cujo alvo é a síntese de DNA (Czyrski, 2017). Penetram a parede celular através das porinas, inibindo diretamente a replicação bacteriana pela interação com as enzimas DNA girase e topoisomerase. A alteração destas enzimas, a redução da permeabilidade das porinas e bombas de efluxo são mecanismos de resistência bacteriana. As quinolonas, como por exemplo a ciprofloxacina (CIP), são amplamente utilizadas para o tratamento de infecções e a sua eficácia deve-se à sua biodisponibilidade, segurança e forma de administração (Álvarez-Hernández *et*

al., 2015). Entre as várias classes de antibióticos, esta foi detetada em maior concentração em amostras de efluentes hospitalares (Rodriguez-Mozaz et al., 2015).

As sulfonamidas são outra classe de antibióticos sintéticos e foram testadas pela primeira vez em 1930. Um exemplo que ainda é utilizado na terapêutica é o trimetoprim (SXT) associado ao sulfametoxazol (SMZ). São agentes bacteriostáticos que impedem uma etapa no metabolismo do ácido fólico: inibem o dihidrofolato redutase (DHFR), bloqueando a síntese de DNA e RNA (Guimarães et al., 2010). Os mecanismos de resistência ao trimetoprim-sulfametoxazol envolvem uma alteração do gene estrutural da DHFR por mutação e a aquisição deste gene mutante através de elementos genéticos móveis (Nurjadi et al., 2014).

Por último, as oxazolidinonas constituem um agente bacteriostático sintético com um amplo espectro de ação e atividade contra bactérias resistentes a outros antibióticos que inibem a síntese proteica: impedem o início da translação enquanto outros antibióticos que inibem a síntese proteica atuam no próprio processo de translação. Atuam ligando-se à subunidade ribossomal 50S, impedindo a sua ligação com a subunidade 30S para a formação do ribossoma 70S, essencial para o início da síntese proteica. Desta classe é importante destacar a linezolida (LNZ) (Guimarães et al., 2010). A alteração ribossomal constitui um mecanismo de resistência a estes antibióticos (Beceiro et al., 2013).

3.2. Mecanismos de Ação dos Antibióticos

Os antibióticos são frequentemente classificados de acordo como seu modo de ação: inibição da síntese da parede celular, alteração da permeabilidade da membrana citoplasmática, inibição da síntese proteica, inibição da síntese de ácidos nucleicos e inibição de processos metabólicos (Figura 3).

A parede celular de uma bactéria é constituída por uma rede de macromoléculas designada de peptidoglicanos. Alguns antibióticos impedem a síntese de peptidoglicanos e, consequentemente, a parede celular bacteriana fica enfraquecida e a célula sofre lise. Assim, apenas as células em crescimento são afetadas por este mecanismo. Estes antibióticos apresentam pouca toxicidade para as células do hospedeiro, uma vez que a parede celular das células humanas não possui peptidoglicanos. Outros agentes antimicrobianos, essencialmente os que são compostos por polipeptídeos, atuam induzindo alterações na permeabilidade da membrana plasmática que resultam na perda de metabolitos importantes pela célula microbiana. O grupo de antibióticos que inibe a síntese proteica atua sobre os ribossomas 70s bacterianos, tendo como alvo as subunidades 30S e 50S. No entanto, as mitocôndrias (organelos eucariotas)

também apresentam ribossomas 70S semelhantes às células procarióticas, podendo estes causar efeitos adversos nas células do hospedeiro. A inibição da síntese de ácidos nucleicos é realizada por um conjunto de agentes que interfere com a replicação de DNA através da formação de compostos intermediários e impede a transcrição por bloqueio da ação de enzimas. Por último, a inibição dos processos metabólicos ocorre quando a atividade enzimática de um microrganismo é inibida competitivamente por uma substância (antimetabolito) que se assemelha muito ao substrato normal da enzima (Tortora *et al.*, 2012).

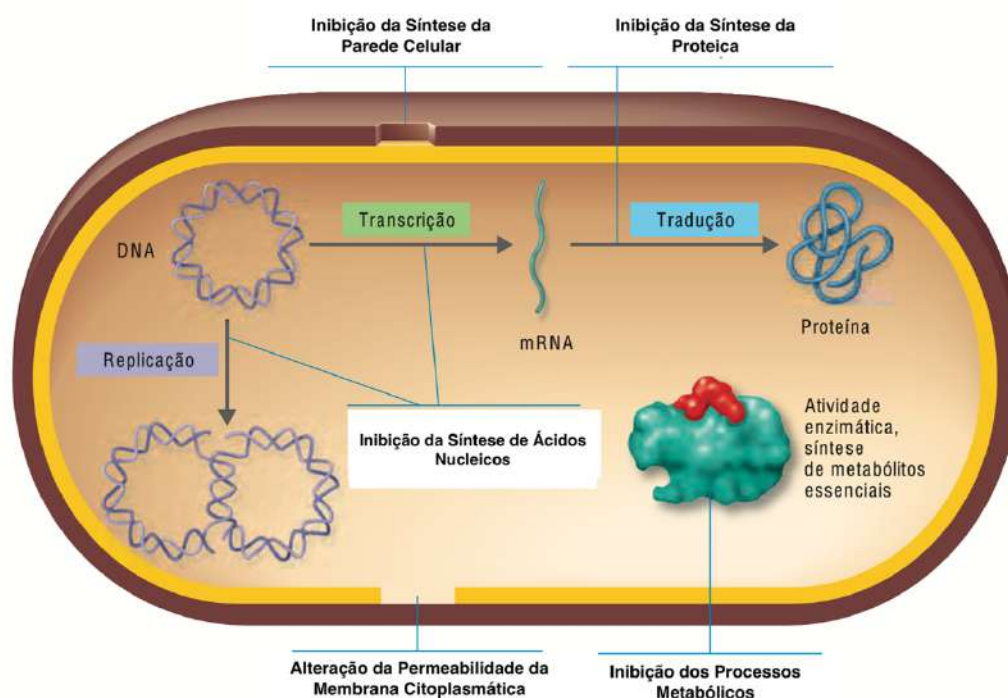


Figura 3. Os diferentes mecanismos de ação dos antibióticos (adaptado de Tortora *et al.*, 2012).

3.3. Mecanismos de Resistência a Antibióticos

A resistência antimicrobiana constitui um dos mais importantes e mais preocupantes problemas de saúde pública. O uso excessivo e inapropriado de antibióticos conduz à propagação destas resistências. A pressão seletiva antimicrobiana é particularmente alta nos hospitais. De facto, cerca de 20 a 30% dos pacientes europeus foram submetidos a antibioterapia durante a sua hospitalização. Para além disso, os hospitais são uma fonte muito importante de propagação de agentes patogénicos, constituindo nichos ecológicos para bactérias resistentes a antibióticos. Estas, por sua vez, saem dos hospitais em pacientes colonizados e, também, através dos sistemas de águas residuais (Hocquet *et al.*, 2016).

Os quatro principais mecanismos de resistência a antibióticos são (Figura 4): alteração da permeabilidade, alteração da molécula-alvo, inativação enzimática e mecanismos de efluxo.

As bactérias Gram-negativas possuem uma membrana externa com fosfolípidos e uma membrana interna com lípidos A, o que as torna mais resistentes a antibióticos pois restringem a absorção de moléculas. Apresentam ainda, porinas que limitam a entrada de antibióticos para o espaço periplasmático da célula. A interação entre o antibiótico e a molécula-alvo é bastante específica ao ponto de pequenas alterações na molécula-alvo influenciarem a sua ligação. Assim, ligeiras modificações no local de ligação podem neutralizar os efeitos do antibiótico (Giedraitiene *et al.*, 2011). A inativação enzimática é um mecanismo que afeta essencialmente antibióticos naturais, tal como as penicilinas e as cefalosporinas, pois compartilham uma estrutura, o anel β -lactâmico, que é alvo das enzimas β -lactamases que hidrolisam seletivamente essa estrutura. Os grupos de antibióticos totalmente sintéticos, como as fluoroquinolonas, apresentam menor probabilidade de serem afetados devido ao facto de os microrganismos não terem tido tempo para se adaptar a estruturas químicas menos frequentes. Certas proteínas presentes na membrana plasmática das bactérias atuam como bombas que expulsam os antibióticos, impedindo que alcancem concentrações efetivas. Este mecanismo é responsável pela resistência a praticamente todas as principais classes de antibióticos e é também utilizado para eliminar substâncias tóxicas (Tortora *et al.*, 2012).

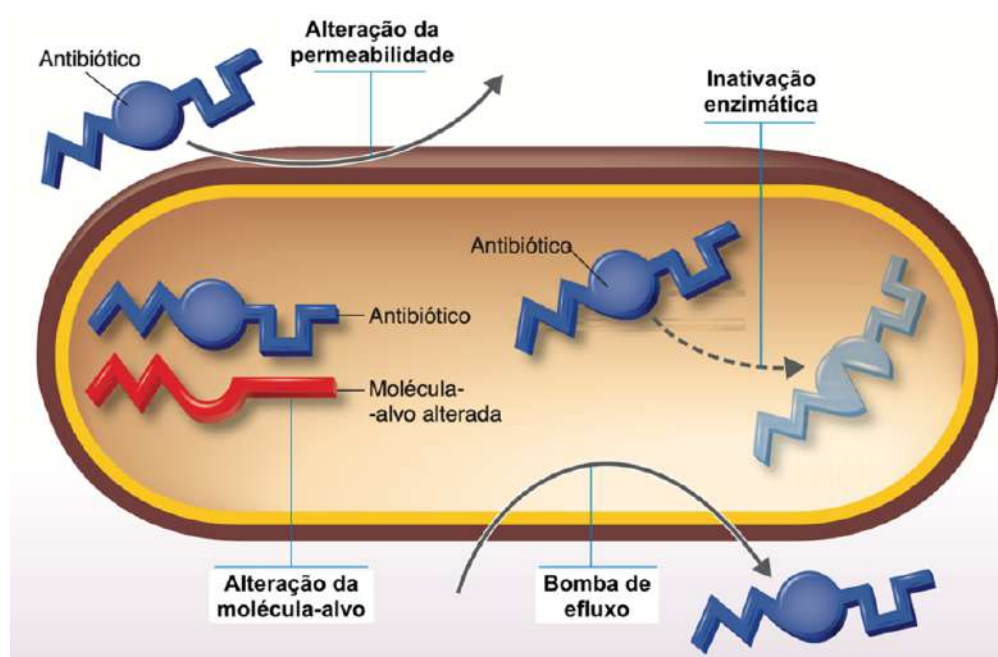


Figura 4. Os quatro principais mecanismos de resistência a antibióticos (adaptado de Tortora et al., 2012).

Os mecanismos de resistência a antibióticos podem ser intrínsecos ou adquiridos. A resistência intrínseca resulta de um longo processo de evolução genética, que surge devido a características físicas típicas da espécie. Por exemplo, *Pseudomonas aeruginosa* é naturalmente resistente às penicilinas devido à incapacidade deste agente antimicrobiano atravessar a membrana externa da bactéria e, também, devido à presença de β -lactamases. Pelo contrário, a resistência adquirida surge, num curto período de tempo, na população bacteriana através de modificações no DNA bacteriano. Estas alterações são causadas por mutações cromossômicas, transferência horizontal de genes ou migração intracelular de genes de resistência (Guardabassi e Dalsgaard, 2002).

3.3.1. Aquisição de Resistência por Mutações Cromossômicas

Uma mutação cromossômica é uma alteração hereditária na sequência do DNA que pode resultar de erros durante a sua replicação ou de reparações incorretas do DNA danificado. São bastante raras e, geralmente, determinam resistência a compostos estruturalmente relacionados. Para além disso, são designadas de mutações espontâneas ou de mutações dependentes do crescimento. A resistência de *Escherichia coli* às quinolonas é causada por alterações em pelo menos sete aminoácidos no gene *gyrA* ou três aminoácidos no gene *parC*, enquanto apenas uma única mutação no gene *rpoB* está associada a uma resistência completa à rifampicina. Alguns mecanismos de resistência bioquímica são resultado de mutações: a captação de antibióticos ou sistemas de efluxo podem ser modificações por mutações.

A maioria das mutações surge em células em divisão, contudo, também podem surgir em células que não se dividem ou que se dividem lentamente. Para além disto, existem estirpes bacterianas capazes de aumentar as taxas de mutação até 10.000 vezes. Estas são designadas por hipermutadores e são frequentemente encontradas em populações de *E. coli*, *Salmonella enterica*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* (Giedraitiene et al., 2011).

3.3.2. Aquisição de Resistência por Transferência Horizontal

A transferência horizontal de genes é a transferência de material genético de uma célula bacteriana (dadora) para outra (recetora). Esta apresenta uma maior eficiência relativamente às mutações cromossômicas. Pode ocorrer diretamente por transferência de plasmídeos entre a célula dadora e a célula recetora (conjugação) ou, indiretamente, através da transferência de DNA livre (transformação) ou pela utilização de bacteriófagos como vetores (transdução)

(Figura 5). Posteriormente, os genes são incorporados no cromossoma recetor por recombinação ou transposição, podendo provocar uma ou várias alterações na sequência genética (Giedraitiene *et al.*, 2011; Roberts e Kreth, 2014).

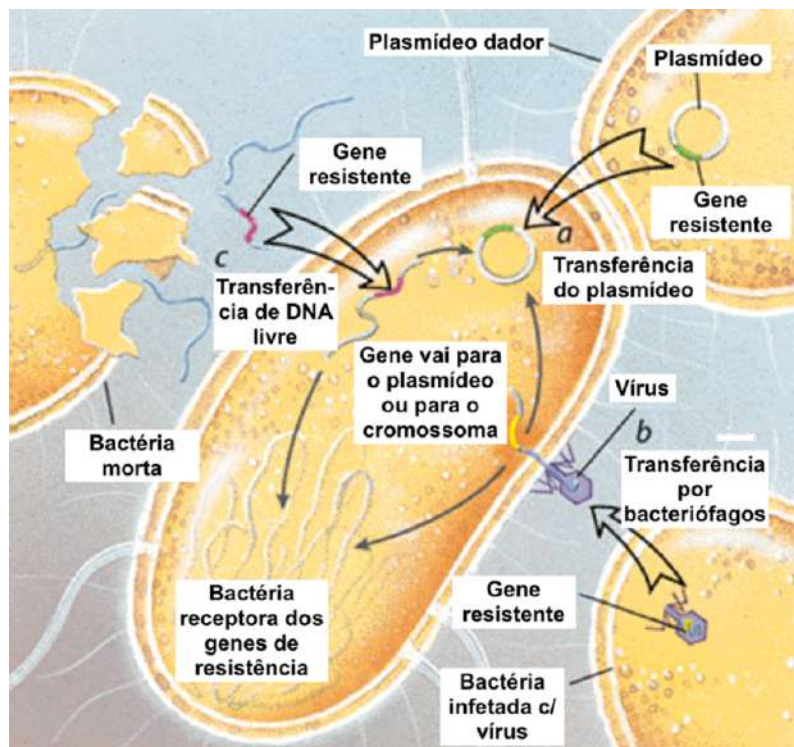


Figura 5. Mecanismos de transferência horizontal bacteriana (adaptado de Guardabassi e Dalsgaard, 2002).

Os plasmídeos são moléculas de cadeia dupla de DNA circular que se reproduzem de forma independente do DNA cromossômico e codificam funções como a resistência a antibióticos e a metais pesados, funções metabólicas ou produção de antibióticos, toxinas e fatores de virulência (Guardabassi e Dalsgaard, 2002).

A transferência bacteriana de resistência a antibióticos ocorre em vários habitats naturais, tais como, água, sedimentos, solo, plantas e animais e é favorecida pela pressão seletiva antimicrobiana (Hocquet *et al.*, 2016).

3.3.3. Migração Intracelular de Genes de Resistência

Os genes de resistência a antibióticos apresentam a capacidade de migrarem de um local do genoma bacteriano para outro através de transposões e integrões. Estes elementos genéticos, ao contrário do normal processo de recombinação genética, não requerem homologia para que se possam deslocar entre diferentes locais do genoma bacteriano, designando-se este processo de recombinação não-homóloga. Assim, tanto os transposões como os integrões, contribuem para

o desenvolvimento da transferência de resistência pois são capazes de se deslocar de plasmídeos para cromossomas e, eventualmente, transferir a resistência para as células-filha (Guardabassi e Dalsgaard, 2002).

4. Género *Staphylococcus*

O género *Staphylococcus* foi descrito em 1880 por Ogston, e engloba, atualmente, os microrganismos infecciosos mais comuns a nível mundial (A. L. Dos Santos *et al.*, 2007). Inicialmente, considerou-se que pertencia à família *Micrococcaceae*, mas análises filogenéticas e moleculares revelaram que os estafilococos não estão relacionados com esta família e, portanto, estão classificados na família *Staphylococcaceae*. Para além disso, os métodos moleculares permitiram descrever, até à data, 45 espécies e 24 subespécies pertencentes a este género (Gherardi *et al.*, 2018). A espécie de maior interesse do ponto de vista clínico é *Staphylococcus aureus* (A. L. Dos Santos *et al.*, 2007).

Este género é formado por cocos gram-positivos, com aproximadamente 0,5 a 1,5 µm de diâmetro, imóveis, não-esporulados e, geralmente, não-encapsulados. Pode surgir como uma célula isolada, em pares, cadeias curtas ou grupos irregulares (aspeto semelhante a um cacho de uvas). A maioria dos estafilococos produz a enzima catalase, ou seja, são capazes de reduzir o peróxido de hidrogénio (H₂O₂) em água (H₂O) e oxigénio (O). Esta característica é utilizada para distinguir estafilococos de enterococos e estreptococos pois são catalase-negativo (Cervantes-García *et al.*, 2014).

As diferentes espécies de estafilococos podem ser divididas em dois grandes grupos (Figura 6): estafilococos coagulase-positivos (CoPS) e estafilococos coagulase-negativos (CoNS). O método tradicional para distinguir estas bactérias é o teste da coagulase em tubo que se baseia na capacidade de uma coagulase estafilocócica extracelular coagular o plasma, convertendo o fibrinogénio em fibrina (dos Santos *et al.*, 2016). Os CoPS associados a humanos são exclusivamente representados por *S. aureus* e constituem o grupo mais patogénico deste género. Dentro dos CoNS, *S. epidermidis* e *S. haemolyticus* são as espécies que mais frequentemente causam doença no ser humano (Becker *et al.*, 2014).

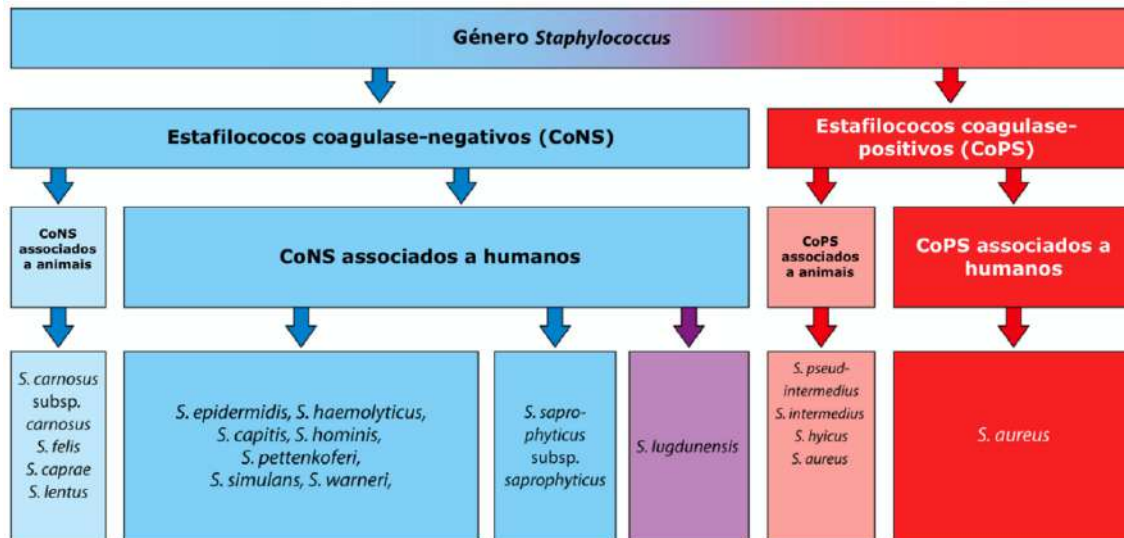


Figura 6. Esquematisação de espécies de estafilococos de acordo com a sua capacidade de coagular o plasma sanguíneo e o seu impacto na saúde humana (adaptado de Becker et al., 2014).

Para além do teste da coagulase em tubo, existem outros métodos que tornam possível a identificação das diferentes espécies de estafilococos como testes bioquímicos, redução de nitrato e produção de ácido, utilização anaeróbica de glicose e manitol, sensibilidade à lisostafina, produção de coagulase, entre outros (Kumar *et al.*, 2016). Existem ainda, vários sistemas automatizados, como o sistema BD Phoenix e VITEK 2, que permitem a rápida identificação e diferenciação mas, quando as existem muitas semelhanças entre as espécies, é imprescindível recorrer a métodos de biologia molecular como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com uso de *primers* específicos (Layer *et al.*, 2006).

4.1. *Staphylococcus aureus*

S. aureus (do latim *aureus* [“dourado”]) é assim designada pois, quando cresce em agar nutritivo, apresenta uma pigmentação amarelada. É uma espécie anaeróbia facultativa e é capaz de crescer numa ampla gama de temperaturas (desde os 7°C aos 48,5°C com uma temperatura ótima entre 30 e 37°C). Resiste também, a várias concentrações de cloreto de sódio (até 15% NaCl). Estas características permitem que cresça e sobreviva em diferentes locais como, secreções nasais, pele e alimentos, podendo ser transmitida por contacto direto, consumo de alimentos ou água contaminada (Loir *et al.*, 2003; Tortora *et al.*, 2012). Para além disso, é desoxirribonuclease positiva: o teste da DNase é utilizado para detetar a degradação do DNA, permitindo distinguir *S. aureus* de estafilococos CoNS (Gerceker *et al.*, 2009).

Constitui, geralmente, parte da microbiota comensal da população humana ou animal que pode provocar um diversificado conjunto de doenças, desde leves infeções na pele a doenças

mais graves, tais como, pneumonia, síndrome do choque tóxico e sépsis. Pode ainda ser responsável por intoxicação alimentar (Sousa *et al.*, 2017). Ao longo dos anos, tem sido a principal fonte de infecções humanas, sendo a mais abundante em infecções na corrente sanguínea, pele, tecidos moles e trato respiratório nos Estados Unidos, Canadá, Europa, América Latina e Pacífico Ocidental (DeLeo *et al.*, 2009). Esta bactéria pode ser encontrada em 80% dos indivíduos dos quais, 20% são portadores persistentes assintomáticos, 60% são portadores intermitentes e 20% não são portadores (Thompson *et al.*, 2014).

A sua patogenicidade deriva da produção de muitas toxinas que aumentam a sua capacidade de invasão dos corpos e lesão dos tecidos. Um problema comum nos hospitais são as infecções de feridas cirúrgicas por *S. aureus* e, consequentemente, a sua capacidade de desenvolver rapidamente resistência a antibióticos como a penicilina, contribuindo para o perigo dos pacientes em ambientes hospitalares (Tortora *et al.*, 2012).

4.1.1. Mecanismos de Patogenicidade

A virulência de *S. aureus* resulta da ação conjunta de vários fatores de virulência que facilitam a adesão tecidual, a invasão ao sistema imunitário e a lesão das células do hospedeiro. Estes determinantes de virulência envolvem fatores associados à membrana que promovem a adesão aos tecidos do hospedeiro (adesinas) e fatores secretados que convertem os tecidos do hospedeiro em nutrientes (enzimas e toxinas) (Figura 7) (E. F. Kong *et al.*, 2016).

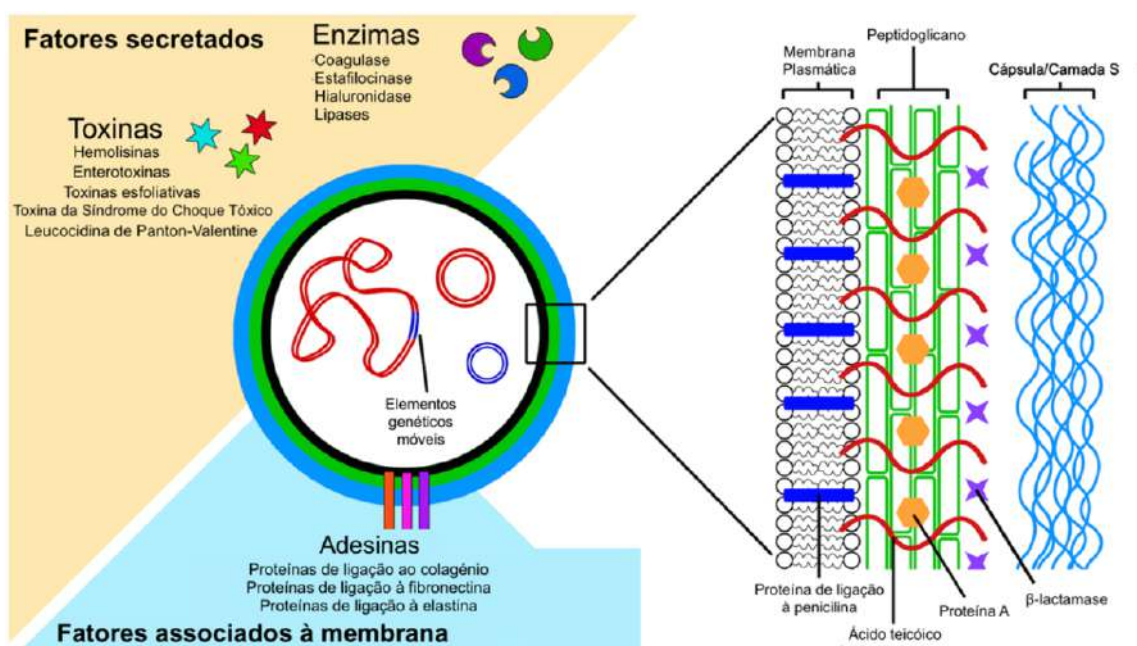


Figura 7. Fatores patogênicos e estrutura celular de *S. aureus* (adaptado de Kong *et al.*, 2016).

As diversas toxinas produzidas por esta bactéria podem induzir uma resposta imune, diferente para cada hospedeiro, que é responsável pelas manifestações clínicas características do processo infeccioso e que determina o grau de severidade dos sintomas sistêmicos. Por exemplo, a toxina da síndrome do choque tóxico pode provocar a síndrome do choque tóxico e a leucocidina de Panton-Valentine está associada a infecções severas de pele, furunculose e pneumonia (A. L. Dos Santos *et al.*, 2007).

Hemolisinas, enterotoxinas, toxinas esfoliativas, a toxina da síndrome do choque tóxico e a leucocidina de Panton-Valentine são exemplos de toxinas que fazem parte da virulência de *S. aureus*. As toxinas são, geralmente, descritas como substâncias tóxicas que são secretadas pelo organismo produtor e interferem diretamente no hospedeiro (Otto, 2014).

As hemolisinas apresentam capacidade hemolítica e citolítica e atuam sobre várias células do hospedeiro como leucócitos, plaquetas, macrófagos e fibroblastos. São classificadas em quatro grupos: alfa, beta, gama e delta. A hemolisina alfa possui ações neurotóxicas e necróticas e é capaz de provocar lise celular através da formação de poros na membrana da célula. A hemolisina beta tem atividade fosfolipase C e é específica para esfingomielina. Contudo, a sua função é pouco conhecida. A hemolisina gama afeta neutrófilos, macrófagos e eritrócitos e pensa-se que tenha um efeito na indução de inflamação. A hemolisina delta induz danos nas membranas de vários tipos celulares e, tal como a hemolisina alfa, apresenta atividade necrótica mas de menor nível (Cervantes-García *et al.*, 2014).

As enterotoxinas são toxinas termoestáveis capazes de sobreviver a condições que normalmente provocariam morte bacteriana. São ainda, tolerantes a pHs baixos e à atividade de enzimas proteolíticas, sendo capazes de manter a sua atividade no trato digestivo mesmo após a ingestão. Como consequência, causam a sintomatologia típica de uma intoxicação alimentar: náuseas, vômitos, diarreia, entre outros (Schmidt *et al.*, 2015).

As toxinas esfoliativas, também designadas por toxinas epidermolíticas, estão classificadas em dois tipos: toxina esfoliativa A (ETA) e toxina esfoliativa B (ETB). A ETA é termoestável e codificada por fagos, enquanto a ETB é termolábil e codificada por plasmídeos. No entanto, ambas podem produzir a síndrome da pele escaldada. Estas toxinas atuam através da destruição de proteínas essenciais para a pele, causando febre e eritemas (Cervantes-García *et al.*, 2014). Aproximadamente 5% dos *S. aureus* produzem toxinas esfoliativas e a prevalência das estirpes produtoras destas toxinas varia geograficamente. De acordo com Ladhani (2001), a ETA é mais prevalente na Europa, África e América do Norte e a ETB surge com maior frequência no Japão.

A toxina da síndrome do choque tóxico (TSST-1) pertence à família das exotoxinas pirogênicas, também designada de superantígenos, e constitui uma proteína termoestável sintetizada por genes cromossômicos. Os superantígenos são proteínas que não ativam o sistema imunológico através do contacto normal entre células apresentadoras de antígenos e linfócitos (Cervantes-García *et al.*, 2014).

A leucocidina de Panton-Valentine (PVL) é um fator de virulência produzido por algumas estirpes capaz de provocar lise de leucócitos e necrose tecidual. Esta toxina induz a formação de poros nos recetores do complemento da membrana celular dos leucócitos. É constituída por dois genes (LukS-PV e LukF-PV) que codificam duas proteínas que são co-transcritas e secretadas separadamente. Apesar de ser produzida apenas por, aproximadamente, 5% das estirpes de *S. aureus*, a PVL é detetada em grande parte dos isolados que causam lesões cutâneas necróticas e pneumonia necrosante grave (Darboe *et al.*, 2019).

Dos fatores de virulência de *S. aureus* também fazem parte enzimas, tais como, a coagulase e a estafilocinase. A secreção destas enzimas permite que as bactérias se escapem das defesas do hospedeiro e que invadam os seus tecidos. A maioria tem como principal objetivo a degradação das moléculas hospedeiras ou a alteração das cascatas de sinalização e vias metabólicas do hospedeiro (C. Kong *et al.*, 2016). A coagulase, como já foi referido anteriormente, é uma enzima bacteriana capaz de coagular o fibrinogénio presente no sangue. O coágulo, por sua vez, atua como protetor contra a fagocitose. A estafilocinase possui ação fibrinolítica, ou seja, o coágulo é destruído (Ferrasso *et al.*, 2015).

Na Tabela 1, estão ainda representados alguns elementos da parede celular de *S. aureus* (polissacarídeos, proteínas antigénicas e outras moléculas importantes) capazes de induzir uma resposta imunológica no hospedeiro (A. L. Dos Santos *et al.*, 2007).

Tabela 1. Constituintes da parede celular de *S. aureus* que participam na indução de uma resposta imune e, as respectivas, funções (adaptado de Cervantes-García et al., 2014; A. L. Dos Santos et al., 2007).

Constituinte	Definições e Funções
Peptidoglicano	É composto por cadeias de subunidades de ácido N-acetilmurâmico e ácido N-acetilglucosamina. Confere resistência e tolerância osmótica. Possui propriedades biológicas importantes: tem atividade endotóxica, desencadeia a produção de interleucina-1 (IL-1), estimula a quimiotaxia e agregação de leucócitos, ativa o complemento e induz a produção de anticorpos opsonizantes.
Ácido teicóico	São específicos da espécie e podem estar ligados covalentemente ao peptidoglicano da parede celular. Funcionam como intermediários na ligação de estafilococos a superfícies mucosas através de junções específicas de fibronectina. Induzem a produção de anticorpos.
Proteína A	Proteína ligada ao peptidoglicano que se liga à imunoglobulina G (IgG), contribuindo para a geração de efeitos anticomplementares, quimiotáticos e antifagocitários.
Cápsula	Pode estar presente ou não. Possui capacidade antifagocitária e facilita a adesão de <i>S. aureus</i> a várias células.
Adesinas	Moléculas que se ligam aos recetores químicos encontrados nas superfícies das células epiteliais do hospedeiro, promovendo a aderência da bactéria a essas células.

Outro mecanismo de patogenicidade e, um dos mais importantes, utilizado por *S. aureus* para crescer e sobreviver em tecidos hospedeiros ou noutras superfícies sólidas é a produção de biofilme (Valle *et al.*, 2019). Bactérias patogénicas capazes de produzir biofilme são um problema sério para a comunidade médica pois os biofilmes podem formar-se em dispositivos médicos, como cateteres e implantes, ou em superfícies humanas, como os dentes, pele e trato urinário. Para além do equipamento médico, vários estudos mostraram a existência de biofilmes na indústria alimentar e em sistemas de distribuição de água (Chmielewski e Frank, 2003; Hatt e Rather, 2008; Huq *et al.*, 2008). As infeções associadas a biofilmes apresentam uma elevada mortalidade e, geralmente, o seu tratamento requer a remoção cirúrgica de dispositivos médicos infetados em adição a doses elevadas e longos períodos de uso de antibióticos, sendo que o resultado nem sempre é satisfatório. Foi ainda descrito que baixas concentrações de antibióticos

promovem o crescimento de biofilmes. Assim, é necessário compreender melhor o desenvolvimento de biofilmes para que possam ser criadas novas estratégias de tratamento para estas infecções (Moormeier e Bayles, 2017; Shi *et al.*, 2016).

Para a produção de biofilme, as bactérias formam uma matriz extracelular, composta por proteínas, hidratos de carbono e/ou DNA extracelular, que as envolve e permite que sobrevivam em ambientes hostis ou extremos (Moormeier e Bayles, 2017). Para além disso, a matriz estabelece uma barreira de proteção contra o sistema imunitário do hospedeiro e impede a penetração de muitos agentes antimicrobianos, reduzindo a sua eficácia (Raafat *et al.*, 2019).

A formação de biofilme tem sido descrita como um processo que engloba pelo menos três passos principais: (i) fixação da bactéria às superfícies, (ii) formação e maturação do biofilme, (iii) dispersão do biofilme (Figura 8).

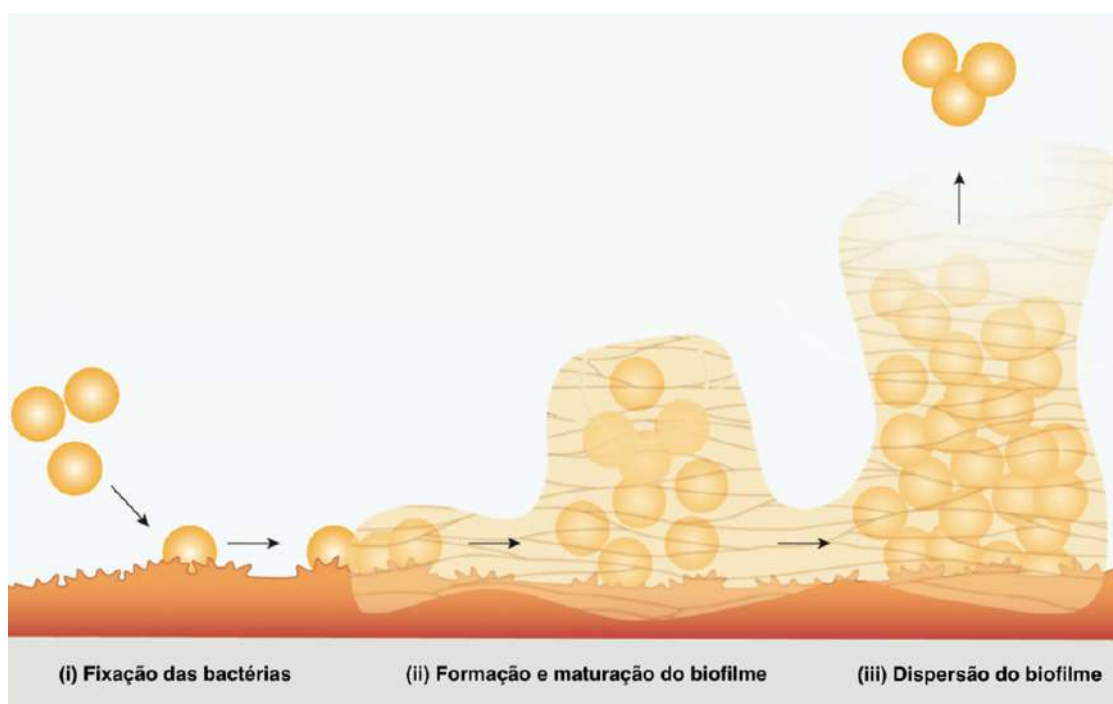


Figura 8. Os três passos principais da formação de biofilme: (i) fixação das bactérias, (ii) formação e maturação do biofilme, (iii) dispersão do biofilme (adaptado de Raafat *et al.*, 2019).

A fixação de bactérias às superfícies plásticas abióticas de dispositivos médicos pode ocorrer por atração hidrofóbica, mas após a sua inserção no paciente, a ligação ocorre entre as proteínas estafilocócicas de ligação à superfície e a matriz extracelular humana. As proteínas estafilocócicas de ligação à superfície são, maioritariamente, componentes da superfície microbiana que reconhecem moléculas da matriz adesiva. Estas têm um domínio exposto que se liga às proteínas da matriz humana, sendo as suas funções principais a colonização e a

sobrevivência bacteriana no hospedeiro. A formação e a maturação do biofilme é caracterizada pela secreção dos componentes da matriz de biofilme e pela criação de uma estrutura tridimensional de biofilme. Um componente característico do biofilme é o polissacarídeo de adesão intercelular (PIA), também designado por poli-N-acetil-glicosamina. Este composto facilita a adesão de célula-a-célula, levando a biofilmes mais robustos. Por fim, a dispersão do biofilme é desencadeada por forças mecânicas de deformação, como encontradas na corrente sanguínea, que levam à disseminação sistêmica de uma infeção associada ao biofilme. Os fatores estruturantes do biofilme também podem contribuir para a sua dispersão através da interrupção de interações entre as moléculas da matriz do biofilme (Raafat *et al.*, 2019).

4.2. *S. aureus* Resistente à Meticilina (MRSA)

Mais de 47% dos isolados de *S. aureus* de hospitais portugueses são MRSA, sendo esta uma das maiores percentagens da Europa. De facto, este microrganismo é de elevada importância pois, para além de ser resistente à maioria dos antibióticos β -lactâmicos, apresenta ainda mecanismos de resistência a outros agentes não β -lactâmicos (Sousa *et al.*, 2017).

As infeções causadas por MRSA apresentam uma taxa de mortalidade elevada (aproximadamente 20%), estando a maioria associada a cuidados de saúde. Este facto pode estar relacionado com o estado de saúde do paciente dado que ocorrem em indivíduos com maior predisposição a fatores de risco como indivíduos sujeitos recentemente a cirurgias ou pacientes com o sistema imunitário suprimido (DeLeo *et al.*, 2009).

4.2.1. Mecanismos de Resistência à Meticilina

A resistência à metilina pode ser resultado de dois mecanismos distintos: a produção de β -lactamases que levam à diminuição da atividade dos antibióticos β -lactâmicos e a produção da proteína de ligação à penicilina 2a (PBP2a). A PBP2a constitui uma PBP alterada que apresenta uma baixa afinidade para fármacos com anéis β -lactâmicos e substitui a PBP na síntese da parede celular bacteriana. Esta é codificada pelo gene *mecA* enquanto as β -lactamases são codificadas pelo gene *blaZ* (R. Kong *et al.*, 2016).

O gene *mecA*, o principal responsável pela resistência, é transportado por um elemento genético designado por *staphylococcal cassette chromosome mec* (SCCmec) (Pinho *et al.*, 2001). A caracterização da cassette cromossómica SCCmec é uma das ferramentas mais importantes para o estudo de MRSA. Este elemento é altamente variável entre as várias espécies de estafilococos e, portanto, os isolados de MRSA podem ser identificados por análise

de PCR do SCC*mec*. Considera-se que o SCC*mec* tenha sido adquirido por transferência horizontal de uma espécie de estafilococo coagulase-negativa, possivelmente, *Staphylococcus sciuri*. Foram reconhecidos, em MRSA, 11 tipos de SCC*mec* (I – XI) e vários subtipos. Os diferentes tipos de SCC*mec* variam na composição, na ordem dos genes codificados no elemento e no tamanho (de 21 a 67kB) (Lambert, 2005; Loncaric *et al.*, 2013).

Em 2011, foi identificado o gene *mecC*, homólogo divergente de *mecA*, não detetável através de métodos de rotina de PCR específicos para *mecA* ou por testes de aglutinação em lâminas de PBP2a. Este gene tem sido investigado em diversos países, tendo sido encontrado em estirpes de MRSA de humanos e de gado (Loncaric *et al.*, 2013).

A vancomicina era o agente terapêutico mais seguro contra infecções causadas por MRSA. Contudo, em 1996, foi isolado de um paciente japonês, o primeiro MRSA a adquirir resistência a este antibiótico (Hiramatsu, 2001).

4.2.2. Epidemiologia

MRSA encontra-se disperso por todo o mundo e a sua prevalência tem vindo a aumentar tanto a nível hospitalar como nas comunidades. A sua proporção varia entre os diferentes países, sendo as maiores taxas hospitalares encontradas na Ásia, Malta, Norte e Sul da América. Estas diferenças devem-se a vários fatores epidemiológicos, como por exemplo, a capacidade do sistema de saúde proporcionar um programa de controlo para infecções (Okwu *et al.*, 2019).

Em 2018, foi observada uma maior prevalência de MRSA nos países do Sul da Europa (25 a 50%), como foi o caso de Portugal, Grécia e Itália. Contrariamente, a menor prevalência de MRSA foi encontrada no Norte da Europa (1 a 5%), como por exemplo, na Finlândia, Suécia e Dinamarca (Figura 9) (ECDC, 2018).

Atualmente, estima-se que 25 a 35% dos indivíduos saudáveis apresentem *S. aureus* na sua pele ou nas mucosas. Isto significa que cerca de dois biliões de pessoas podem estar colonizadas com esta bactéria. Estimativas preveem que aproximadamente 2 a 53 milhões de pessoas possuem MRSA. Esta bactéria representa uma pandemia com disseminação de *Hospital-Associated MRSA* (HA-MRSA), *Community-Associated MRSA* (CA-MRSA) e *Livestock-Associated MRSA* (LA-MRSA) (Stefani *et al.*, 2012).

Até ao momento, MRSA associado a animais não se espalhou significativamente para abrigos ou hospitais na Europa, embora a propagação pareça depender da região e da intensidade de criação de porcos. Hoje em dia, infecções invasivas por LA-MRSA são bastante

raras na Europa, sendo mais frequentes em pessoas com contacto com animais de produção (Stefani *et al.*, 2012).

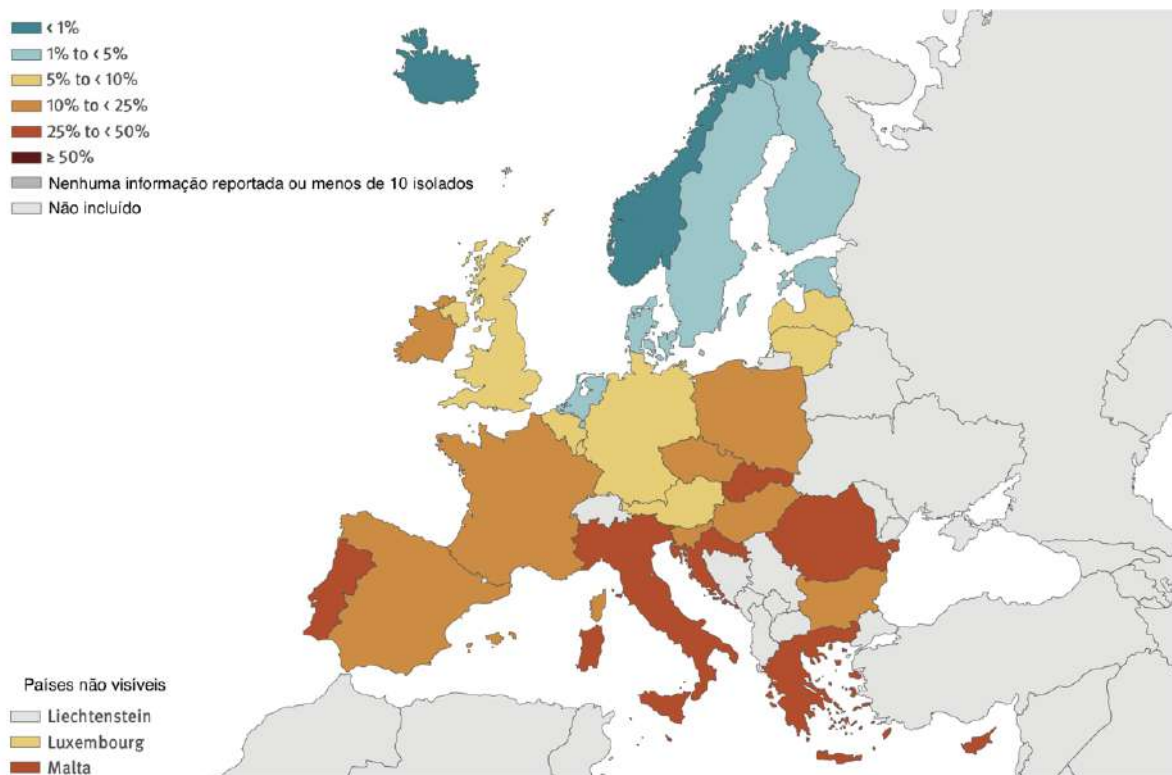


Figura 9. Percentagem (%) de isolados de MRSA de cada país europeu em 2018 (adaptado de ECDC, 2018).

4.2.3. MRSA: *One Health Approach*

MRSA foi isolado pela primeira vez em 1960 e era, geralmente, associado a ambientes hospitalares. Contudo, nos anos 90, começaram a surgir infeções em indivíduos saudáveis que não tinham qualquer tipo de contacto com ambientes hospitalares e não apresentavam fatores de risco para infeções causadas por este microrganismo. A sua incidência aumentou de forma continua e os surtos de MRSA associados à comunidade emergiram entre indivíduos que partilhavam contacto direto com outros, como por exemplo, nas escolas, prisões, balneários, entre outros. A identificação de reservatórios de MRSA na comunidade é fundamental para a prevenção da disseminação de infeções por CA-MRSA. Entre os vários reservatórios ambientais, as águas residuais têm sido identificadas como possíveis fontes de exposição de MRSA à comunidade (Goldstein *et al.*, 2012). Recentemente, novas linhagens genéticas de MRSA foram também ligadas a animais de companhia, animais de produção e a vários alimentos (Sousa *et al.*, 2017). Deste modo, podemos concluir que a saúde dos humanos, dos animais e dos ecossistemas está interligada (Figura 10). A deteção precoce de organismos

patogénicos requer uma abordagem coordenada e interdisciplinar a nível local, regional e global. Para além disso, o aparecimento destes organismos pode provocar efeitos catastróficos na economia através da diminuição do comércio e turismo. À medida que o mundo se torna cada vez mais interligado, as doenças infecciosas emergentes constituem uma ameaça à comunidade global, exigindo a colaboração entre os ministérios da saúde e instituições envolvidas na saúde, comércio, agricultura e meio ambiente. A abordagem *One Health* apresenta oportunidades importantes para reduzir o impacto das doenças emergentes atuais e para evitar futuras através de conhecimento e coordenação aprimorados (Kelly *et al.*, 2017).

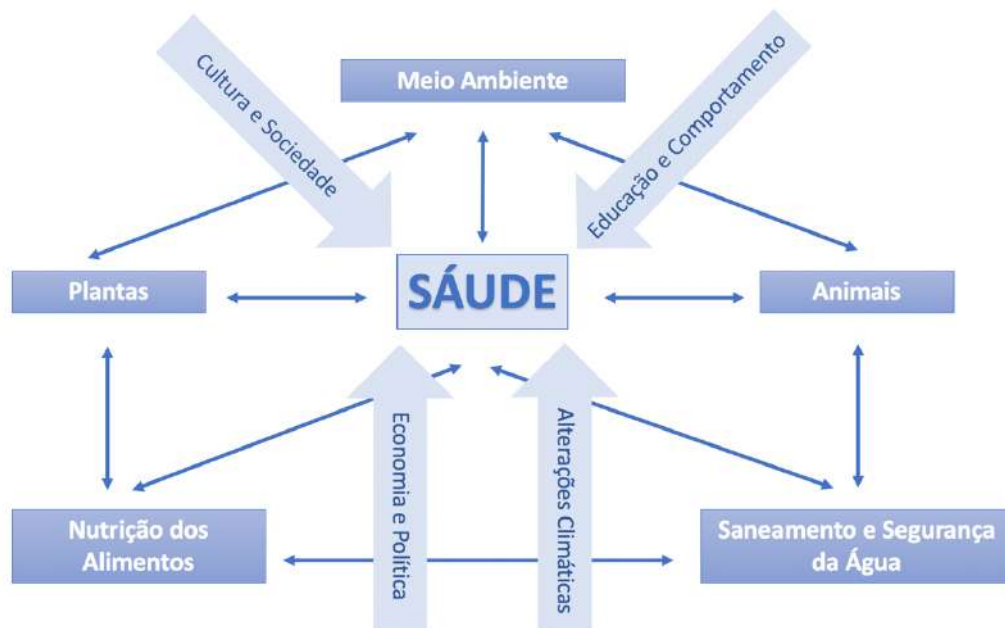


Figura 10. Os diferentes impactos sobre a saúde humana (adaptado de Mazet *et al.*, 2009).

II. OBJETIVOS

A realização deste trabalho teve como principal objetivo o estudo da prevalência de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) em águas residuais hospitalares. Para além deste, teve também, objetivos específicos:

- 1) Isolar MRSA de águas residuais hospitalares tratadas na estação de tratamento de águas residuais (ETAR) do Hospital de S. Pedro através de meios de cultura específicos de forma analisar a sua eficácia;
- 2) Testar a suscetibilidade dos isolados de MRSA frente a 14 agentes antimicrobianos [penicilina (1un), cefoxitina (30µg), tetraciclina (30µg), trimetoprim-sulfametoxazol (1,25 – 23,75µg), ciprofloxacina (5µg), eritromicina (15µg), clindamicina (2µg), gentamicina (10µg), tobramicina (10µg), cloranfenicol (30µg), canamicina (30µg), ácido fusídico (10µg), linezolid (10 µg), mupirocina (200µg)] através do método de difusão de disco Kirby-Bauer;
- 3) Testar a suscetibilidade dos isolados de MRSA frente à eritromicina (15µg) e à clindamicina (2µg) através do Teste-D;
- 4) Analisar o potencial de MRSA para a formação de biofilme através do ensaio em placa de microtitulação e do método Vermelho do Congo agar.

III. MATERIAL E MÉTODOS

1. Recolha de Amostras

A recolha de amostras foi realizada semanalmente ao longo de seis meses (outubro de 2019 a março de 2020). Foram recolhidas 96 amostras de águas do Centro Hospitalar de Trás-os-Montes e Alto Douro (CHTMAD): 24 amostras do efluente do Hospital de Proximidade de Lamego, em Lamego, 24 amostras do efluente Hospital Distrital de Chaves, em Chaves, 24 amostras do efluente do Hospital de S. Pedro, em Vila Real e 24 amostras de água após o tratamento da ETAR do Hospital de S. Pedro.

2. Preparação de Meios de Cultura

Para o isolamento de MRSA foi necessário preparar cinco de meios de cultura: *Brain Heart Infusion* (BHI) líquido suplementado com 6,5% de NaCl, BHI agar, *Oxacilin Resistance Screening Agar Base* (ORSAB), DNase agar e meio de leite. Para além destes, para testar a suscetibilidade das bactérias isoladas aos agentes antimicrobianos e para a análise de produção de biofilmes, foi necessário preparar *Mueller-Hinton* (MH) agar, *Luria-Bertani* (LB) líquido e Vermelho do Congo agar, respetivamente.

Aos meios utilizados, com exceção do meio de leite, foi adicionada água destilada e, posteriormente, foram autoclavados a 121° C durante 15 minutos. De seguida, foram distribuídos em placas de Petri no interior de uma câmara de fluxo laminar vertical. Os meios BHI líquido e LB líquido foram colocados na autoclave em tubos. Antes da distribuição do meio ORSAB e depois de este se encontrar a 37° C, foi-lhe adicionado oxacilina (2 mg/L). O meio de leite foi distribuído em criotubos e, só depois, foi autoclavado a 121° C durante 20 minutos. Os meios de cultura utilizados no desenvolver deste trabalho estão descritos em Anexo.

3. Isolamento de MRSA

No interior de uma câmara de fluxo laminar vertical, as amostras de águas residuais hospitalares foram filtradas através uma membrana de filtração. Para tal, utilizou-se 100 mL de cada amostra e recorreu-se a um filtro de 0,45 µm. Os filtros foram, posteriormente, submersos em BHI líquido. Como este meio é suplementado com NaCl, permite uma pré-seleção de *Staphylococcus* spp. Por fim, os tubos foram colocados na estufa a 37° C durante 24h, simulando condições ótimas de crescimento.

Depois das 24h na estufa, todas as amostras foram semeadas por estria em meio ORSAB. As placas foram colocadas na estufa à temperatura de 37° C durante 24h, permitindo assim, observar o crescimento de colônias resistentes. O meio utilizado é um meio seletivo, ou seja, através da alteração da sua cor é possível distinguir diferentes espécies de bactérias. Neste caso, as colônias de estafilococos resistentes à meticilina apresentam uma coloração azul brilhante e uma forma arredondada (Figura 11).



Figura 11. Colônias de MRSA em meio ORSAB.

4. Identificação de MRSA

Para a identificação de MRSA, as colônias isoladas no meio ORSAB foram semeadas por esgotamento em BHI agar e, após 24h na estufa a 37° C, foram submetidas a dois testes bioquímicos: o teste da catalase e o teste da DNase.

4.1. Teste da Catalase

A catalase é uma enzima presente em estafilococos capaz de degradar o H_2O_2 , resultando na formação de água e oxigênio. O oxigênio é libertado e, consequentemente, é observada uma formação de bolhas (Figura 12). Assim, para determinar se as colônias obtidas em BHI agar são *Staphylococcus* spp., foi realizado o teste da catalase (Cervantes-García *et al.*, 2014). Para a sua realização, foi necessário recorrer a uma ansa estéril que permitiu a transferência das colônias em BHI agar para uma gota de H_2O_2 . Não havendo efervescência, o teste é considerado negativo para a catalase.



Figura 12. Teste positivo para a catalase (lado esquerdo): degradação de H_2O_2 .

4.2. Teste da DNase

De seguida, as colônias positivas para o teste da catalase foram submetidas ao teste da DNase. Este é usado para determinar se o microrganismo é capaz de degradar o ácido desoxirribonucleico (DNA) existente no meio. A desoxirribonuclease, presente nas paredes

extracelulares das bactérias, é uma enzima que leva à degradação do DNA. Em adição, este teste permite diferenciar *S. aureus* de estafilococos coagulase-negativos.

As colônias foram semeadas em DNase agar, em forma de botão, e colocadas na estufa a 37° C durante 24h. A atividade enzimática é detetada pela adição de ácido hidroclorídrico 1M (HCl). Quando as colônias são produtoras de DNase há degradação do DNA e, portanto, há formação de um halo transparente, como é demonstrado pela Figura 13. Neste caso, o teste é considerado positivo (Gerceker *et al.*, 2009).



Figura 13. Teste positivo para a DNase: formação de um halo transparente.

Por fim, as colônias que foram positivas para ambos os testes bioquímicos foram semeadas novamente em BHI agar por esgotamento e colocadas na estufa a 37° C durante 24h. Este passo permitiu conservar as várias estirpes de MRSA em meio de leite a uma temperatura de -20° C.

5. Suscetibilidade a Antimicrobianos: Método de Difusão de Disco Kirby-Bauer

Após a identificação de MRSA, foi analisada a sua resistência face a 14 agentes antimicrobianos através do método de difusão de disco Kirby-Bauer. Este método constitui umas das mais antigas formas de testar a suscetibilidade a antimicrobianos, sendo ainda usada rotineiramente em laboratórios de microbiologia clínica. É versátil e adequado para a maioria das bactérias patogénicas (Matuschek *et al.*, 2014).

Depois da inoculação da bactéria, previamente diluída em soro fisiológico a 0,5 da escala de McFarland, são distribuídos discos de papel de filtro impregnados com uma determinada concentração de antibiótico numa placa com MH agar. Posteriormente, as placas são incubadas a 37° C por 18-24h. Durante a incubação, os antibióticos difundem-se no agar, inibindo o crescimento dos microrganismos (Figura 14).

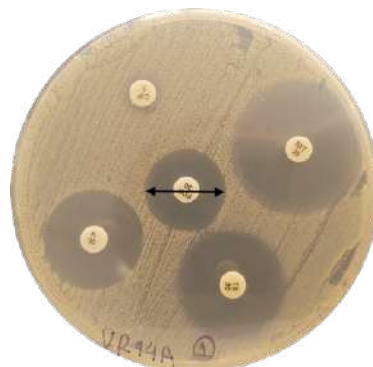


Figura 14. Antibiograma de um MRSA: halo de inibição de crescimento (setas a preto).

A suscetibilidade ao antibiótico é medida através do diâmetro das zonas de inibição de crescimento bacteriano em torno do disco (Syal *et al.*, 2017). Os valores dos diâmetros das

zonas de inibição foram comparados com as tabelas do *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST, 2018), com a exceção da Canamicina em que foram utilizadas as normativas do *Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2017). Este método é barato e fácil de interpretar. No entanto, fornece apenas resultados qualitativos, categorizando as bactérias como “Sensível”, “Intermediário” e “Resistente” (Balouiri *et al.*, 2016).

Na Tabela 2 estão descritos os agentes antimicrobianos utilizados ao longo deste estudo, bem como as respectivas concentrações usadas em cada disco.

Tabela 2. Agentes antimicrobianos utilizados e respectivas quantidades presentes em cada disco (EUCAST, 2018).

Classe	Antimicrobiano	Quantidade por disco
Penicilinas	Benzilpenicilina/Penicilina G (P)	10 unidades
Cefalosporinas (2 ^a geração)	Cefoxitina (FOX)	30µg
Fluoroquinolonas	Ciprofloxacina (CIP)	5 µg
Aminoglicosídeos	Canamicina (K)	30 µg
	Gentamicina (CN)	10 µg
	Tobramicina (TOB)	10 µg
Macrólidos	Eritromicina (E)	15 µg
Lincosamidas	Clindamicina (CD)	2 µg
Tetraciclinas	Tetraciclina (TET)	30 µg
Fusidanos	Ácido fusídico (FD)	10 µg
Sulfonamidas	Trimetoprim-sulfametoxazol (SXT)	1,25 – 23,75 µg
Fenicóis	Cloranfenicol (C)	30 µg
Oxazolidinonas	Linezolida (LNZ)	10 µg
Outros	Mupirocina (MUP)	200 µg

5.1. Suscetibilidade à Eritromicina e à Clindamicina: Teste-D

A expressão do fenótipo MLS_B pode ser constitutiva (cMLS_B) ou induzível (iMLS_B) na presença de baixas concentrações de indutores, tal como é o caso da eritromicina. *In vitro*, isolados de *S. aureus* com resistência constitutiva são resistentes à eritromicina e clindamicina e isolados com resistência induzível são resistentes à eritromicina, mas aparentam ser sensíveis à clindamicina. O fenótipo iMLS_B não é detetado através dos testes de suscetibilidade padrão, incluindo o teste de difusão de disco com discos de eritromicina e clindamicina em posições não adjacentes (A. C. O. Silva *et al.*, 2016).

Deste modo, isolados que apresentavam resistência à eritromicina foram testados para resistência MLS_B através do Teste-D de acordo com as diretrizes CLSI (2017). Discos de eritromicina (15 μg) e clindamicina (2 μg) foram colocados com uma distância de 1 cm de borda-a-borda numa placa de MH inoculada com a bactéria previamente diluída em soro fisiológico a 0,5 da escala de McFarland. Após 24h na estufa, foram observados os resultados: quando o isolado é resistente à eritromicina e à clindamicina, considera-se que apresenta o fenótipo cMLS_B ; quando o isolado é resistente à eritromicina e sensível à clindamicina e o halo de inibição da clindamicina surge achatado com uma forma semelhante a um “D”, tal como é demonstrado na Figura 15, considera-se que apresenta o fenótipo iMLS_B (Teste-D positivo); quando o isolado é resistente à eritromicina e sensível à clindamicina e o halo de inibição da clindamicina é circular, considera-se que apresenta o fenótipo MS (resistência a macrólidos e estreptograminas) (Teste-D negativo) (Sasirekha *et al.*, 2014).



Figura 15. Teste-D positivo: halo de inibição da clindamicina surge com forma achatada.

6. Potencial para a Produção de Biofilme

6.1. Método Vermelho do Congo Agar

O método Vermelho do Congo agar, descrito por Freeman *et al.* (1989), baseia-se na inoculação de estirpes bacterianas em BHI agar suplementado com sacarose e corante vermelho do Congo. Os resultados foram determinados através de uma análise qualitativa das cores das colónias que cresceram no meio: as colónias pretas são consideradas fortes produtores de

biofilme, as colônias castanhas são consideradas produtores moderados de biofilme e as colônias vermelhas são consideradas não-produtores de biofilme (Figura 16).



Figura 16. Crescimento de biofilme de MRSA em placas de vermelho do Congo agar: (i) colônias pretas, (ii) colônias castanhas, (iii) colônias vermelhas.

6.2. Ensaio em Placa de Microtitulação

O ensaio em placa de microtitulação permitiu analisar quantitativamente a capacidade de MRSA formar biofilme. Este ensaio foi realizado de acordo com a metodologia descrita por O'Toole (2010). As bactérias isoladas foram repicadas de BHI agar, inoculadas em meio LB com concentração equivalente ao padrão 0,5 da escala de McFarland e semeadas em placas de poliestireno de 96 poços com um volume final de 200 μ L. Após 24 e 48 horas na estufa, foram realizadas duas lavagens com água destilada. As bactérias foram, posteriormente, coradas com 200 μ L de cristal violeta a 1% por 5 minutos. O corante foi removido e as placas foram lavadas duas vezes com água destilada. Após a secagem das placas, foi adicionado 200 μ L de ácido acético em cada poço. A absorvância foi lida a 590 nm no leitor BioTek ELx808 e foram avaliadas três réplicas de cada amostra. Os resultados foram interpretados tendo em conta os valores de absorvância: $A_{590} < 0,120$ - não-produtor; $0,120 < A_{590} < 0,240$ - produtor moderado e $A_{590} > 0,240$ - produtor forte (Shah *et al.*, 2019).

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Caracterização Morfológica

É importante referir que neste estudo, foram consideradas como positivas para a presença de MRSA todas as amostras de água que formaram colónias azuis em meio ORSAB e resultados positivos para o teste da catalase e para o teste da DNase. Entre as 96 amostras de água, 45 foram presumivelmente identificadas como positivas para a presença de MRSA pois formaram colónias de cor azul brilhante e forma redonda em meio ORSAB (Aklilu e Ying, 2020). Para além disso, estas 45 amostras foram todas positivas para o teste da catalase. Contudo, apenas 62% demonstrou resultados positivos para o teste da DNase. Assim, 28 amostras de água foram consideradas positivas para a presença de MRSA (Figura 17).

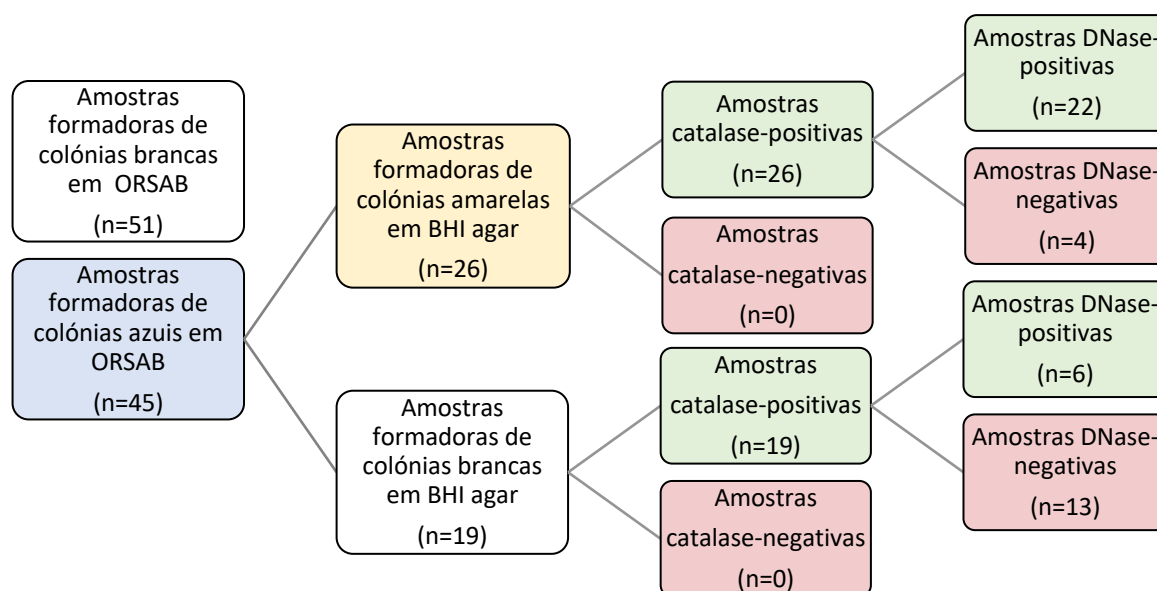


Figura 17. Características morfológicas das colónias bacterianas encontradas nas amostras de água.

A partir dos resultados obtidos podemos concluir que a coloração das colónias em BHI agar não denota a presença de *S. aureus* catalase e DNase-positivos. Deste modo, tal como descrito em Begum *et al.* (2007), a produção de um tipo particular de pigmento não pode ser considerado um critério satisfatório para a identificação de *S. aureus*.

O teste da coagulase em tubo era usualmente usado como o teste padrão para diferenciar *S. aureus* de outros estafilococos coagulase-negativos. Como alternativa, pode ser usado o teste da DNase pois este apresenta forte concordância com o teste da coagulase em tubo e um baixo número de falsos positivos ou negativos (Hiko, 2019). No entanto, com o intuito de melhorar este estudo e confirmar os resultados obtidos, no futuro, irão ser realizados testes adicionais.

2. Prevalência de MRSA em Efluentes Hospitalares

Todos hospitais em estudo apresentaram MRSA nas amostras dos seus efluentes. A distribuição das amostras de água positivas para a presença de MRSA variou de acordo com o hospital e com a data de recolha. Segundo a Tabela 3, 38% das amostras de efluentes hospitalares foram positivas para MRSA: 11% do Hospital de S. Pedro, 17% do Hospital de Proximidade de Lamego e 10% do Hospital Distrital de Chaves. Assim, o Hospital Distrital de Chaves apresenta menor prevalência de MRSA enquanto o Hospital de Proximidade de Lamego apresenta maior prevalência de MRSA. Apesar do número de MRSA ter vindo a diminuir em vários países Europeus (por exemplo, Bélgica, França, Reino Unido), Portugal continua a apresentar uma das mais elevadas prevalências na Europa (ECDC, 2018), sendo de esperar uma elevada prevalência de MRSA. Os resultados reforçam que os efluentes hospitalares são reservatórios para MRSA.

Tabela 3. Prevalência de MRSA nos efluentes dos três hospitais do CHTMAD e percentagens relativas.

	Hospital de S. Pedro (n=24)	Hospital de Proximidade de Lamego (n=24)	Hospital Distrital de Chaves (n=24)
Efluente Hospitalar c/ MRSA	8/24 (33%)	12/24 (50%)	7/24 (29%)
Total (n=72)	8/72 (11%)	12/72 (17%)	7/72 (10%)

2.1. Eficácia da ETAR do Hospital de S. Pedro

Com o intuito de analisar a eficácia do tratamento de águas realizado na ETAR do Hospital de S. Pedro, foram recolhidas amostras de água após o tratamento. Destas 24 amostras, apenas uma foi positiva para a presença de MRSA (Figura 18). Quando comparamos a prevalência de MRSA nas amostras de água após o tratamento (4%) com a dos efluentes hospitalares (38%), podemos observar que é menor nas amostras de água após o tratamento, o que nos leva a concluir que o tratamento tem um efeito negativo na sobrevivência de MRSA. Estes resultados estão de acordo com outras investigações que também demonstram uma diminuição no número

de isolados de MRSA após tratamento (Börjesson *et al.*, 2010; Goldstein *et al.*, 2012; Gómez *et al.*, 2016).

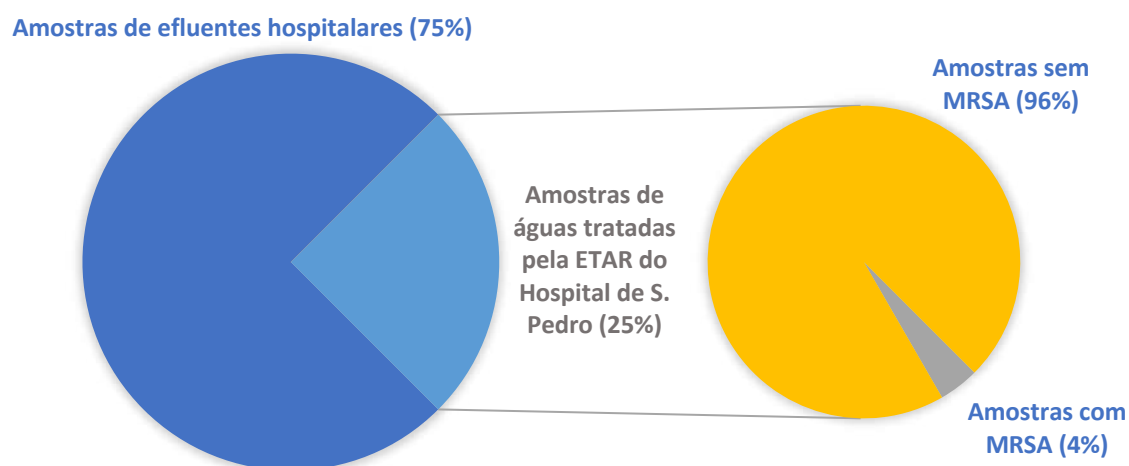


Figura 18. Representação gráfica do total de amostras recolhidas, evidenciando a percentagem de amostras sem MRSA relativamente a amostras com MRSA isoladas de águas tratadas pela ETAR do Hospital de S. Pedro.

Geralmente, não é feita nenhuma separação em termos de drenagem de efluentes domésticas e hospitalares, sendo estes, muitas vezes, descarregados diretamente para redes de saneamento públicas, sem qualquer pré-tratamento, e tratados, em conjunto, nas ETARs municipais, tal como é o caso do Hospital de Proximidade de Lamego e do Hospital Distrital de Chaves. Assim, este estudo reforça a importância da implementação de ETARs nos hospitais, permitindo a diminuição da sobrevivência de bactérias e, consequentemente, da sua disseminação. Contudo, o tratamento da ETAR do Hospital de S. Pedro não é totalmente eficaz e, segundo Goldstein *et al.* (2012), os isolados que sobrevivem apresentam maior probabilidade de ser multirresistentes e virulentos, sendo assim de elevada importância reajustar o protocolo de tratamento ou implementar um tratamento adicional.

3. Caracterização Fenotípica da Resistência

Como a caracterização fenotípica dos isolados pode ser afetada pela escolha das colónias, quando possível e, de forma aleatória, foram recolhidas duas colónias por amostra. Assim, das 28 amostras positivas, foram isolados 46 MRSA. Na Tabela 4, podemos observar que estes apresentaram 18 fenótipos de resistência diferentes, sendo P-FOX-CIP-CN-E o fenótipo mais comum. Apenas dois isolados não foram considerados multirresistentes enquanto os restantes apresentam resistência a mais do que três classes de antibióticos. Resultados semelhantes foram descritos por Ramessar e Olaniran (2019).

Tabela 4. Fenótipos de resistência dos MRSA isolados (n=46) e percentagens relativas.

Fenótipo de Resistência	Nº de Isolados	Percentagem
P-FOX-CIP-CN-TOB-K-E-CD-TE-C-FD-SXT	3	7%
P-FOX-CIP-LNZ-CN-K-E-CD-TE-C-FD	1	2%
P-FOX-CIP-CN-K-E-CD-TE-C-FD	1	2%
P-FOX-CIP-CN-TOB-K-E-CD-TE-FD	2	4%
P-FOX-CIP-CN-TOB-E-CD-TE-FD	6	13%
P-FOX-CIP-CN-TOB-K-E-CD-FD	1	2%
P-FOX-CIP-CN-E-CD-TE-FD	2	4%
P-FOX-CIP-CN-TOB-E-CD-FD	4	9%
P-FOX-CIP-CN-TOB-CD-TE-FD	1	2%
P-FOX-CIP-CN-TOB-E-CD	1	2%
P-FOX-CIP-E-CD-TE-FD	1	2%
P-FOX-CIP-E-TE-FD	1	2%
P-FOX-CIP-CN-E-FD	1	2%
P-FOX-CIP-CN-TOB-E	5	11%
P-FOX-CIP-CN-E	7	15%
P-CIP-E-CD-FD	1	2%
P-FOX-CIP-E	6	13%
P-FOX-CIP	2	4%
Total	46	100%

P – Penicilina, FOX – Cefoxitina, CIP – Ciprofloxacina, K – Canamicina, CN – Gentamicina, TOB – Tobramicina, E – Eritromicina, CD – Clindamicina, TET – Tetraciclina, FD – Ácido fusídico, SXT – Trimetoprim-sulfametoxazol, C – Cloranfenicol, LNZ – Linezolida, MUP – Mupirocina.

Efluentes hospitalares espalhados por todo o mundo apresentam bactérias resistentes a antibióticos, mas apenas poucos países recomendam tratamentos específicos antes destes serem descarregados para o meio ambiente (Hocquet *et al.*, 2016). Neste estudo foi possível observar que o tratamento ao qual os efluentes do Hospital de S. Pedro são sujeitos não é totalmente eficaz, o que indica que bactérias multirresistentes são libertadas para o meio ambiente através

dos sistemas de esgoto. Isto constitui uma séria ameaça para saúde pública. As infecções por MRSA multirresistentes podem ser difíceis de tratar, especialmente em crianças, idosos e pacientes imunocomprometidos, o que reforça novamente a necessidade de melhorar o processo de tratamento dos efluentes hospitalares, de forma a evitar a disseminação de estirpes multirresistentes (Akya *et al.*, 2020).

Segundo as normas EUCAST (2018), os isolados apresentaram resistência à penicilina, cefoxitina, ciprofloxacina, linezolida, gentamicina, tobramicina, canamicina, eritromicina, clindamicina, tetraciclina, cloranfenicol, ácido fusídico e trimetoprim-sulfametoxazol. Nenhum apresentou resistência à mupirocina. Na Figura 19 está descrito o número de isolados e, a respetiva percentagem, com resistência a cada um destes antibióticos.

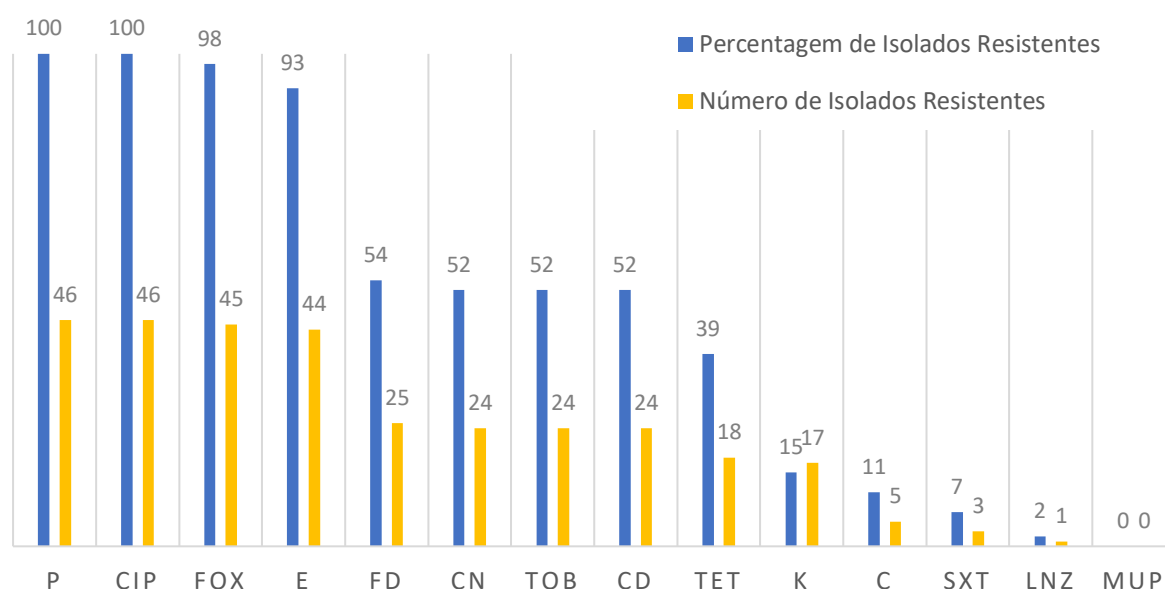


Figura 19. Número e percentagem de isolados com resistência a cada um dos antibióticos testados (P – Penicilina, CIP – Ciprofloxacina, FOX – Cefoxitina, E – Eritromicina, FD – Ácido fusídico, CN – Gentamicina, TOB – Tobramicina, CD – Clindamicina, TET – Tetraciclina, K – Canamicina, C – Cloranfenicol, SXT – Trimetoprim-sulfametoxazol, LNZ – Linezolida, MUP – Mupirocina).

Tendo em conta os dados do relatório “*Annual Epidemiological Report for 2017*”, no sector hospitalar português, a penicilina (P) e a cefoxitina (FOX) constituem os dois grupos de antibióticos mais utilizados e a associação de trimetopim a sulfametoxazol (SXT) faz parte dos grupos menos utilizados. Posto isto, seria de esperar o elevado número de isolados com resistência à penicilina (n=46) e à cefoxitina (n=45) e o baixo número de isolados resistentes ao trimetoprim-sulfametoxazol (n=3) (ECDC, 2017).

Tal como no estudo de Jayaweera e Kumbukgolla (2017), todos os isolados apresentaram resistência à ciprofloxacina (CIP). Duas possíveis explicações para o elevado número de isolados resistentes à ciprofloxacina são a transferência de genes de resistência ou a presença

deste antibiótico nas águas residuais hospitalares em concentrações subinibitórias. Rodriguez-Mozaz *et al.*, (2015) reportou que entre as várias classes, esta foi detetada em maior concentração em amostras de efluentes hospitalares. Os antibióticos podem ser classificados de acordo com o seu espectro de ação: antibióticos de curto espectro que são eficazes contra um número reduzido de microrganismos e antibióticos de largo espectro que são eficazes contra uma ampla gama de microrganismos (Melander *et al.*, 2018). A ciprofloxacina é considerada um antibiótico de largo espectro e, portanto, a possibilidade deste agente estar presente em concentrações subinibitórias em efluentes hospitalares é ainda mais preocupante.

A resistência aos aminoglicosídeos foi avaliada pela deteção de resistência fenotípica à gentamicina (CN), canamicina (K) e tobramicina (TOB): 74%, 15% e 52%, respetivamente. Os aminoglicosídeos têm sido amplamente utilizados para tratar infeções por MRSA. No entanto, tem havido um aumento na prevalência de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos, tornando esses antibióticos ineficazes contra estirpes de MRSA. Existem relatos de uma provável relação entre a resistência a aminoglicosídeos e a resistência à meticilina, possivelmente devido ao facto dos β -lactâmicos levarem ao aumento da captação de aminoglicosídeos (V. Silva *et al.*, 2020). Segundo Vázquez *et al.* (2016), o efeito sinérgico do uso da gentamicina com ácido carnósico é capaz de eliminar os isolados clínicos de MRSA. Assim, esta combinação é uma boa alternativa para a geração de novos fármacos eficazes na prevenção e no tratamento de infeções por MRSA.

Vinte cinco dos isolados (54%) foram resistentes ao ácido fusídico (FD). A resistência ao ácido fusídico entre MRSA sofreu um rápido aumento depois de 2008, mais de 50 anos depois da sua primeira utilização. O uso mais intenso de ácido fusídico ocorreu na comunidade, onde MRSA resistente ao ácido fusídico emergiu rapidamente (Ellington *et al.*, 2015).

Apesar da tetraciclina (TET) ser o grupo de antibacterianos menos usado nos hospitais portugueses, cerca de 40% dos isolados foram resistentes à tetraciclina (ECDC, 2017). No entanto, estes resultados foram consistentes com estudos anteriores que apresentaram taxas de resistência de 53,7% (Mehdi *et al.*, 2019).

Os isolados exibiram uma baixa prevalência de resistência ao cloranfenicol (C) (11%). O mesmo foi descrito por Udo e Boswihi (2017). Contudo, estirpes bacterianas com resistência ao cloranfenicol estão constantemente a emergir (Lépesová *et al.*, 2018). O cloranfenicol foi inicialmente considerado um agente antimicrobiano promissor, mas, em 1960, começaram a ser observados sérios efeitos adversos, tais como, anemia aplásica, supressão da medula óssea e síndrome de Gray em bebés. Posto isto, o cloranfenicol é apenas usado em medicina humana

para o tratamento de um pequeno número de infecções graves ou para aplicações tópicas, o que explicaria a baixa prevalência de resistência a este agente (Schwarz *et al.*, 2016).

A mupirocina (MUP) é um antimicrobiano tópico com excelente atividade anti-estafilococos e anti-estreptococos (Nizamuddin *et al.*, 2011). Tornou-se disponível para uso tópico em 1985 e é, atualmente, o tópico antibacteriano mais prescrito para o tratamento de infecções causadas por MRSA. A resistência à mupirocina foi detectada no Reino Unido em 1987 e, desde então, as taxas de resistência têm aumentado em muitos países à medida que o uso da mupirocina também aumentou (Park *et al.*, 2018). A inexistência de isolados com resistência à mupirocina neste estudo permite concluir que a sua utilização é segura. Contudo, uma vez que a resistência está significativamente associada à sua utilização, é importante monitorizar as taxas de resistência nas instituições em que a mupirocina é prescrita (Monteiro *et al.*, 2016).

Apenas um dos isolados apresentou resistência à linezolida (LNZ). Em diversos estudos, tais como Duarte *et al.* (2018), El Gemezy *et al.* (2016) e Shivappa *et al.* (2018), este agente antimicrobiano apresentou 100% de eficácia contra MRSA. No entanto, resistência à linezolida já foi descrita por Tsiodras *et al.* (2001). De qualquer modo, esta continua a ser uma das melhores opções para o tratamento de infecções por MRSA.

3.1. Caracterização Fenotípica da Resistência MLS_B

Neste estudo, 93% dos isolados apresentaram resistência à eritromicina (E) e 52% apresentaram resistência à clindamicina (CN). O aumento da frequência de infecções por estafilococos e alterações nos padrões de resistência antimicrobiana despertaram o interesse no uso da clindamicina para o seu tratamento. A clindamicina constitui uma boa opção devido à sua tolerabilidade, ao seu custo e à sua excelente capacidade de penetração nos tecidos. Para além disto, é uma boa alternativa para o tratamento de infecções por MRSA (Sasirekha *et al.*, 2014). Infelizmente, o uso excessivo e inadequado de antibióticos, tanto para tratamento animal e humano, como para suplementos alimentares que promovam o crescimento, levaram ao aumento de resistência a macrólidos, lincosamidas e estreptograminas (Mišić *et al.*, 2017).

Dos 44 isolados resistentes à eritromicina, apenas 24 apresentaram co-resistência à clindamicina (fenótipo cMLS_B). No entanto, quando os 20 isolados restantes foram submetidos ao Teste-D, todos exibiram resultados positivos, o que indica que apresentam resistência induzida à clindamicina (fenótipo iMLS_B) (Tabela 5). Estes resultados estão de acordo com Mišić *et al.* (2017) mas em contraste com Khodabandeh *et al.* (2019). Os isolados de estafilococos que exibem o fenótipo iMLS_B não devem ser tratados com clindamicina pois as

estirpes resistentes à eritromicina podem ser falsamente consideradas sensíveis à clindamicina. Neste estudo, apenas dois isolados eram realmente sensíveis à clindamicina. Contrariamente, se as estirpes resistentes à eritromicina forem também consideradas resistentes à clindamicina, um agente antimicrobiano seguro e eficaz será omitido do tratamento de pacientes infectados. Assim, é necessário determinar o fenótipo de resistência MLS_B através do Teste-D, de forma a monitorizar a sua prevalência, especialmente em áreas onde a ocorrência de estirpes de estafilococos resistentes à meticilina é elevada. A prevalência do fenótipo iMLS_B pode variar ao longo do tempo e, por isso, é necessário realizar estudos frequentes, particularmente onde o Teste-D não é realizado de forma rotineira (Mišić *et al.*, 2017). Contudo, apesar da significativa importância em conhecer o tipo de resistência MLS_B e do Teste-D ser de fácil realização e de baixo custo, não existem dados suficientes relativamente à sua prevalência (Khodabandeh *et al.*, 2019; Sedaghat *et al.*, 2017).

Tabela 5. Suscetibilidade à eritromicina e clindamicina entre todos os isolados de MRSA.

Fenótipo de Resistência	Nº de Isolados	Percentagem
E-S, CD-S	2	5%
E-R, CD-R (cMLS_B)	24	52%
E-R, CD-S, Teste-D positivo (iMLS_B)	20	43%
E-R, CD-S, Teste-D negativo (MS)	0	0%
Total	46	100%

E - Eritromicina, CD - Clindamicina, S - Sensível, R - Resistente, cMLS_B - Resistência constitutiva à clindamicina, iMLS_B - Resistência induzível à clindamicina, MS - Resistência a macrólidos e estreptograminas.

A distribuição de fenótipos de resistência MLS_B pode variar devido à região geográfica, à prescrição, ao uso arbitrário de antibióticos, entre muitos outros fatores (Khodabandeh *et al.*, 2019). Dos vinte MRSA com fenótipo iMLS_B foram isolados seis do Hospital de S. Pedro, dez do Hospital de Proximidade de Lamego e quatro do Hospital Distrital de Chaves. Em estudos realizados na Europa, a incidência de iMLS_B foi observada em 38% dos CA-MRSA, em 6,7% dos HA-MRSA e em 63,6% dos MSSA (*S. aureus* sensíveis à meticilina) (Toka Özer, 2016).

4. Caracterização Fenotípica do Potencial para Formação de Biofilme

O aumento de taxas de infecção por MRSA representa uma ameaça significativa para a saúde humana e, enquanto a resistência antimicrobiana tem vindo a ser considerada uma das principais causas, um fator menos estudado e igualmente importante é a capacidade de *S. aureus* produzir biofilme. Há muito que se reconhece que os biofilmes aumentam a resistência à ação antimicrobiana, tanto por agentes externos, como os antibióticos, como por agentes internos do sistema imunológico inato, como os peptídeos antimicrobianos (AMPs). Na verdade, as bactérias que vivem em biofilme são geralmente capazes de tolerar concentrações de antibióticos mais elevadas. Como resultado, as infeções associadas a biofilmes são notoriamente mais difíceis de erradicar, havendo uma necessidade urgente de desenvolver novos métodos capazes de atingir bactérias produtoras de biofilme. Infelizmente, o desenvolvimento de inibidores de biofilme úteis e de agentes de dispersão de biofilmes estafilocócicos está numa fase muito precoce. Embora muitas abordagens inovadoras para erradicar os biofilmes de *S. aureus* tenham sido alcançadas nas últimas décadas, como pequenas moléculas que evitam a formação de biofilmes, enzimas que enfraquecem a integridade estrutural da matriz do biofilme e anticorpos e vacinas que têm como alvo específicas fases do ciclo de vida do biofilmes, essas abordagens carecem de validação clínica (Craft *et al.*, 2019).

Neste trabalho, a capacidade de cada isolado bacteriano produzir biofilme foi avaliada através de dois métodos distintos: ensaio em placa de microtitulação e método Vermelho do Congo agar. Os resultados obtidos estão descritos na Figura 20.

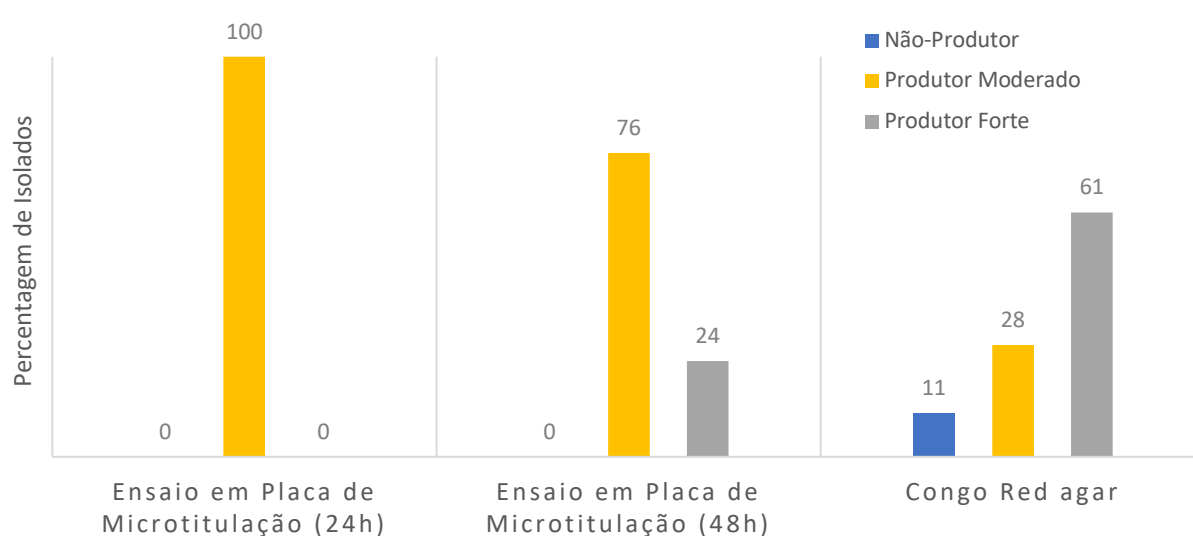


Figura 20. Resultados dos dois métodos de avaliação da capacidade de produção de biofilme dos 46 isolados.

Através do método Vermelho do Congo agar, observou-se que entre os 46 isolados de MRSA, 28 produziram colónias pretas (produtores fortes), 13 produziram colónias castanhas (produtores moderados) e 5 produziram colónias vermelhas (não-produtores). Segundo vários estudos, não existe uma correlação entre este método e outros métodos de detecção de biofilme. Um destes estudos afirmou ainda, que o ensaio em placa de microtitulação é um método quantitativo de confiança para a avaliação do processo de formação de biofilme, sendo melhor para a detecção de biofilme do que o método Vermelho do Congo agar (Samad *et al.*, 2019).

O potencial para a formação de biofilme através do ensaio em placa de microtitulação foi quantificado após dois períodos de incubação distintos: 24 e 48 horas. Os isolados apresentaram valores de absorvância a 590 nm compreendidos entre o intervalo [0,168 - 0,249], tal que todos foram considerados produtores de biofilme. No período de incubação de 24h, todos os isolados foram classificados como produtores moderados de biofilme. Rezaei *et al.* (2013) também demonstrou que todos os MRSA isolados de pacientes de um Hospital no Irão eram produtores de biofilme. Quando os isolados foram expostos a um período de incubação maior, onze passaram a apresentar valores de absorvância superiores a 0,240, ou seja, passaram a ser considerados fortes produtores de biofilme. Para além disto, através deste ensaio, foi ainda possível observar que a biomassa média de biofilme produzida durante o período de 48 horas foi superior à produzida durante apenas 24 horas (Figura 21).

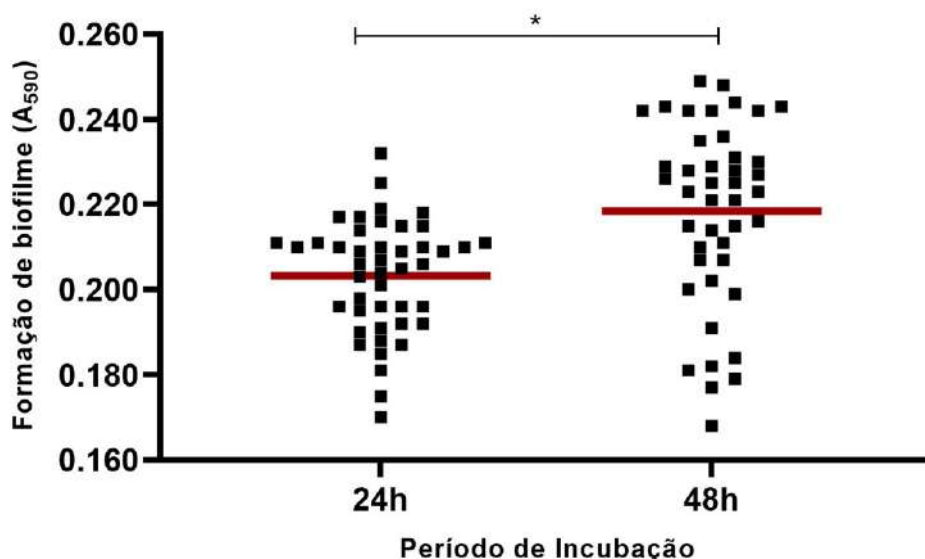


Figura 21. Comparação da capacidade de formação de biofilme dos isolados de MRSA em função do período de incubação. O símbolo ■ representa a biomassa média do biofilme formado em três ensaios independentes dos isolados individuais em cada período de incubação. As linhas — representam a biomassa média do biofilme formado por todos os isolados em cada período de incubação. A significância estatística foi determinada utilizando uma análise de variância unidirecional (one-way ANOVA) seguida pelo teste de comparação múltipla de Tukey's. As diferenças significativas são descritas com: * $P < 0,05$; ** $P < 0,005$; *** $P < 0,001$.

A estirpe isolada após o tratamento da ETAR do Hospital de S. Pedro apresentou valores de absorvância de 0,217 e 0,225 nos períodos de incubação de 24h e 48h, respetivamente. Ambos os valores estão acima da biomassa média do biofilme formado por todos os isolados em cada período de incubação. A exposição deste isolado a condições de stress adicionais, neste caso, ao tratamento, poderá ter levado ao aumento do nível de produção de biofilme. Reuter *et al.* (2010), demonstrou que sob stress ambiental relevante, a capacidade de formação de biofilme é maior. No entanto, a formação de biofilme *in vitro* não se relaciona necessariamente com a produção de biofilme *in vivo* (Bendouah *et al.*, 2006).

Não foi observada nenhuma relação entre a formação de biofilme e os três hospitais onde foram recolhidas as várias amostras. Também não foi observada nenhuma relação entre a elevada capacidade de formação de biofilme e o nível de resistência a antibióticos: os isolados que foram considerados fortes produtores de biofilme após 48 horas de incubação apresentaram resistências que variaram entre um intervalo de quatro a onze antibióticos diferentes. O mesmo foi descrito por Brahma *et al.* (2019).

Qualquer estirpe resistente com forte capacidade de produção de biofilme constitui uma séria ameaça para a população. A variabilidade na capacidade de formação de biofilme pode estar ligada às diferenças nos processos metabólicos e biossintéticos dos isolados (Brahma *et al.*, 2019). Deste modo, seria interessante explorar o mecanismo de formação de biofilme entre produtores fortes, moderados e não-produtores, de modo a compreender melhor estes fenótipos e, possivelmente, identificar fármacos capazes de atuar contra bactérias produtoras de biofilme.

Os compostos de fósforo são potenciais poluentes de águas recetoras e são incorporados através de vários tipos de águas residuais. A concentração média de fósforos totais em águas residuais municipais é 8 a 10 mg/L, sendo cerca de 40% fósforo orgânico e o restante inorgânico (Jaafari *et al.*, 2019). No trabalho de Liu *et al.*, (2016), o crescimento de biofilme é favorecido pela presença de nutrientes inorgânicos, tal como o fósforo. Assim, existência de estirpes produtoras de biofilme nos efluentes hospitalares poderá ser explicada por este fator. Uma vez mais, é reforçada a necessidade da implementação de regimes de tratamento adequados para efluentes hospitalares, tanto para evitar que este falhe durante a eliminação de espécies produtoras de biofilmes, como para que não estimule o seu nível de produção de biofilme.

Um trabalho realizado no Egipto sobre o efeito da ciprofloxacina na aderência bacteriana e na formação de biofilme, mostrou que este agente antibacteriano diminuía, em cerca de 60%, a síntese de biofilme (Cieśliński *et al.*, 2009). Deste modo, a ciprofloxacina foi considerada um agente antibacteriano eficaz no combate a bactérias produtoras de biofilme. Contudo, tal como

é demonstrado pelos nossos resultados, existe uma elevada resistência à ciprofloxacina, tornando esta uma opção não viável. Para além da ciprofloxacina, foi também testada a eficácia da tetraciclina contra infeções provocadas por biofilmes, sendo recomendado o uso destes compostos como ação preventiva (Rezaei *et al.*, 2013).

V. CONCLUSÃO

A resistência bacteriana aos antibióticos é atualmente um dos problemas de saúde pública mais significativos a nível global, dado que apresenta consequências clínicas e económicas preocupantes e está associada ao uso inadequado de antibióticos. Através da realização deste trabalho foi possível concluir que as águas residuais hospitalares representam um perigo para a saúde pública pois, para além de constituírem uma fonte relevante de MRSA, quando não tratadas ou quando tratadas de forma inadequada, facilitam a disseminação destas bactérias, acelerando o desenvolvimento de multirresistências. Dada a gravidade das complicações clínicas provenientes das infeções causadas por MRSA é de extrema importância implementar estratégias de tratamento específicas e eficazes antes da descarga de efluentes hospitalares em redes de saneamento públicas. Contudo, a gestão de águas residuais hospitalares é uma tarefa desafiante pois a maioria dos países não apresenta legislação específica.

Em adição, grande parte dos MRSA isolados neste trabalho apresenta o fenótipo iMLS_B, o que poderá levar a tratamentos inadequados e, consequentemente, a elevadas taxas de morbilidade e mortalidade. Os isolados apresentaram ainda capacidade de produção de biofilme. As bactérias com capacidade de formação de biofilmes têm vantagens em relação às bactérias que vivem livremente pois os biofilmes permitem o crescimento de bactérias de forma protegida e permitem a sobrevivência mesmo quando as condições não se mostram favoráveis. Estas bactérias são responsáveis por várias doenças e surgem em biomateriais ou dispositivos médicos, o que dificulta o tratamento e diminui a sua eficiência. Posto isto e uma vez mais, é importante reforçar a necessidade de tratamento dos efluentes hospitalares.

Assim, o problema das infeções por MRSA resulta da ocorrência de multirresistências e do aparecimento de bactérias capazes de formar biofilmes, tornando-se não só uma questão de saúde pública, mas também uma questão social e económica. Para combater esta problemática, devemos implementar uma perspetiva *One Health*, tendo em conta MRSA associados a humanos e a animais e, também, potenciais fontes de contaminação ambiental, como as ETARs.

VI. PERSPETIVAS FUTURAS

No sentido de aprofundar o conhecimento e a importância deste estudo seria importante:

- Conhecer o tratamento realizado pela ETAR do Hospital de S. Pedro;
- Caracterizar geneticamente os isolados para obter uma confirmação de maior confiança;
- Identificar as linhagens clonais;
- Investigar quais os mecanismos associados à capacidade de formação de biofilme de forma a poderem ser desenvolvidos novos fármacos/métodos capazes de combater bactérias produtoras de biofilme.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aklilu, E., e Ying, C. H. (2020) First mecC and mecA positive livestock-associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MecC MRSA/LA-MRSA) from dairy cattle in Malaysia. *Microorganisms*, **8**(2). doi:10.3390/microorganisms8020147
- Akya, A., Chegenelorestani, R., Shahvaisi-Zadeh, J., e Bozorgomid, A. (2020) Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from hospital wastewater in Kermanshah, Iran. *Risk Management and Healthcare Policy*, **13**, 1035–1042. doi:10.2147/RMHP.S261311
- Azar, A. M., Jelogir, A. G., Bidhendi, G. N., Mehrdadi, N., Zaredar, N., e Poshtegal, M. K. (2010) Investigation of optimal method for hospital wastewater treatment. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, **8**(2), 1199–1202.
- Balouiri, M., Sadiki, M., e Ibnsouda, S. K. (2016) Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, **6**(2), 71–79. doi:10.1016/j.jpha.2015.11.005
- Banin, E., Hughes, D., e Kuipers, O. P. (2017) Editorial: Bacterial pathogens, antibiotics and antibiotic resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, **41**(3), 450–452. doi:10.1093/femsre/fux016
- Becker, K., Heilmann, C., e Peters, G. (2014) Coagulase-negative staphylococci. *Clinical Microbiology Reviews*, **27**(4), 870–926. doi:10.1128/CMR.00109-13
- Begum, H. a, Uddin, M. S., Islam, M. J., Nazir, K. H. M. N. H., Islam, M. a, e Rahman, M. T. (2007) Detection of biofilm producing coagulase positive *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis, their pigment production, hemolytic activity and antibiotic sensitivity pattern. *Journal of the Bangladesh Society for Agricultural Science and Technology*, **4**, 97–100.
- Bendouah, Z., Barbeau, J., Hamad, W. A., e Desrosiers, M. (2006) Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* is associated with an unfavorable evolution after surgery for chronic sinusitis and nasal polypsis. *Otolaryngology - Head and Neck Surgery*, **134**(6), 991–996. doi:10.1016/j.otohns.2006.03.001
- Börjesson, S., Matussek, A., Melin, S., Löfgren, S., e Lindgren, P. E. (2010) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in municipal wastewater: An uncharted threat? *Journal of Applied Microbiology*, **108**(4), 1244–1251. doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04515.x
- Brahma, U., Sharma, P., Murthy, S., Sharma, S., Chakraborty, S., Appalaraju, S. N., e Bhandari, V. (2019) Decreased expression of femXAB genes and fnbp mediated biofilm pathways in OS-MRSA clinical isolates. *Scientific Reports*, **9**(1), 1–8. doi:10.1038/s41598-019-52557-z
- Casas, M. E., Chhetri, R. K., Ooi, G., Hansen, K. M. S., Litty, K., Christensson, M., Kragelund, C., Andersen, H. R., e Bester, K. (2015) Biodegradation of pharmaceuticals in hospital wastewater by staged Moving Bed Biofilm Reactors (MBBR). *Water Research*, **83**, 293–302. doi:10.1016/j.watres.2015.06.042
- Cervantes-García, E., García-González, R., e Salazar-Schettino, P. M. (2014) Características generales del *Staphylococcus aureus*. *Revista Latinoamericana de Patología Clínica*, **61**(1), 8–40. doi:10.1108/eb020168
- Chmielewski, R. A. N., e Frank, J. F. (2003) Biofilm formation and control in food processing facilities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **2**(1), 22–32. doi:10.1111/j.1541-4337.2003.tb00012.x
- Cieśliński, H., Białkowska, A., Tkaczuk, K., Długołęcka, A., Kur, J., e Turkiewicz, M. (2009) Identification and molecular modeling of a novel lipase from an antarctic soil

- metagenomic library. *Polish Journal of Microbiology*, **58**(3), 199–204.
- Craft, K. M., Nguyen, J. M., Berg, L. J., e Townsend, S. D. (2019) Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): Antibiotic-Resistance and the Biofilm Phenotype. *MedChemComm*. doi:10.1039/x0xx00000x
- Darboe, S., Dobreniecki, S., Jarju, S., Jallow, M., Mohammed, N. I., Wathuo, M., Ceesay, B., Tweed, S., Roy, R. B., Okomo, U., Kwambana-Adams, B., Antonio, M., Bradbury, R. S., De Silva, T. I., Forrest, K., Roca, A., Lawal, B. J., Nwakanma, D., e Secka, O. (2019) Prevalence of Panton-Valentine Leukocidin (PVL) and Antimicrobial Resistance in Community-Acquired Clinical *Staphylococcus aureus* in an Urban Gambian Hospital: A 11-year period retrospective pilot study. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, **9**(170), 1–7. doi:10.3389/fcimb.2019.00170
- DeLeo, F. R., Diep, B. A., e Otto, M. (2009) Host Defense and Pathogenesis in *Staphylococcus aureus* Infections. *Infectious Disease Clinics of North America*, **23**(1), 17–34. doi:10.1016/j.idc.2008.10.003
- Dos Santos, A. L., Santos, D. O., De Freitas, C. C., Ferreira, B. L. A., Afonso, I. F., Rodrigues, C. R., e Castro, H. C. (2007) *Staphylococcus aureus*: Visitando uma cepa de importância hospitalar. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, **43**(6), 413–423. doi:10.1590/S1676-24442007000600005
- dos Santos, D., Lange, C. C., Avellar-Costa, P., Netto dos Santos, K. R., Brito, M. A. V. P., e Giambiagi-deMarval, M. (2016) *Staphylococcus chromogenes*, a Coagulase-Negative *Staphylococcus* Species That Can Clot Plasma. *Journal os Clinical Microbiology*, **54**(5), 1372–1375. doi:10.1128/JCM.03139-15.Editor
- Duarte, F. C., Tavares, E. R., Danelli, T., Ribeiro, M. A. G., Yamauchi, L. M., Yamada-Ogatta, S. F., e Perugini, M. R. E. (2018) Disseminated clonal complex 5 (CC5) methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* SCCmec type ii in a tertiary hospital of southern Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, **60**, 5–9. doi:10.1590/S1678-9946201860032
- ECDC (2017) Antimicrobial consumption: Annual epidemiological report for 2017., 1–23.
- ECDC (2018) *Surveillance of antimicrobial resistance in Europe*. doi:10.1136/bmj.317.7159.614
- El Gemezy, E., Serry, F., e Kadry, A. (2016) Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* clinical isolates and prevalence of MRSA in ICUs of Mansoura University Hospitals. *Zagazig Journal of Pharmaceutical Sciences*, **25**(2), 93–97. doi:10.21608/zjps.2016.38183
- Ellington, M. J., Reuter, S., Harris, S. R., Holden, M. T. G., Cartwright, E. J., Greaves, D., Gerver, S. M., Hope, R., Brown, N. M., Török, M. E., Parkhill, J., Köser, C. U., e Peacock, S. J. (2015) Emergent and evolving antimicrobial resistance cassettes in community-associated fusidic acid and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **45**(5), 477–484. doi:10.1016/j.ijantimicag.2015.01.009
- Emmanuel, E., Perrodin, Y., Keck, G., Blanchard, J.-M., e Vermande, P. (2002) Effects of Hospital Wastewater on Aquatic Ecosystem. *XXVIII Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental Cancún, México*, (October), 7.
- Ferrasso, M. de M., Gonzalez, H. de L., e Timm, C. D. (2015) *Staphylococcus hyicus*. *Arquivos do Instituto Biológico*, **82**(0), 1–6. doi:10.1590/1808-1657000672013
- Freeman, D. J., Falkiner, F. R., e Keane, C. T. (1989) New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *Journal of Clinical Pathology*, **42**(8), 872–874. doi:10.1136/jcp.42.8.872
- Gerceker, D., Karasartova, D., Elyürek, E., e Barkar, S. (2009) Full Paper A new , simple , rapid test for detection of DNase activity of microorganisms : DNase Tube test., **294**, 291–

- 294.
- Gherardi, G., Di Bonaventura, G., e Savini, V. (2018) Staphylococcal Taxonomy. *Pet-to-Man Travelling Staphylococci: A World in Progress* (p. 1–10). Elsevier Inc. doi:10.1016/B978-0-12-813547-1.00001-7
- Giedraitiene, A., Vitkauskienė, A., Naginiene, R., e Pavilonis, A. (2011) Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria. *Medicina*, **47**(3), 137–146. doi:10.3390/medicina47030019
- Goldstein, R. E. R., Micallef, S. A., Gibbs, S. G., Davis, J. A., He, X., George, A., Kleinfelter, L. M., Schreiber, N. A., Mukherjee, S., Sapkota, A., Joseph, S. W., e Sapkota, A. R. (2012) Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Detected at Four U.S. Wastewater Treatment Plants. *Environmental Health Perspectives*, **120**(11), 1551–1558.
- Gómez, P., Lozano, C., Benito, D., Estepa, V., Tenorio, C., Zarazaga, M., e Torres, C. (2016) Characterization of staphylococci in urban wastewater treatment plants in Spain, with detection of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* ST398. *Environmental Pollution*, **212**, 71–76. doi:10.1016/j.envpol.2016.01.038
- Grenni, P., Ancona, V., e Barra Caracciolo, A. (2018) Ecological effects of antibiotics on natural ecosystems: A review. *Microchemical Journal*, **136**, 25–39. doi:10.1016/j.microc.2017.02.006
- Guardabassi, L., e Dalsgaard, A. (2002) Occurrence and fate of antibiotic resistant bacteria in sewage., (722).
- Guimarães, D. O., Da Silva Momesso, L., e Pupo, M. T. (2010) Antibióticos: Importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. *Química Nova*, **33**(3), 667–679. doi:10.1590/S0100-40422010000300035
- Hatt, J. K., e Rather, P. N. (2008) Role of bacterial biofilms in urinary tract infections. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, **322**, 163–192. doi:10.1007/978-3-540-75418-3_8
- Hiko, A. (2019) Isolation, DNase-cross-Coagulase test and antimicrobial resistance test on *Staphylococcus* along beef abattoir line in Addis Ababa Ethiopia. *Ethiopian Veterinary Journal*, **23**(1), 90. doi:10.4314/evj.v23i1.7
- Hiramatsu, K. (2001) Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: a new model of antibiotic resistance. *Lancet Infectious Diseases*, **1**, 147–155.
- Hocquet, D., Muller, A., e Bertrand, X. (2016) What happens in hospitals does not stay in hospitals: antibiotic-resistant bacteria in hospital wastewater systems. *Journal of Hospital Infection*, **93**(4), 395–402. doi:10.1016/j.jhin.2016.01.010
- Huq, A., Whitehouse, C. A., Grim, C. J., Alam, M., e Colwell, R. R. (2008) Biofilms in water, its role and impact in human disease transmission. *Current Opinion in Biotechnology*, **19**(3), 244–247. doi:10.1016/j.copbio.2008.04.005
- Jaafari, J., Javid, A. B., Barzanouni, H., Younesi, A., Farahani, N. A. A., Mosazadeh, M., e Soleimani, P. (2019) Performance of modified one-stage phoredox reactor with hydraulic up-flow in biological removal of phosphorus from municipal wastewater. *Desalination and Water Treatment*, **171**, 216–222. doi:10.5004/dwt.2019.24752
- Jayaweera, J. A. A. S., e Kumbukgolla, W. W. (2017) Antibiotic resistance patterns of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from livestock and associated farmers in Anuradhapura, Sri Lanka. *Germs*, **7**(3), 132–139. doi:10.18683/germs.2017.1118
- Karakonstantis, S., e Kalemaki, D. (2019) Antimicrobial overuse and misuse in the community in Greece and link to antimicrobial resistance using methicillin-resistant *S. aureus* as an example. *Journal of Infection and Public Health*, **12**(4), 460–464. doi:10.1016/j.jiph.2019.03.017

- Kelly, T. R., Karesh, W. B., Johnson, C. K., Gilardi, K. V. K., Anthony, S. J., Goldstein, T., Olson, S. H., Machalaba, C., e Mazet, J. A. K. (2017) One Health proof of concept: Bringing a transdisciplinary approach to surveillance for zoonotic viruses at the human-wild animal interface. *Preventive Veterinary Medicine*, **137**, 112–118. doi:10.1016/j.prevetmed.2016.11.023
- Khan, A. H., Khan, N. A., Ahmed, S., Dhingra, A., Singh, C. P., Khan, S. U., Mohammadi, A. A., Changani, F., Yousefi, M., Alam, S., Vambol, S., Vambol, V., Khursheed, A., e Ali, I. (2020) Application of advanced oxidation processes followed by different treatment technologies for hospital wastewater treatment. *Journal of Cleaner Production*, **269**. doi:10.1016/j.jclepro.2020.122411
- Khodabandeh, M., Mohammadi, M., Abdolsalehi, M. R., Alvandimanesh, A., Gholami, M., Bibalan, M. H., Pournajaf, A., Kafshgari, R., e Rajabnia, R. (2019) Analysis of Resistance to Macrolide–Lincosamide–Streptogramin B Among *mecA*-Positive *Staphylococcus aureus* Isolates. *Osong Public Health and Research Perspectives*, **10**(1), 25–31. Obtido de <https://ophrp.org/upload/pdf/ophrp-10-025.pdf>
- Kong, C., Neoh, H. M., e Nathan, S. (2016) Targeting *Staphylococcus aureus* toxins: A potential form of anti-virulence therapy. *Toxins*, **8**(3), 1–21. doi:10.3390/toxins8030072
- Kong, E. F., Johnson, J. K., e Jabra-Rizk, M. A. (2016) Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: An Enemy amidst Us. *PLOS Pathogens*, **12**(10), 1–7. doi:10.1371/journal.ppat.1005837
- Kong, R., Kang, O.-H., Seo, Y.-S., Mun, S.-H., Zhou, T., Shin, D.-W., e Kwon, D.-Y. (2016) The inhibition effect of Chlorpromazine against the β -lactam resistance of MRSA. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, **9**(6), 542–546. doi:10.1016/j.apjtm.2016.04.008
- Kumar, R., Koul, S., Kumar, P., e Kalia, V. C. (2016) Searching Biomarkers in the Sequenced Genomes of *Staphylococcus* for their Rapid Identification. *Indian Journal of Microbiology*, **56**(1), 64–71. doi:10.1007/s12088-016-0565-9
- Ladhani, S. (2001) Recent developments in staphylococcal scalded skin syndrome. *Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, **7**(6), 301–307. doi:10.1046/j.1198-743X.2001.00258.x
- Lambert, P. A. (2005) Bacterial resistance to antibiotics: Modified target sites. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **57**, 1471–1485. doi:10.1016/j.addr.2005.04.003
- Layer, F., Ghebremedhin, B., Moder, K. A., König, W., e König, B. (2006) Comparative study using various methods for identification of *Staphylococcus* species in clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, **44**(8), 2824–2830. doi:10.1128/JCM.00226-06
- Lépesová, K., Kraková, L., Pangallo, D., Medved'ová, A., Olejníková, P., Mackuľak, T., Tichý, J., Grabic, R., e Birošová, L. (2018) Prevalence of antibiotic-resistant coliform bacteria, *Enterococcus* spp. and *Staphylococcus* spp. in wastewater sewerage biofilm. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, **14**, 145–151. doi:10.1016/j.jgar.2018.03.008
- Liu, S., Gunawan, C., Barraud, N., Rice, S. A., Harry, E. J., e Amal, R. (2016) Understanding, monitoring, and controlling biofilm growth in drinking water distribution systems. *Environmental Science and Technology*, **50**(17), 8954–8976. doi:10.1021/acs.est.6b00835
- Lobritz, M. A., Belenky, P., Porter, C. B. M., Gutierrez, A., Yang, J. H., Schwarz, E. G., Dwyer, D. J., Khalil, A. S., e Collins, J. J. (2015) Antibiotic efficacy is linked to bacterial cellular respiration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **112**(27), 8173–8180. doi:10.1073/pnas.1509743112
- Loir, Y. Le, Baron, F., e Gautier, M. (2003) *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genetics and Molecular Research*, **2**(1), 7–28. doi:10.1007/978-3-540-29676-8
- Loncaric, I., Kübber-Heiss, A., Posautz, A., Stalder, G. L., Hoffmann, D., Rosengarten, R., e Walzer, C. (2013) Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus* spp. carrying

- the mecC gene, isolated from wildlife. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **68**(10), 2222–2225. doi:10.1093/jac/dkt186
- Martins da Costa, P., Vaz-Pires, P., e Bernardo, F. (2006) Antimicrobial resistance in *Enterococcus* spp. isolated in inflow, effluent and sludge from municipal sewage water treatment plants. *Water Research*, **40**(8), 1735–1740. doi:10.1016/j.watres.2006.02.025
- Matuschek, E., Brown, D. F. J., e Kahlmeter, G. (2014) Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories. *Clinical Microbiology and Infection*, **20**(4), O255–O266. doi:10.1111/1469-0691.12373
- Mehdi, G., Masome, R., Masoud, D., Mirmohammad, M., Ali, H., Anahita, A., Mohammad, J. N., e Maryam, F. (2019) Distribution of SCCmec types, tetracycline and aminoglycoside resistance genes in hospital-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains.
- Melander, R. J., Zurawski, D. V., e Melander, C. (2018) Narrow-spectrum antibacterial agents. *MedChemComm*, **9**(1), 12–21. doi:10.1039/c7md00528h
- Mišić, M., Čukić, J., Vidanović, D., Šekler, M., Matić, S., Vukašinović, M., e Baskić, D. (2017) Prevalence of Genotypes That Determine Resistance of Staphylococci to Macrolides and Lincosamides in Serbia. *Frontiers in Public Health*, **5**(August), 1–8. doi:10.3389/fpubh.2017.00200
- Monteiro, M., Read, A., Carneiro, F., Soares, M. J., e Alves, V. (2016) Carta ao editor relativa a avaliação da resistência à mupirocina em estirpes de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina. *Acta Medica Portuguesa*, **29**(9), 578. doi:10.20344/amp.7425
- Moormeier, D. E., e Bayles, K. W. (2017) *Staphylococcus aureus* biofilm: a complex developmental organism. *Molecular Microbiology*, **104**(3), 365–376. doi:10.1111/mmi.13634
- Nakada, N., Shinohara, H., Murata, A., Kiri, K., Managaki, S., Sato, N., e Takada, H. (2007) Removal of selected pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) and endocrine-disrupting chemicals (EDCs) during sand filtration and ozonation at a municipal sewage treatment plant. *Water Research*, **41**(19), 4373–4382. doi:10.1016/j.watres.2007.06.038
- Nizamuddin, S., Irfan, S., e Zafar, A. (2011) Evaluation of prevalence of low and high level mupirocin resistance in methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolates at a tertiary care hospital. *Journal of the Pakistan Medical Association*, **61**(6), 519–521.
- Núñez, L., e Moretton, J. (2007) Disinfectant-resistant bacteria in Buenos Aires city hospital wastewater. *Brazilian Journal of Microbiology*, **38**(4), 644–648. doi:10.1590/S1517-83822007000400012
- O'Toole, G. A. (2010) Microtiter dish Biofilm formation assay. *Journal of Visualized Experiments*, (47), 10–11. doi:10.3791/2437
- Okwu, M. U., Olley, M., Akpoka, A. O., e Izevbuwa, O. E. (2019) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and anti-MRSA activities of extracts of some medicinal plants: A brief review. *AIMS Microbiology*, **5**(2), 117–137. doi:10.3934/microbiol.2019.2.117
- Otto, M. (2014) *Staphylococcus aureus* toxins. *Curr. Opin. Microbiol.*, **17**, 32–37. doi:10.1016/j.mib.2013.11.004.Staphylococcus
- Park, J. H., Kang, J. H., Hyun, J. E., e Hwang, C. Y. (2018) Low prevalence of mupirocin resistance in *Staphylococcus pseudintermedius* isolates from canine pyoderma in Korea. *Veterinary Dermatology*, **29**(2), 95–e37. doi:10.1111/vde.12518
- Paulus, G. K., Hornstra, L. M., Alygizakis, N., Slobodnik, J., Thomaidis, N., e Medema, G. (2019) The impact of on-site hospital wastewater treatment on the downstream communal wastewater system in terms of antibiotics and antibiotic resistance genes. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, **222**(4), 635–644.

- doi:10.1016/j.ijheh.2019.01.004
- Pauwels, B., e Verstraete, W. (2006) The treatment of hospital wastewater : an appraisal. *Journal of Water and Health*, **4**(4), 405–416. doi:10.2166/wh.2006.025
- Pena, A., Paulo, M., Silva, L. J. G., Seifrtová, M., Lino, C. M., e Solich, P. (2010) Tetracycline antibiotics in hospital and municipal wastewaters: A pilot study in Portugal. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **396**(8), 2929–2936. doi:10.1007/s00216-010-3581-3
- Pinho, M. G., De Lencastre, H., e Tomasz, A. (2001) An acquired and a native penicillin-binding protein cooperate in building the cell wall of drug-resistant staphylococci. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **98**(19), 10886–10891. doi:10.1073/pnas.191260798
- Prabhu, K., Rao, S., e Rao, V. (2010) Inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from clinical samples. *Journal of Laboratory Physicians*, **3**(1), 25–27. doi:10.4103/0974-2727.78558
- Raafat, D., Otto, M., Reppschläger, K., Iqbal, J., e Holtfreter, S. (2019) Fighting *Staphylococcus aureus* Biofilms with Monoclonal Antibodies. *Trends in Microbiology*, **27**(4), 303–322. doi:10.1016/j.tim.2018.12.009
- Rahimi, F., Katouli, M., e Karimi, S. (2016) Biofilm production among methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from catheterized patients with urinary tract infection. *Microbial Pathogenesis*, **98**, 69–76. doi:10.1016/j.micpath.2016.06.031
- Ramessar, K., e Olaniran, A. O. (2019) Antibioqram and molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* recovered from treated wastewater effluent and receiving surface water in Durban, South Africa. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **35**(9), 1–11. doi:10.1007/s11274-019-2715-9
- Reuter, M., Mallett, A., Pearson, B. M., e Van Vliet, A. H. M. (2010) Biofilm formation by *Campylobacter jejuni* is increased under aerobic conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, **76**(7), 2122–2128. doi:10.1128/AEM.01878-09
- Rezaei, M., Moniri, R., Mousavi, S. G. A., e Shiade, M. J. (2013) Prevalence of biofilm formation among methicillin resistance *Staphylococcus aureus* isolated from nasal carriers. *Jundishapur Journal of Microbiology*, **6**(6). doi:10.5812/jjm.9601
- Roberts, A. P., e Kreth, J. (2014) The impact of horizontal gene transfer on the adaptive ability of the human oral microbiome. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, **4**(September), 1–9. doi:10.3389/fcimb.2014.00124
- Rodriguez-Mozaz, S., Chamorro, S., Marti, E., Huerta, B., Gros, M., Sànchez-Melsió, A., Borrego, C. M., Barceló, D., e Balcázar, J. L. (2015) Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in hospital and urban wastewaters and their impact on the receiving river. *Water Research*, **69**, 234–242. doi:10.1016/J.WATRES.2014.11.021
- Samad, A., Khan, A. A., Sajid, M., e Zahra, R. (2019) Assessment of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* and hydrodynamic evaluation of microtiter plate assay. *Journal of the Pakistan Medical Association*, **69**(5), 666–671.
- Santos, L. H. M. L. M., Gros, M., Rodriguez-Mozaz, S., Delerue-Matos, C., Pena, A., Barceló, D., e Montenegro, M. C. B. S. M. (2013) Contribution of hospital effluents to the load of pharmaceuticals in urban wastewaters: Identification of ecologically relevant pharmaceuticals. *Science of the Total Environment*, **461–462**, 302–316. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.04.077
- Santos, M. H. L., Pedras, M., Diegues, P., Noronha, V. S., Augusti, V., e Sanches, N. (2005) Recomendações Genéricas para a Gestão das Águas Residuais Hospitalares IN MINISTÉRIO DA SAÚDE (Ed.). *Cadernos da DGIES*, **5**.
- Sasirekha, B., Usha, M. S., Amruta, J. A., Ankit, S., Brinda, N., e Divya, R. (2014) Incidence of constitutive and inducible clindamycin resistance among hospital-associated

- Staphylococcus aureus*. *3 Biotech*, **4**(1), 85–89. doi:10.1007/s13205-013-0133-5
- Schmidt, T., Kock, M. M., e Ehlers, M. M. (2015) Antimicrobial Resistance in Staphylococci at the Human– Animal Interface. *Intech*, 85–129. doi:http://dx.doi.org/10.5772/57353
- Schwarz, S., Shen, J., Kadlec, K., Wang, Y., Michael, G. B., Feßler, A. T., e Vester, B. (2016) Lincosamides, streptogramins, phenicols, and pleuromutilins: Mode of action and mechanisms of resistance. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, **6**(11), 1–30. doi:10.1101/cshperspect.a027037
- Sedaghat, H., Nasr Esfahani, B., Mobasherizadeh, S., Jazi, A. S., Halaji, M., Sadeghi, P., Emaneini, M., e Havaei, S. A. (2017) Phenotypic and genotypic characterization of macrolide resistance among *Staphylococcus aureus* isolates in Isfahan, Iran. *Iranian Journal of Microbiology*, **9**(5), 264–270.
- Shah, M. S., Qureshi, S., Kashoo, Z., Farooq, S., Wani, S. A., Hussain, M. I., Banday, M. S., Khan, A. A., Gull, B., Habib, A., Khan, S. M., e Dar, B. A. (2019) Methicillin resistance genes and in vitro biofilm formation among *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in India. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, **64**, 117–124. doi:https://doi.org/10.1016/j.cimid.2019.02.009
- Shi, S. F., Jia, J. F., Guo, X. K., Zhao, Y. P., Chen, D. S., Guo, Y. Y., e Zhang, X. L. (2016) Reduced *Staphylococcus aureus* biofilm formation in the presence of chitosan-coated iron oxide nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, **11**, 6499–6506. doi:10.2147/IJN.S41371
- Shivappa, S. G., Morubagal, R. R., Mahale, R. P., e Gowda, R. S. (2018) Prevalence and antibiogram of methicillin sensitive and methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from pus samples in a tertiary care teaching hospital. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, **12**(4), 2297–2303. doi:10.22207/JPAM.12.4.71
- Silva, A. C. O., Silva, R. C. G., e Oliveira, S. R. (2016) Clindamycin microbial resistance in clinical isolates of *Staphylococcus* sp. Derived from blood cultures of hospitalized patients. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, **52**(3), 165–170. doi:10.5935/1676-2444.20160024
- Silva, V., Almeida, F., Carvalho, J. A., Castro, A. P., Ferreira, E., Manageiro, V., Tejedor-Junco, M. T., Caniça, M., Igrejas, G., e Poeta, P. (2020) Emergence of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* EMRSA-15 clone as the predominant cause of diabetic foot ulcer infections in Portugal. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, **39**(1), 179–186. doi:10.1007/s10096-019-03709-6
- Simões, C., Rosmaninho, I., e Henriques, A. G. (2008) Guia para a Avaliação de Impacte Ambiental de Estações de Tratamento de Águas Residuais., 92.
- Sonune, A., e Ghatge, R. (2004) Developments in wastewater treatment methods. *Desalination*, **167**, 55–63. doi:10.1016/j.desal.2004.06.113
- Sousa, M., Silva, N., Manageiro, V., Ramos, S., Coelho, A., Gonçalves, D., Caniça, M., Torres, C., Igrejas, G., e Poeta, P. (2017) First report on MRSA CC398 recovered from wild boars in the north of Portugal. Are we facing a problem? *Science of the Total Environment*, **596–597**, 26–31. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.04.054
- Spellman, F. R. (2003) *Handbook of water and Wastewater Treatment Plant Operations*. CRC press. doi:10.1124/mi.7.4.9
- Stefani, S., Chung, D. R., Lindsay, J. A., Friedrich, A. W., Kearns, A. M., Westh, H., e MacKenzie, F. M. (2012) Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): Global epidemiology and harmonisation of typing methods. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **39**(4), 273–282. doi:10.1016/j.ijantimicag.2011.09.030
- Syal, K., Mo, M., Yu, H., Iriya, R., Jing, W., Guodong, S., Wang, S., Grys, T. E., Haydel, S.

- E., e Tao, N. (2017) Current and emerging techniques for antibiotic susceptibility tests. *Theranostics*, **7**(7), 1795–1805. doi:10.7150/thno.19217
- Thompson, K.-A., Copley, V. R., Parks, S., Walker, J. T., e Bennett, A. M. (2014) *Staphylococcus aureus* dispersal from healthy volunteers. *American Journal of Infection Control*, **42**(3), 260–264. doi:10.1016/j.ajic.2013.09.029
- Toka Özer, T. (2016) The Rate of Inducible MLSB Resistance in the Methicillin-Resistant Staphylococci Isolated From Clinical Samples. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, **30**(5), 490–493. doi:10.1002/jcla.21884
- Tortora, G. J., Funke, B. R., e Case, C. L. (2012) *Microbiologia: introdução*. (10ª Edição). Pearson Education, Inc., Brasil.
- Tsiodras, S., Gold, H. S., Sakoulas, G., Eliopoulos, G. M., Wennersten, C., Venkataraman, L., Moellering, R. C., e Ferraro, M. J. (2001) Linezolid resistance in a clinical isolate of *Staphylococcus aureus*. *Lancet*, **358**(9277), 207–208. doi:10.1016/S0140-6736(01)05410-1
- Udo, E. E., e Boswihi, S. S. (2017) Antibiotic Resistance Trends in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolated in Kuwait Hospitals: 2011-2015. *Medical Principles and Practice*, **26**(5), 485–490. doi:10.1159/000481944
- Valle, J., Echeverz, M., e Lasa, I. (2019) σ B Inhibits Poly-N-Acetylglucosamine Exopolysaccharide Synthesis and Biofilm Formation in *Staphylococcus aureus* Jaione. *Journal of Bacteriology*, **201**(11), 1–14.
- Vázquez, N. M., Fiorilli, G., Cáceres Guido, P. A., e Moreno, S. (2016) Carnosic acid acts synergistically with gentamicin in killing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *Phytomedicine*, **23**(12), 1337–1343. doi:10.1016/j.phymed.2016.07.010
- Wang, Q., Wang, P., e Yang, Q. (2018) Occurrence and diversity of antibiotic resistance in untreated hospital wastewater. *Science of The Total Environment*, **621**, 990–999. doi:https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.128

VIII. ANEXOS

1. Meios de Cultura

1.1. BHI líquido

Composição:

- BHI – 17,5g
- Peptona – 10g
- Glucose – 2g
- Cloreto de sódio 5g
- Fosfato dissódico – 2,5g

1.2. BHI agar

Composição:

- BHI – 17,5g
- Peptona – 10g
- Glucose – 2g
- Cloreto de sódio – 5g
- Fosfato dissódico – 2,5g
- Agar – 15g

1.3. ORSAB

Composição:

- Peptona – 11,8g
- Extrato de levedura – 9g
- Manitol – 10g
- Cloreto de sódio – 55g
- Cloreto de lítio – 5g
- Azul anilina – 0,2g
- Agar – 12,5g

1.4. DNase agar

Composição:

- Triptose – 20 g
- Ácido desoxirribonucleico – 2g
- Cloreto de sódio – 5g
- Agar – 12g

1.5. MH agar

Composição:

- Extrato de carne bovina – 2g
- Hidrolisado ácido de caseína – 17,5g
- Amido – 1,5g
- Agar – 17g

1.6. LB líquido

Composição:

- Peptona – 10g
- Extrato de levedura – 5g
- Cloreto de sódio – 10g

1.7. Vermelho do Congo agar

Composição:

- BHI - 37 g
- Sacarose - 50 g
- Indicador vermelho de congo - 8 g
- Agar - 10 g