

UFRRJ
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

DISSERTAÇÃO

**PESQUISA DE *Escherichia coli* PRODUTORAS DE
BETALACTAMASES EM ÁGUAS CIRCULANTES DE
ABATEDOURO AVIÁRIO NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO,
BRASIL**

Thereza Cristina da Costa Patricio

2023



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**PESQUISA DE *Escherichia coli* PRODUTORAS DE
BETALACTAMASES EM ÁGUAS CIRCULANTES DE
ABATEDOURO AVIÁRIO NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO,
BRASIL**

THEREZA CRISTINA DA COSTA PATRICIO

Sob Orientação da Professora

Shana de Mattos de Oliveira Coelho

e Coorientação da Professora

Irene da Silva Coelho

Dissertação submetida como requisito
parcial para obtenção do grau de **Mestre
em Ciências**, no Programa de Pós-
Graduação em Ciências Veterinárias.

Seropédica

Setembro de 2023

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

P314p Patricio, Thereza Cristina da Costa , 1997-
 PESQUISA DE Escherichia coli PRODUTORAS DE
BETALACTAMASES EM ÁGUAS CIRCULANTES DE ABATEDOURO
AVIÁRIO NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO, BRASIL /
Thereza Cristina da Costa Patricio. - Seropédica,
2023.
 56 f.: il.

 Orientadora: Shana de Mattos de Oliveira Coelho.
 Coorientadora: Irene da Silva Coelho.
 Dissertação(Mestrado). -- Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em
Ciências Veterinárias, 2023.

 1. Microbiologia. I. Coelho, Shana de Mattos de
Oliveira, 1980-, orient. II. Coelho, Irene da Silva,
1979-, coorient. III Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro. Programa de Pós-Graduação em Ciências
Veterinárias. IV. Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS



ATA N° 4123/2023 - PPGCV (12.28.01.00.00.00.50)

N° do Protocolo: 23083.065946/2023-49

Seropédica-RJ, 29 de setembro de 2023.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

THEREZA CRISTINA DA COSTA PATRICIO

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre(a) em Ciências**, no Programa de Pós- Graduação em Ciências Veterinárias.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 29/09/2023

(Assinado digitalmente em 29/09/2023 12:52)
SHANA DE MATTOS DE OLIVEIRA COELHO
COORDENADOR
CORIN (12.28.01.49)
Matrícula: ###224#6

(Assinado digitalmente em 29/09/2023 14:27)
HELENA MARIA NETO FERREIRA DE SOUSA
ASSINANTE EXTERNO
Passaporte: ###947#5

(Assinado digitalmente em 29/09/2023 13:01)
KAYO CESAR BIANCO FERNANDES
ASSINANTE EXTERNO
CPF: ###.###.467-##

Visualize o documento original em <https://sipac.ufrrj.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: **4123**, ano: **2023**, tipo: **ATA**, data de emissão: **29/09/2023** e o código de verificação: **0c119b5ea9**

**"Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível, em
breve estarás fazendo o impossível."**

São Francisco de Assis

AGRADECIMENTOS

À Deus, primeiramente, pois acredito que se não tivesse construído uma maturidade espiritual nos últimos anos tudo teria sido mais difícil de ser suportado. Foram os pequenos minutos de oração que me trouxeram a paz e resiliência de chegar até aqui.

Ao Diego, que é mais do que meu noivo e melhor amigo... se tornou também figura essencial na construção desse trabalho. Me levava e buscava a noite do laboratório ou me acompanhava nos finais de semana assustadores do PSA. Foi meu suporte estrutural, emocional e psicológico nessa caminhada e digamos que o bichinho sofreu viu? Mas felizmente segue aqui, ao meu lado, me apoiando! E que seja sempre assim.

À minha psicóloga, por toda ajuda para passar por tantas coisas e ainda sair com sanidade. Obrigada por me ensinar sobre maturidade emocional e sobre a mulher e profissional que quero ser, além dessa relação e conexão incrível.

À minha mãe e minha vó, mulheres que dentro de suas realidades fizeram diversos sacrifícios para que eu me tornasse a mulher que sou hoje e chegasse onde estou.

À minha orientadora Shana, por todos esses anos trabalhando juntas, por todo ensinamento e inspiração como mulher, mãe, professora e pesquisadora.

À minha coorientadora Irene, por todas as vezes que cheguei no laboratório desanimada e fui energizada com sua alegria e vontade de fazer pesquisa. Obrigada por ser presença, abraço, colo e escuta, nos dias bons e ruins.

À minha grande amiga Juliana, por ter sido o “trem” mais doido da minha vida. Obrigada por ter sido a melhor coisa do meu mestrado, por toda a parceria, principalmente nos perrengues. Nossos cafés na porta do PSA regados de reflexões terríveis sobre o futuro foram essenciais nessa caminhada, será minha maior saudade sempre.

À minha amiga Hosana, que nesses anos oscilou entre o papel de irmã mais velha e irmã mais nova. Obrigada pelos abraços, o consolo nos meus surtos e por ter assumido a função da chata do laboratório quando não aguentei mais.

A todos do LABAC, LABGEN e LABACVET, por toda a troca de aprendizado, pelos cafés com fofoca e também pelos dias de estresse. Todos que passaram pelos três laboratórios fazem parte de quem sou hoje, afetando pontos positivos e negativos, moldando a profissional que sou e a que quero ser. Tudo que me tornei está diretamente relacionado ao que vivi nos últimos 6 anos fazendo pesquisa e serei eternamente grata por ter conhecido e compartilhado bancada com tanta gente incrível e sim, encerro meu mestrado ciente de como sou privilegiada por isso.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, por ter sido minha casa nesses últimos 8 anos. Tenho certeza que a Thereza que quase caiu no Gustavão no dia da matrícula jamais imaginaria onde estaria hoje e muito menos a personalidade e maturidade que tem. Grata por tudo e por tanto.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES)-Código de Financiamento 001, agradeço o financiamento desta pesquisa.

RESUMO

PATRICIO, Thereza Cristina da Costa Patricio. **Pesquisa de *Escherichia coli* produtoras de beta-lactamases em águas circulantes de abatedouro aviário no estado do Rio de Janeiro, Brasil.** 41p. Dissertação (Mestre em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Microbiologia e Imunologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2023.

O Brasil é o maior exportador e produtor de carne de frango no mundo. Essas aves possuem naturalmente a presença de bactérias como *Escherichia coli* no trato gastrointestinal que podem causar adoecimento ou até morte desses animais. Visando evitar isto, antimicrobianos têm sido adicionados na água e ração como medida profilática e atuando como melhorador de desempenho. Porém, isso pode favorecer a seleção de bactérias resistentes aos antimicrobianos existentes. Dentre os mecanismos de resistência em bactérias Gram-negativas, o mais importante é a produção de enzimas beta-lactamases, destacando-se as do tipo de espectro ampliado (ESBL) e AmpC. Sabendo-se que durante esse processo de produção de carne aviária há o consumo em torno de 5.000 a 21.000 L de água por tonelada de carne, gerando grande quantidade de efluentes ao longo da cadeia de abate, entende-se que a água é mais uma via de disseminação das bactérias multirresistentes presentes neste ambiente, potencializando a transmissão entre os animais, o meio ambiente e seres humanos. Dessa forma, o presente estudo buscou avaliar qualidade de águas circulantes de um abatedouro aviário e, traçar um perfil de resistência e detectar de forma fenotípica a presença de isolados de *Escherichia coli* produtoras de ESBL e AmpC através de amostras de água. As amostras foram coletadas no município de São José do Vale do Rio Preto, na região Serrana do Estado do Rio de Janeiro, onde deságua o rio Preto, em diferentes pontos de passagem de água do abatedouro de frangos, totalizando 16 amostras. Para determinar o número de coliformes totais e coliformes termotolerantes utilizou-se a técnica do Número Mais Provável (NMP). A água da entrada do abatedouro estava dentro do padrão exigido pela legislação, enquanto os efluentes tratados estavam ejetando uma carga que excede o limite máximo de qualidade. Foram isoladas e identificadas por MALDI-TOF MS, 76 *Escherichia coli*. Ampicilina foi o antibiótico menos eficaz e Meropenem o mais. Além disso, 61,8% (47/76) apresentaram resistência a pelo menos um antibiótico, sendo dentre estas 6,38% (3/47) consideradas multirresistentes (MDR). Em relação aos diferentes pontos de coleta, observa-se que a entrada apresenta menor diversidade de resistência a antibióticos quando comparado ao que sai. Entre os isolados analisados, 19,7% (15/76) indicou possível produção de ESBL e 6,6% (5/76) de AmpC no Teste de Disco Difusão. No Teste de Sensibilidade de Duplo Disco (TSDD), 10,5% (8/76) foram positivos 11,8% (9/76) para o Teste de Aproximação com CAZ/CZC e 15,8% (12/76) com CTX/CTC e 3 cepas foram positivas para produção das enzimas nos testes confirmatórios. Dentre os 76 isolados, 21% (16/76) positivaram para o gene *bla*_{CTX-M-1}, e 17,1% (13/76) para o gene *bla*_{CMY-2-like}, onde 6,5% (5/76) apresentaram co-produção do gene. Ao se comparar esses dados com o fenotípico, percebe-se que 68,7% (11/16) possuíam o gene *bla*_{CTX-M-1} mas não apresentaram fenótipo de ESBL e 84,6% (11/13) apresentaram o gene *bla*_{CMY-2-like} sem apresentar resistência a cefoxitina. O presente trabalho possibilita entender o impacto desses estabelecimentos de produção como contribuintes para o fenômeno da resistência à antimicrobianos através da água em uma perspectiva de Saúde Única.

PALAVRAS-CHAVE: Águas Circulantes, NMP, *Escherichia coli*, Resistência Bacteriana, Saúde única.

ABSTRACT

PATRICIO, Thereza Cristina da Costa Patrício. **Research on *Escherichia coli* producing beta-lactamase from poultry slaughterhouse circulating water at the stadium in Rio de Janeiro, Brazil.** 41p. Dissertation (Master in Veterinary Sciences). Institute of Veterinary Medicine, Department of Microbiology and Immunology, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2023.

Brazil is the largest exporter and producer of chicken meat in the world. These birds naturally have the presence of bacteria such as *Escherichia coli* in the gastrointestinal tract that can cause illness or even death of these animals. In order to avoid this, antimicrobials have been added to water and feed as a prophylactic measure and acting as a performance enhancer. However, this may favor the selection of bacteria resistant to existing antimicrobials. Among the mechanisms of resistance in Gram-negative bacteria, the most important is the production of enzymes β -lactamases, especially those of the extended spectrum (ESBL) and AmpC. Knowing that during this process of poultry meat production there is consumption around 5,000 to 21,000 L of water per ton of meat, generating a large amount of effluents along the slaughter chain, it is understood that water becomes another way of spreading the multidrug-resistant bacteria present in this environment, enhancing transmission between animals, the environment and humans. Thus, the present study aimed to evaluate the quality of circulating water of an avian slaughterhouse and to draw a resistance profile and to detect the presence of isolates of *Escherichia coli* producing ESBL and AmpC through water samples. The samples were collected in the municipality of São José do Vale do Rio Preto, in the mountainous region of the State of Rio de Janeiro, where the Rio Preto drains the river, at different points of water passage from the poultry slaughterhouse, totaling 16 samples. The Most Probable Number (MPN) technique was used to determine the number of total coliforms and thermotolerant coliforms. The water from the entrance of the slaughterhouse was within the standard required by the legislation, while the treated effluents were ejecting a load that exceeds the maximum quality limit. They were isolated and identified by MALDI-TOF, 76 *Escherichia coli*. Ampicillin was the least effective antibiotic and Meropenem the most. In addition, 61.8% (47/76) presented resistance to at least one antibiotic, being among these 6.38% (3/47) considered multiresistant (MDR). In relation to the different collection points, it is observed that the entrance has a lower diversity of antibiotic resistance when compared to the exit. Among the isolates analyzed, 19.7% (15/76) indicated possible production of ESBL and 6.6% (5/76) of AmpC in the Diffusion Disc Test. In the Double Disc Sensitivity Test (DDST), 10.5% (8/76) were positive 11.8% (9/76) for the Approximation Test with CAZ/CZC and 15.8% (12/76) with CTX/CTC. Only 3 were positive in the three confirmatory tests. Among the 76 isolates, 21% (16/76) were positive for the *bla*_{CTX-M-1} gene, and 17.1% (13/76) for the *bla*_{CMY-2-like} gene, where 6.5% (5/76) presented co-production of the gene. When comparing these data with the phenotypic, 68.7% (11/16) had the *bla*_{CTX-M-1} gene but did not show ESBL phenotype and 84.6% (11/13) had the *bla*_{CMY-2-like} gene without resistance to cefotaxime. Thus, this study makes it possible to understand the impact of these production facilities as contributors to the phenomenon of bacterial resistance bacteria through water in a One Health perspective.

KEYWORDS: Circulating Water, *Escherichia coli*, Bacterial Resistance, One Health.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Classificação molecular e funcional de Beta-lactamases.	10
Figura 2. Demonstração dos pontos de coleta pelo Google Earth Pro.....	13
Figura 3. Pontos de coleta da água.....	14
Figura 4. Processo de filtração da água realizado no INCQS - Fiocruz.	15
Figura 5. Informações extraídas do programa Bruker Daltonik MALDI descrevendo o significado dos valores em relação ao score obtido na amostra analisada.	16
Figura 6. Localização dos discos de antimicrobianos na placa de ágar Müller Hinton para leitura interpretativa.	17
Figura 7. Esquema de triagem e confirmação de ESBL.	18
Figura 8. Valores de NMP em cada ponto de coleta.....	21
Figura 9. Porcentagem de <i>Escherichia coli</i> nos diferentes pontos de coleta.....	23
Figura 10. Porcentagem de resistência encontrada para cada antibiótico dentre os isolados resistentes.	24
Figura 11. Porcentagem de <i>Escherichia coli</i> resistentes a cada antibiótico testado nos diferentes pontos de coleta.	25
Figura 12. Placa de antibiograma demonstrando um perfil fenotípico de uma ESBL. Seta demonstrando a deformação de halo característica de uma ESBL.	29
Figura 13. Eletroforese em gel do gene <i>bla</i> _{CTX-M-1}	30

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1. Descrição dos genes utilizados, seus primers, sequências nucleotídicas e ciclo otimizado.	20
---	----

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Antimicrobianos utilizados para o Teste de Difusão em Disco, Teste de Duplo Disco e Disco Combinado, separados por classe.....	17
Tabela 2. Resultado fenogenotípico.....	27

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

AMC	Amoxicilina + Ácido Clavulânico
AMP	Ampicilina
ATM	Aztreonam
BHI	Infusão de cérebro e coração
BrCast	<i>Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i> (Comitê Brasileiro de Testes de Sensibilidade aos Antimicrobianos)
CAZ	Ceftazidima
CFO	Cefoxitina
CIP	Ciprofloxacino
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CLVB	Caldo Lactosado com Verde Brilhante e Bile
CONAMA	Conselho Nacional de Meio Ambiente
CPM	Cefepime
CTC	Cefotaxima + Ácido clavulânico
CTX	Cefotaxina
CZC	Ceftazidima + Ácido clavulânico
DNA	<i>DeoxyriboNucleic Acid</i> (ácido desoxirribonucleico)
DVA	Doenças Veiculadas por Alimentos
<i>E coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC	Caldo <i>Escherichia coli</i>
ESBL	<i>Extended-Spectrum Beta-lactamase</i> (Beta-lactamase de Espectro Estendido)
ETARs	Estações de Tratamento de Águas Residuais
GEN	Gentamicina
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Kg	Quilograma
LST	Lauril Sulfato Triptose
MALDI-TOF MS	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrum</i> (Espectrometria de Massas por Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz)
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MDR	Multidroga-resistente
MERO	Meropenem
NMP	Número Mais Provável
Nº	Número
mL	Mililitros
mm	Milímetros
nm	Nanômetros
ODS	Objetivos do Desenvolvimento Sustentável
OMS	Organização Mundial da Saúde
ONU	Organização das Nações Unidas
PAN-BR	Plano de Ação Nacional
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase)
PNCRC	Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes
S	Segundos
TSDD	Teste de Sinergismo de Disco Duplo
UFC	Unidades formadoras de colônias
µg	Microgramas

μL
°C

Microlitros
Graus Celsius

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Produção avícola e o uso de antimicrobianos	3
2.2 Água	5
2.3 Coliformes e <i>Escherichia coli</i>	7
2.4 Beta-lactâmicos e a resistência	8
2.4.1 Beta-lactamases de Espectro Estendido (ESBL)	10
2.4.2 Beta-lactamases do tipo AmpC	11
3 MATERIAIS E MÉTODOS	12
3.1 Caracterização da área e coleta de amostras	12
3.2 Determinação de Coliformes	14
3.3 Isolamento e identificação de bactérias	15
3.4 Detecção fenotípica de resistência aos antimicrobianos	16
3.4.1 Preparo do inóculo	16
3.4.2 Teste de Disco Difusão	17
3.4.3 Confirmação da produção de ESBL por <i>E. coli</i>	18
3.4.3.1 Teste do disco combinado	19
3.4.3.2 Teste de sinergismo do duplo disco.....	19
3.4.4 Detecção de AmpC.....	19
3.4.5 Controle de qualidade dos testes.....	19
3.5 Detecção dos genes de resistência	20
3.5.1 Extração do DNA bacteriano	20
3.5.2 Técnica de PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>) e eletroforese em gel de agarose.....	20
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
4.1 Qualidade Microbiológica da Água	21
4.2 Coleta e Identificação das <i>Escherichia coli</i>	23
4.3 Análise do perfil de Resistência aos Antimicrobianos.....	23
4.4 Avaliação fenogenotípica de <i>Escherichia coli</i> produtoras de ESBL e AmpC	26
5 CONCLUSÃO	32
6 REFERÊNCIAS.....	33

1 INTRODUÇÃO

A produção avícola é uma das frentes agrícolas de maior importância econômica para o Brasil, com um relevante crescimento na última década, destacando-se como maior exportador e produtor de carne de frango no mundo. Sendo o mercado avícola essa potência, se faz necessário medidas profiláticas que impeçam o adoecimento desses animais, tendo em vista que muitas das vezes isso ocorre em lotes e levaria a perdas significativas para toda a cadeia produtiva. Assim, os antimicrobianos têm sido adicionados na água e ração na produção animal com os seguintes objetivos: profilático, evitando a presença de bactérias patogênicas; no tratamento de doenças e como melhoradores de desempenho animal, normalmente em doses contínuas ao longo da ração, evitando possíveis condenações de carcaças e queda na produção. A problemática desta prática é que aves possuem bactérias como *Escherichia coli* habitando naturalmente sua microbiota intestinal e o uso de antimicrobianos podem contribuir para a seleção de resistência bacteriana, o que é uma preocupação global para a saúde única, já que os microrganismos resistentes e seus genes de resistência podem se disseminar pela cadeia produtiva, atingindo o meio ambiente, outros animais e até os seres humanos.

Durante o processo de produção de carne aviária é importante considerar que há o consumo em torno de 5.000 a 21.000 L de água por tonelada de carne, gerando grande quantidade de efluentes ao longo da cadeia de abate. Sendo assim, a água torna-se mais uma via de disseminação das bactérias multirresistentes presentes neste ambiente, potencializando a transmissão entre os animais, o meio ambiente e até mesmo a funcionários expostos de forma ocupacional.

Em 2017, a Organização Mundial da Saúde (OMS) publicou a primeira lista de “agentes patogênicos prioritários” resistentes aos antimicrobianos, destacando 12 famílias de bactérias que representam a maior ameaça para a saúde humana, classificando-as em três níveis: crítico, alto e médio. A lista destaca em particular, a ameaça de bactérias Gram-negativas como a *Escherichia coli* produtoras de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) classificadas como nível crítico de importância. A produção de enzimas do tipo beta-lactamase é o principal mecanismo de resistência apresentado pelas *E. coli* frente aos beta-lactâmicos como penicilinas, cefamicinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenemas através de uma hidrólise. Essas enzimas são codificadas por genes chamados *bla*, que podem estar presentes no cromossomo

bacteriano ou em plasmídeos e sua expressão pode ser induzida pela presença dos beta-lactâmicos ou estar continuamente ativada.

Os beta-lactâmicos são os antimicrobianos mais frequentemente prescritos na prática médica, tanto em seres humanos quanto em animais, desempenhando diversas funções terapêuticas. No entanto, o aumento de bactérias resistentes a essa classe de medicamentos representa um alerta crítico para a saúde pública. Com o passar dos anos, a crescente resistência reduzirá significativamente as opções de tratamento disponíveis, tornando a situação preocupante.

Dada a relevância e o impacto das *Escherichia coli* produtoras de beta-lactamases na produção avícola, é importante destacar que o lançamento de águas residuais de abatedouros de animais em corpos d'água superficiais representa uma significativa fonte de disseminação de resistência bacteriana, constituindo um sério risco não só para o meio ambiente, que é constantemente contaminado por diferentes fontes, mas também para os humanos e animais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Produção avícola e o uso de antimicrobianos

Em 2022 o Brasil produziu cerca de 14,5 toneladas de carne de frango, sendo 66,8% voltado para o mercado interno e 33,2% para exportação. Além disso, atualmente se encontra como o maior exportador mundial (ABPA, 2023). Por ser um alimento de alto valor nutritivo e grande custo-benefício, cada dia mais está presente nos lares brasileiros, tornando-se a proteína mais consumida no país com 45,2 kg per capita (ABPA, 2023). Os principais fatores que conferiram ao país maior competitividade e permitiram a evolução contínua deste segmento de produção foi o desenvolvimento tecnológico iniciado em 1950 associado à disponibilidade e grande variedade de recursos naturais (Ferreira *et al.*, 2018). Hoje, a produção avícola do país se concentra, principalmente, nas regiões sul e sudeste, onde o estado do Rio de Janeiro produz anualmente cerca de 227.034 toneladas de carne de frango, sendo o líder de produção o município de São Jose do Vale do Rio Preto, com 134.047 toneladas (EMATER-RIO, 2022).

Os antimicrobianos têm sido administrados na produção animal com três objetivos principais: para melhorar o desempenho animal, em que são utilizadas baixas doses na ração de forma contínua com o intuito de melhorar a conversão alimentar e o crescimento animal; para prevenir a ocorrência de bactérias patogênicas, em que doses intermediárias são utilizadas antes ou durante transições críticas no processo produtivo; e para tratar doenças infecciosas, em doses mais altas (Kipper *et al.*, 2022). Esta prática melhorou significativamente a produção, já que consequentemente reduziu o adoecimento e morte do animal, e favoreceu o ganho de peso em um menor período de tempo. Entretanto, pode-se dizer que o uso de antimicrobianos por um longo período para fins terapêuticos na medicina humana e veterinária resultou em uma seleção de linhagens bacterianas resistentes (Bezerra *et al.*, 2017). Isso torna a cadeia produtiva uma grande fonte disseminadora de novos fenótipos de resistência em microrganismos patogênicos, sendo uma preocupação crescente, já que infecções provocadas por bactérias resistentes estão associadas com maior taxa de morbidade e mortalidade do que as causadas pelos patógenos sensíveis (Marshall & Levy, 2011; Blaak *et al.*, 2015; Brower *et al.*, 2017; Vounba *et al.*, 2019).

Uma forma de tentar racionalizar não só o uso dos antimicrobianos na produção animal como também de promover segurança alimentar para a população, no Brasil, o MAPA criou o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC), baseado na Instrução Normativa 42/1999, visando diminuir a presença de resíduos nos alimentos de origem animal. O plano determina o chamado período de retirada ou carência, considerado como o tempo

necessário de espera para que um composto seja metabolizado e eliminado sem risco de contaminação alimentar. Esse período varia conforme o princípio ativo, a via de aplicação e o tecido analisado, entendendo-se a importância da farmacocinética e farmacodinâmica nesses processos (de Mesquita Souza Saraiva *et al.*, 2022) Um exemplo é a amoxicilina, quando utilizada de forma oral para aves, deve ser retirada até 4 dias antes do abate.

Algumas ações legislativas foram adotadas a fim de controlar o uso dessas substâncias. A Instrução Normativa N° 26 de 09 de julho de 2009 regulamenta a proibição da administração de alguns antimicrobianos como aditivos zootécnicos e promotores de crescimento, dentre eles: anfenicóis, tetraciclina, beta-lactâmicos (benzilpenicilâmicos e cefalosporinas de 3ª e 4ª gerações), fluoroquinolonas, quinolonas e sulfonamidas sistêmicas (BRASIL, 2009). A Instrução Normativa N° 14 de 17 de maio de 2012 proíbe a importação, fabricação e o uso da espiramicina e eritromicina como aditivo zootécnico (BRASIL, 2012). A Instrução Normativa N° 45 de 22 de novembro de 2016 que regulamenta o uso da colistina apenas como alternativa terapêutica e proíbe seu uso como promotor de crescimento (BRASIL, 2016). Mais recentemente, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) publicou a Portaria 171/2018, que proíbe o uso dos antimicrobianos tilosina, lincomicina, virginiamicina, bacitracina e tiamulina como aditivos melhoradores de desempenho animal (BRASIL, 2018) e em 2020 foi publicada a Instrução Normativa nº 1, de 13 de janeiro de 2020, que proibiu em todo território nacional, a importação, a fabricação, a comercialização e o uso de aditivos melhoradores de desempenho que contenham os antimicrobianos tilosina, lincomicina, e tiamulina, classificados como importantes na medicina humana (BRASIL, 2020). Além disso, o Ministério da Saúde do Brasil implementou seu Plano de Ação Nacional (PAN-BR), de acordo com o Plano de Ação Global, definido pela aliança tripartite no conceito “One Health”. Esse documento envolve diversas esferas governamentais, entre elas o Ministério da Saúde e o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). O plano visava à educação em saúde, estudos epidemiológicos, vigilância e monitoramento do uso de antimicrobianos, fortalecimento da prevenção de infecções e implementação de medidas de controle e promoção do uso racional de antimicrobianos em animais, entretanto sua vigência era até 2022.

Sabendo-se que o aumento da produção de carne implica em uma quantidade cada vez maior de águas residuais produzidas, a Portaria 210/1998 do MAPA, recomenda o uso de 30 litros de água por frango abatido. Assim, principalmente após o pré-tratamento em estações de tratamento de águas residuais (ETARs) no local, os abatedouros geralmente descarregam suas águas residuais diretamente em um rio ou outro corpo receptor (descarga direta) ou em ETARs

municipais (descarga indireta), promovendo um possível aumento nas cargas de poluição lançadas no meio ambiente e representando mais uma fonte de disseminação de bactérias para o meio ambiente (Savin *et al.*, 2021). Essa interação entre bactérias de águas residuais e as ambientais, aumentam o potencial para transferência de novos mecanismos de resistência a antibióticos de bactérias ambientais para comensais ou patógenos humanos e animais (Aslan *et al.* 2018).

Tendo em vista que, a maioria das ETEs não são projetadas para remover antibióticos, estas substâncias acabam no meio ambiente, principalmente no solo e na água, aumentando a pressão seletiva nestes ecossistemas (Cioca; Munteanu, 2019) e se constituindo como um problema de saúde única que ameaça a eficácia do tratamento de infecções bacterianas devido as interações complexas capazes de afetar a saúde humana, animal e ambiental. Em 2011, durante a reunião tripartida (FAO-OIE-OMS) a resistência à antimicrobianos foi considerada uma das prioridades One Health e é ainda hoje um desafio para o mundo contemporâneo.

2.2 Água

Em 2010 a água potável e o saneamento foram reconhecidos pela Assembleia Geral da Organização das Nações Unidas (ONU) como direito humano essencial para o pleno gozo da vida e de todos os outros direitos humanos. Em 2015, 193 estados membros da ONU assinaram um documento chamado Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) onde se determina obrigatório fornecer água e saneamento para todos do planeta. Entretanto, em outubro de 2022 a ONU publicou um relatório demonstrando que embora mais de dois bilhões de pessoas tenham obtido acesso à água potável nas últimas duas décadas, um quarto da população mundial ainda não é atendida. A água é um dos principais disseminadores de patógenos, e quando não tratada adequadamente, pode causar doenças e levar a óbito. Estima-se que, anualmente, cerca de 829 mil pessoas morrem de diarreia como resultado de consumo de água, saneamento e higiene inadequada das mãos, atingindo principalmente crianças menores de 5 anos de idade (UNESCO, 2021; Prüss-ustün *et al.*, 2019).

No Brasil, o consumo total de água, considerando as diversas demandas para as atividades antrópicas, é de $1.211,90 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$. O uso para a produção e dessedentação animal (uso animal, 11,5%) é maior do que o uso para abastecimento urbano (8,6%), e a soma desses dois não chega nem perto do total de consumo de água que é destinada para irrigação (50,3%), que, por sua vez, corresponde à maior parte do consumo médio do país (Agência Nacional das

Águas, 2022). Analisando o impacto desse setor agrícola, entende-se que avaliar a qualidade microbiológica de águas residuais de abatedouros de aves podem fornecer informações importantes sobre o perfil de resistência que está sendo disseminado no meio ambiente através dos efluentes (Savin *et al.*, 2021)

Assim, buscando o maior desenvolvimento e enquadramento nos objetivos estabelecidos pela ONU para manter uma qualidade da água, no Brasil o Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA) dispôs sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes na Resolução 430/2011, determinando que “os efluentes não podem conferir ao corpo receptor características de qualidade em desacordo com as metas obrigatórias progressivas, intermediárias e final, do seu enquadramento” (BRASIL, 2011). O enquadramento dos corpos de água deve estar baseado nos níveis de qualidade preconizados para atender às necessidades da comunidade conforme a classificação de águas doces da Resolução nº 357/2005 do CONAMA:

- Classe Especial é destinada ao abastecimento para consumo humano, com desinfecção; à preservação do equilíbrio natural das comunidades aquáticas; e, à preservação dos ambientes aquáticos em unidades de conservação e proteção integral. Quando seu uso for para recreação de contato primário, deverá seguir os padrões de qualidade de balneabilidade previstos na Resolução nº274/2000 do CONAMA, onde o limite trata-se de 250 coliformes termotolerantes ou 200 *Escherichia coli* por 100 mililitros. Para os demais usos, não deverá ser excedido um limite de 200 coliformes termotolerantes em 100 mililitros.

- Classe 1 é destinada para consumo humano após tratamento simplificado; e à proteção das comunidades aquáticas. Não deverá ser excedido um limite de 200 coliformes termotolerantes em 100 mililitros.

- Classe 2 é destinada para consumo humano, após tratamento convencional; à recreação de contato primário, tais como natação, esqui aquático e mergulho, conforme Resolução CONAMA nº 274, de 2000; à irrigação de hortaliças, plantas frutíferas e de parques, jardins, campos de esportes e lazer, com os quais o público possa vir a ter contato direto; e, à aquicultura e à atividade de pesca. O número de coliformes termotolerantes para uso de recreação de contato primário deverá ser obedecida a Resolução CONAMA nº 274/200. Para os demais usos, não deverá ser excedido um limite de 1000 coliformes termotolerantes por 100 mililitros.

- Classe 3 é destinada para consumo humano, após tratamento convencional ou avançado; à irrigação de culturas arbóreas, cerealíferas e forrageiras; à pesca amadora; à recreação de contato secundário; e à dessedentação de animais. A presença de coliformes

termotolerantes para o uso de recreação de contato secundário não deverá ser excedido um limite de 2 500 coliformes termotolerantes /100 mililitros.

- Classe 4 é destinada à navegação; e, à harmonia paisagística. Para essa classificação não foi designada uma quantidade de coliformes máximo.

Além disso, o Ministério da Saúde, determina que a água própria para consumo humano não pode conter microrganismos patogênicos nem substâncias que representem risco à saúde em níveis superiores aos máximos permitidos e não pode apresentar características como gosto, odor ou cor que deixem a água com um aspecto desagradável. Visando determinar parâmetros de controles para a qualidade da água, atualmente há a Portaria de Consolidação Nº 888, 4 de maio de 2021, que divulga uma série de normas e o padrão de Potabilidade da Água destinada ao Consumo Humano, a serem observadas em todo o território nacional, sendo um deles a qualidade microbiológica da água, onde utilizam coliformes totais e *Escherichia coli* como marcadores de contaminação, precisando estar ambos ausentes em 100 mL de água amostral.

2.3 Coliformes e *Escherichia coli*

O grupo de coliformes pertence à família das enterobactérias, bacilos Gram-negativos, aeróbios facultativos e que fermentam a lactose com produção de aldeído, ácido de gás a 35°C em 24-48 horas. O teste de coliformes totais identifica todas as bactérias deste grupo que ocorrem naturalmente no ambiente, algumas dessas bactérias são consideradas nocivas e indicam contaminação fecal (de Sá, 2012). Já os coliformes termotolerantes, apresentam as mesmas características descritas acima, se diferenciam por precisarem de incubação a 44,5°C por 24 horas, sendo *Escherichia coli* o principal representante deste grupo e que indica a contaminação por fezes de animais de sangue quente, sendo um habitante comum do trato intestinal de homem e animais (Vasconcelos, 2019).

A avicultura brasileira tem sido dramaticamente afetada por infecções, como a colibacilose aviária em frangos de corte e poedeiras causada por *E. coli*. Essas infecções são a principal causa de condenação total de carcaças de frango em frigoríficos sob o Serviço de Inspeção Federal na região sul do Brasil, resultando em perdas econômicas substanciais para os produtores e toda a cadeia produtiva (Roth *et al.*, 2019; Santiago *et al.*, 2019).

A *Escherichia coli* é uma enterobactéria pertencente a ordem Enterobacterales, sendo um dos microrganismos com maior impacto clínico, tanto humano quanto veterinário, causando infecções que proporcionam altos valores de morbidade e mortalidade por todo o mundo (Carvalho *et al.*, 2018). Além disso, a falta de condições sanitárias adequadas também permite

que solos, água e alimentos sejam contaminados em consequência do contato com as fezes desses animais que albergam cepas patogênicas e não-patogênicas (Carvalho *et al.*, 2018) que muitas vezes apresentam resistência aos antimicrobianos usualmente empregados em sistemas de produção. Além disso, em torno de 80% desses medicamentos são excretados como substância inalterada ou como metabólitos que ainda podem estar ativos (Ladiret *et al.*, 2013). A detecção de bactérias desta espécie em alimentos é um dado importante para a saúde pública devido ao seu envolvimento com casos ou surtos de Doenças Veiculadas por Alimentos – DVA (Melo *et al.*, 2018; Cormier *et al.*, 2019). A alta disseminação e o potencial contaminante dessa bactéria em diferentes tipos de hospedeiros são grande alertas para a saúde pública e única (Carvalho *et al.*, 2018).

Baseando-se no uso em larga escala dos beta-lactâmicos como melhoradores de desempenho dentro da produção aviária, a resistência a estes fármacos acaba constituindo o mecanismo mais comum de resistência e o mais representativo em bactérias Gram negativas, tendo apresentado, ao longo dos anos, um impacto considerável na atividade desses antimicrobianos (Morán-Díaz *et al.*, 2019)

2.4 Beta-lactâmicos e a resistência

A descoberta dos beta-lactâmicos remonta ao início do século XX. O primeiro composto desse grupo a ser descoberto foi a penicilina, por Alexander Fleming, em 1928. Apesar disso, só foi introduzida na terapia em 1940 se mostrou extremamente eficaz no tratamento de infecções bacterianas, incluindo algumas infecções que eram anteriormente letais. Com base nessa descoberta, os pesquisadores continuaram a busca por outros compostos com atividade antibiótica semelhante. Esses esforços levaram ao desenvolvimento de outros antibióticos beta-lactâmicos, como as cefalosporinas, descobertas na década de 1940, e as carbapenemas, descobertas na década de 1970 (Guimarães *et al.*, 2010). Tendo em vista os ótimos resultados apresentados por esses antimicrobianos, passaram a constituir a base terapêutica de diversas infecções (Paterson & Bonomo, 2005). No entanto, concomitantemente com a sua introdução no início dos anos 1980, as beta-lactamases que conferem resistência às cefalosporinas de terceira geração foram documentadas em vários estudos (Huovinen *et al.*, 1988). Estes incluíram principalmente as beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs) observadas como variantes de TEM-1, TEM-2 e SHV-1 (Phillippon *et al.*, 1989; Bradford, 2001), ou as enzimas CTX-M (Bonnet, 2004). Logo em seguida surgiram as com resistência adicional a cefamicinas e carbapenêmicos, dando origem as beta-lactamases do tipo AmpC.

Os beta-lactâmicos são agentes antibacterianos que inibem irreversivelmente a enzima transpeptidase, que catalisa a reação de transpeptidação entre as cadeias peptídeglicas da parede celular bacteriana. A atividade desta enzima leva à formação de ligações cruzadas entre as cadeias peptídicas da estrutura peptídeglica, conferindo à parede celular uma estrutura rígida importante para a proteção da célula bacteriana contra as variações osmóticas do meio. Constituem a primeira classe de derivados de produtos naturais utilizados no tratamento terapêutico de infecções bacterianas. Hoje, várias décadas após a descoberta da penicilina, este grupo ainda contém os agentes mais comumente utilizados. Possuem amplo espectro de atividade antibacteriana, eficácia clínica e excelente perfil de segurança, uma vez que atuam na enzima transpeptidase, única em bactérias (Guimarães *et al.*, 2010)

Esses fármacos compartilham um componente estrutural característico, o anel beta-lactâmico, que é o principal responsável pelo mecanismo de ação dessas moléculas. Porém, para que tenha atividade, o anel beta-lactâmico deve estar ligado a outro radical que definirá o grupo ao qual o fármaco pertencerá: penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos ou carbapenemas (Nogueira, 2011). Em conjunto, os beta-lactâmicos correspondem a mais da metade de todos os antimicrobianos produzidos e utilizados no mundo (Madigan *et al.*, 2016).

As beta-lactamases são capazes de inativar antimicrobianos da classe dos beta-lactâmicos através da hidroxilação irreversível da ligação amida do anel. Como resultado da atividade enzimática, há a formação de compostos isentos de atividade antimicrobiana que são água e ácido peniciloico (Silva & Lincopan, 2012). A atividade de hidrólise do beta-lactâmico pode variar de acordo com o tipo de substrato e com a suscetibilidade da bactéria aos inibidores de beta-lactamases, como ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam. São codificadas por genes *bla*, que podem ser cromossômicos ou plasmidiais, podendo estar presentes de forma induzível ou constitutiva (Andrade & Darini, 2017).

Filogeneticamente as beta-lactamases são classificadas “Serina-Beta-lactamases” ou “Metallo-Beta-lactamases”, formando dois grandes grupos de enzimas que possuem a capacidade de degradar beta-lactâmicos. A classificação delas pode ser feita de duas formas (Figura 1): com base nas diferenças moleculares das enzimas, como foi proposto por Ambler (Ambler, 1980), baseando-se na homologia de aminoácidos entre as enzimas, resultando na diferenciação das enzimas em quatro classes representadas por A, B, C, e D. As classes A, C e D incluem enzimas que contêm o aminoácido serina em seu sítio ativo, enquanto a classe B é representada pelas metaloenzimas, que contêm o zinco no sítio ativo. Outra classificação possível e amplamente utilizada é a de Bush-Jacoby-Medeiros (Bush & Jacoby, 2010), que é

baseada na afinidade da enzima para determinados substratos e na sua inativação diante de inibidores específicos. Os grupos são definidos de 1 a 4, com subdivisões que abrangem os diversos tipos de beta-lactamases.

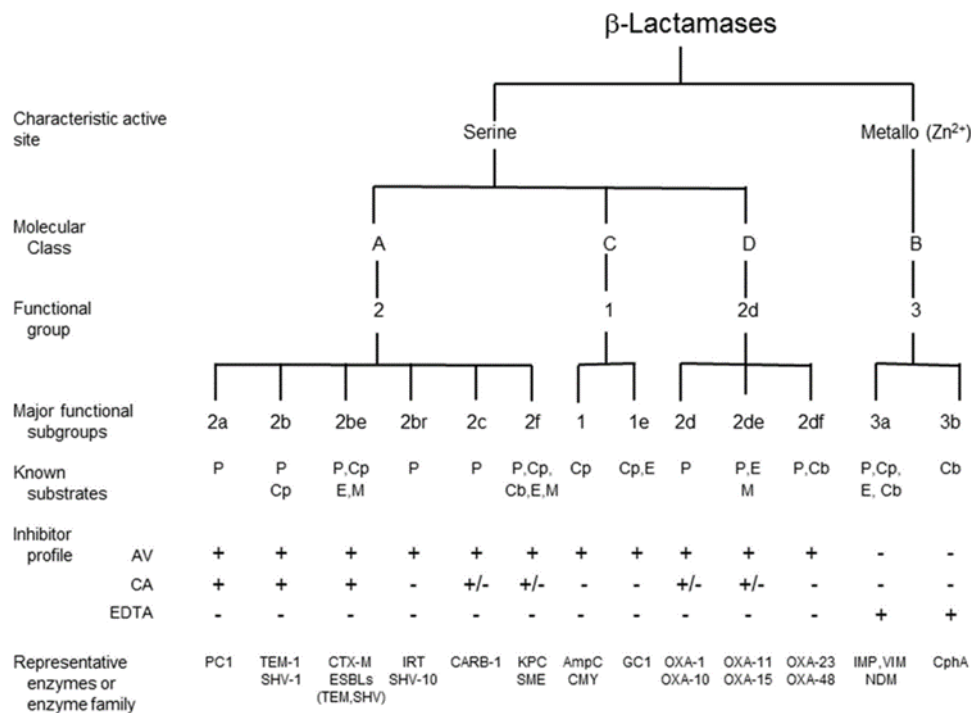


Figura 1. Classificação molecular e funcional de Beta-lactamases.

Legenda: CLA, ácido clavulânico; AVI, avibactam; APB, ácido fenilborônico; EDTA, ácido etilenodiamino tetra-acético. Antimicrobianos: Cb, carbapenêmico; Cf, cefalosporina; Cfe, cefalosporina de espectro estendido; M, monobactâmico; P, penicilina. (Souza, 2021)

2.4.1 Beta-lactamases de Espectro Estendido (ESBL)

As beta-lactamases de Espectro Estendido (ESBL) são enzimas capazes de hidrolisar cefalosporinas de terceira e quarta geração e aztreonam, e são inativadas por inibidores como clavulanato, sulbactam e tazobactam. Desde sua descoberta têm sido detectadas em todo o mundo. Essa distribuição é um resultado da expansão clonal de organismos produtores de ESBL, da transferência horizontal de genes codificadores de ESBL em plasmídeos e, menos comumente, surgimento de novas enzimas (Andrade & Darini, 2017). As enzimas com tais características pertencem ao grupo 2be (tipo TEM, SHV e CTX-M) ou ao grupo 2d (tipo OXA) (Bush & Jacoby, 2010) e estão classificadas como pertencentes à classe A de Ambler (Ambler, 1980), com exceção da família OXA que pertencem à classe D.

As enzimas ESBL são agrupadas e denominadas de acordo com sua similaridade com as enzimas precursoras e/ou grupos já conhecidos. A maioria das ESBL são derivadas das beta-

lactamases dos tipos TEM e SHV, mas enzimas do tipo CTX-M estão crescendo relativamente nos últimos anos, principalmente na América Latina. A primeira beta-lactamase do tipo TEM a ser verificada expressando o fenótipo ESBL foi a TEM-3, relatada em 1987. Em microrganismos Gram-negativos, a enzima TEM-1 é a mais comumente encontrada. As enzimas do grupo SHV são mais frequentemente encontradas em cepas de *Klebsiella pneumoniae*, com o gene *bla_{SHV-1}* integrado ao cromossomo bacteriano e maioria das beta-lactamases do tipo SHV tem fenótipo ESBL. As enzimas CTX-M são mediadas por plasmídeos e hidrolisam preferencialmente a cefotaxima, e, inicialmente, foram encontradas principalmente em isolados da África do Sul. Ao contrário das beta-lactamases do tipo CTX-M, as enzimas TEM e SHV têm maior nível de resistência à ceftazidima do que à cefotaxima (Bradford, 2001; Livermore, 1995; Santiago, 2013). Além dessas famílias de ESBL já bem estabelecidas, há outras enzimas que também já foram descritas, como PER, GES, VEB, BES, TLA, SFO e IBC, entre outras (Silva & Licopan, 2012)

2.4.2 Beta-lactamases do tipo AmpC

As enzimas do tipo AmpC são cefalosporinases pertencentes ao grupo 1 de Bush-Jacoby-Medeiros e classe C de Ambler (Bush & Jacoby). Elas hidrolisam as cefamicinas, assim como outras cefalosporinas de espectro estendido, e são pouco ou não inibidas pelo ácido clavulânico. No entanto, essas enzimas podem ser inibidas por cloxacilina, oxacilina e ácido borônico e seus derivados. Nos últimos anos, a produção de enzimas de tipo AmpC tem contribuído com o alto índice de resistência aos beta-lactâmicos em espécies que apresentam elevados níveis de expressão constitutiva, devido a uma derepressão dos genes cromossômicos ou pela aquisição de AmpC mediadas por plasmídeos (Santiago, 2013).

As pequenas diferenças na sequência de aminoácidos deram origem às famílias de AmpC. A regulação da expressão de AmpC pode diferir entre os microrganismos Gram negativos e é o que determina a diferença entre as beta-lactamases AmpC constitutivas (plasmidiais) e induzíveis (cromossomais). Na maioria dos gêneros da ordem Enterobacterales, a AmpC é induzível e essa indução pode ser percebida pela exposição da bactéria a alguns beta-lactâmicos, podendo ocasionar falência terapêutica, mesmo que a bactéria tenha sido originalmente considerada sensível ao antimicrobiano no teste de sensibilidade laboratorial (Santiago *et al.*, 2016; Andrade & Darini, 2017).

Em *E. coli*, a produção da enzima constitui uma expressão não induzível e cromossomal, não sendo habitualmente suficiente para ter consequências fenotípicas (*in vitro*) nas estirpes

que as produzem. Também há relatos de AmpC plasmidial em *E. coli*, onde a presença do gene plasmidial aumenta a prevalência do mecanismo de resistência pela disseminação entre os Gram-negativos e modifica as características de suscetibilidade antimicrobiana *in vitro*, sendo o gene mais disseminado o *bla*_{CMY-2}. Acredita-se que as AmpC plasmidiais tenham surgido pela transferência de genes cromossomais induzíveis para plasmídeos. Como característica desse grupo enzimático, a sensibilidade às cefalosporinas de quarta geração vem sendo bastante discutida, uma vez que estudos já identificaram tipos de AmpC de espectro estendido (ESAC) que são capazes de hidrolisar cefepime, por exemplo (Jacoby, 2009; Bush & Jacoby, 2010; Santiago, 2017).

Tendo em vista que constantemente cepas de *Escherichia coli* resistentes a beta-lactâmicos e seus genes de resistência vem sendo relatados na produção avícola (Pimenta, 2018; Santiago *et al.*, 2019), obter dados epidemiológicos sobre essa disseminação através das águas residuais tratadas de abatedouro lançadas em corpos d'água receptoras permite entender a disseminação microbiana daquele ambiente e alertar sobre seu risco para a saúde pública.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Caracterização da área e coleta de amostras

As amostras foram coletadas no município de São José do Vale do Rio Preto, na região Serrana do Estado do Rio de Janeiro, onde deságua o rio Preto em diferentes pontos de passagem de água do abatedouro de frangos. A cidade é o principal polo de produção avícola em nível regional (cerca de 100 granjas) e é cercada por áreas agrícolas de grande relevância para o abastecimento de produtos *in natura* (ex. tomate, chuchu, abobrinha, berinjela, pepino) para a região metropolitana do Rio de Janeiro. Além disso, a área de estudo possui fragmentos de Mata Atlântica brasileira, bioma tropical protegido por parques nacionais e estaduais de grande relevância para a conservação da biodiversidade e dos recursos hídricos (Parente *et al.*, 2019).

Foram realizadas quatro coletas de água entre setembro de 2021 e junho de 2022, nos pontos: P1- Entrada do abatedouro, córrego que vem direto do rio para dentro do abatedouro; P2 - Tanque de equalização, efluente bruto pós abate; P3 – Estação de tratamento própria do abatedouro e P4 – Saída do efluente tratado (Figura 1 e Figura 2). Totalizando 16 amostras de águas.



Figura 2. Demonstração dos pontos de coleta pelo Google Earth Pro.

Legenda: P1- Entrada do abatedouro, córrego que vem direto do rio para dentro do abatedouro; P2 - Tanque de equalização, efluente bruto pós abate; P3 – Estação de tratamento própria do abatedouro e P4 – Saída do efluente tratado.



Figura 3. Pontos de coleta da água.

Legenda: A: P1 – Entrada do Abatedouro (córrego); B: P2 – Tanque de equalização; C: P3 – Estação de tratamento; D: P4 – Saída do efluente tratado.

As amostras de água foram coletadas em recipiente estéril de vidro no volume de 2 litros por amostra, e transportadas ao Laboratório de Microrganismos de Referência / INCQS / Fiocruz para o processo de filtração.

3.2 Determinação de Coliformes

Para determinar o número de coliformes totais e coliformes termotolerantes utilizou-se a técnica do Número Mais Provável (NMP). Após realizada a coleta da água e homogeneização da amostra, 1 mL da amostra de água foi adicionado em 9 mL de água peptonada 0,1% (diluição 10^{-1}) realizando a primeira diluição. Esta suspensão foi homogeneizada e 1 mL foi transferida para um frasco contendo 9 mL de água peptonada (diluição 10^{-2}). Esse procedimento foi realizado sucessivamente até a décima diluição, para cada amostra coletada (APHA, 2015).

Para o teste presuntivo de coliformes totais, transferiu-se 1 mL das respectivas diluições para uma série de cinco tubos contendo 9 mL do Caldo Lauril Sulfato Triptose (LST) com um tubo de Durham invertido. Os tubos foram incubados na estufa a 35°C por 48 h. Os tubos considerados positivos foram aqueles que apresentaram turbidez do meio e/ou produção de gás no tubo de Durham, sendo destinados aos testes confirmatórios.

Para confirmação e quantificação de coliformes totais, alíquotas das amostras positivas do meio LST foram transferidas para tubos contendo Caldo Lactosado com Verde Brilhante e Bile (CLVB) a 2%. Os tubos de caldo CLVB foram incubados em estufa a 35°C por 48 horas. Foram considerados positivos os tubos que apresentaram turbidez e/ou continham formação de gás no interior do tubo de Durham.

Para quantificação de coliformes totais termotolerantes, alíquotas das amostras positivas (turbidez e/ou com presença de gás no tubo de Durham) do meio LST foram transferidas para tubos contendo Caldo *Escherichia coli* (EC). Os tubos de caldo EC foram incubados em banho-maria a 45°C por 24 horas e foram considerados positivos aqueles que apresentaram turbidez e/ou continham formação de gás no interior do tubo de Durham.

Foram inoculadas três séries de cinco tubos com três diluições decimais diferentes, para ambas as quantificações. O número de tubos positivos de três diluições foi comparado com a

tabela de NMP. O número mais provável de cada amostra foi calculado de acordo com a seguinte fórmula:

NMP correspondente a tabela x 10/v

Onde: v = Maior volume inoculado.

3.3 Isolamento e identificação de bactérias

Para o isolamento de bactérias, as amostras de água foram concentradas em membranas de 0,22 μm (Figura 3) através de filtração à vácuo e inoculadas em um tubo contendo caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI), permanecendo a 37°C por 24 horas em seguida. Alíquotas desses inóculos foram semeadas em meios seletivos para bactérias Gram-negativas (ágar MacConkey - HiMedia® e ágar Eosina Azul de Metileno - HiMedia®). As placas foram incubadas em estufa a 37°C por 24 horas. Após o crescimento, foram isoladas colônias com diferentes características morfológicas.

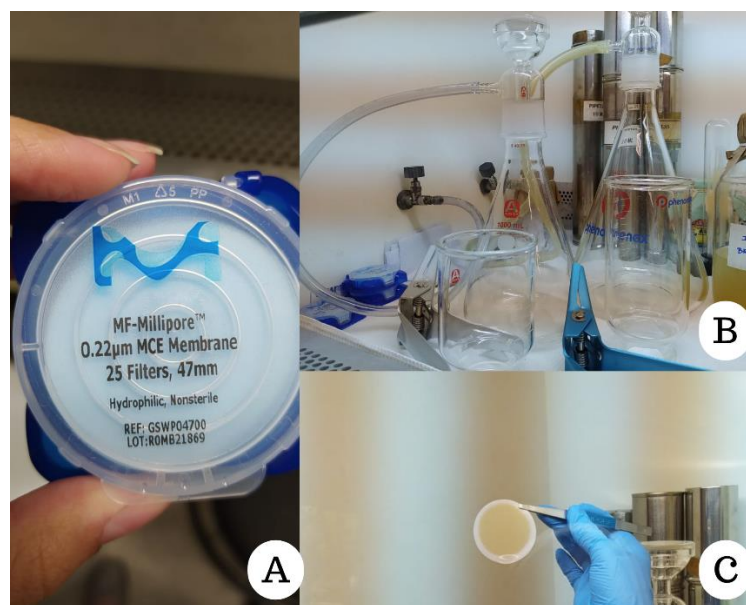


Figura 4. Processo de filtração da água realizado no INCQS – Fiocruz.

Legenda: A – membrana utilizada no processo de filtração; B: aparato montado dentro do fluxo para procedimento de filtração a vácuo das amostras; C: membrana a filtração da água.

Todos os isolados foram identificados através de análise proteômica pela técnica de Espectrometria de Massas por Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz (MALDI-TOF MS) no Laboratório de Investigação em Microbiologia Médica do Instituto de

Microbiologia Paulo Góes da UFRJ. Para o preparo das amostras, os isolados foram cultivados em ágar CLED a 37°C por 24 horas. Cada cultura bacteriana foi transferida para a microplaca (96 MSP, Bruker-Billerica, E.U.A) e, ao sedimento bacteriano, foi adicionado uma solução de lise (ácido fórmico 70% Sigma- Aldrich®) em quantidade suficiente para cobri-lo. Em seguida 1 µL de solução da matriz (ácido alfa-ciano-4-hidroxi-cinâmico diluído em acetonitrila 50% e ácido trifluoracético 2,5%, Sigma-Aldrich®) foi utilizado para cobrir o extrato bacteriano, para finalmente ser processado.

Os espectros de cada amostra foram gerados em um espectro de massa (MALDI- TOF LT Microflex Bruker, Bruker®) equipado com laser de 337 nm de nitrogênio no modo linear controlado pelo programa Flex Control 3.3 (Bruker®). Os espectros foram coletados na faixa de massa entre 2.000e 20.000 m/s e, analisados pelo programa MALDI Biotyper 2.0 (Bruker®). O programa MALDI Biotyper 2.0, confronta os espectros da amostra desconhecida com as amostras de referência no banco de dados e categoriza os resultados em uma escala que vai de zero a três (Figura 4), sendo que quanto maior o valor, mais confiável é a identificação. Considerou-se como uma identificação aceitável aquelas que apresentaram valores ≥ 2.000 .

<i>Score</i>	Identificação	Símbolo	Cor
2.300 – 3.000	Identificação altamente provável das espécies	(+++)	Verde
2.000 – 2.299	Identificação segura do gênero e provável das espécies	(++)	Verde
1.700 – 1.999	Identificação provável do gênero	(+)	Amarelo
0.000 – 1.699	Identificação não confiável	(-)	Vermelho

Figura 5. Informações extraídas do programa Bruker Daltonik MALDI descrevendo o significado dos valores em relação ao score obtido na amostra analisada.

Fonte: SOUZA, 2021.

3.4 Detecção fenotípica de resistência aos antimicrobianos

3.4.1 Preparo do inóculo

Após 24 horas de incubação em ágar BHI a 35°C, as colônias de *Escherichia coli* foram ressuspensas em solução salina 0,9 % (0,9 g de NaCl em 100 mL de água destilada) até se obter uma turvação equivalente à escala 0,5 de McFarland, o que corresponde a uma concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL.

3.4.2 Teste de Disco Difusão

O teste foi realizado em conjunto com os testes confirmatórios de Sinergismo de Disco Duplo e o Disco Aproximação para avaliação da produção de beta-lactamases de amplo espectro em uma mesma placa, seguindo os padrões estabelecidos pelo Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (BrCAST, 2017). Assim, uma alíquota do inóculo com concentração ajustada foi semeado na superfície do meio ágar Mueller Hinton em placa de 140x15 mm. Discos dos antimicrobianos foram dispostos na placas (Tabela 1), conforme apresentado na Figura 6. Posteriormente, as placas foram incubadas por 18 horas a 35° C.

Tabela 1. Antimicrobianos utilizados para o Teste de Difusão em Disco, Teste de Duplo Disco e Disco Combinado, separados por classe.

Beta-lactâmicos	Amoxicilina + ac. clavulânico (20/10 µg); ampicilina (10 µg); aztreonam (30 µg); cefepime (30 µg); cefotaxima (5 µg); cefotaxima (30 µg); cefotaxima + ac. clavulânico (30/10 µg); ceftazidima (10 µ); ceftazidima (30 µg); ceftazidima + ac. clavulânico (30/10 µg)
Carbapenêmico	Meropenem (10 µg)
Aminoglicosídeo	Gentamicina (10 µg)
Fluoroquinolona	Ciprofloxacino (5 µg)

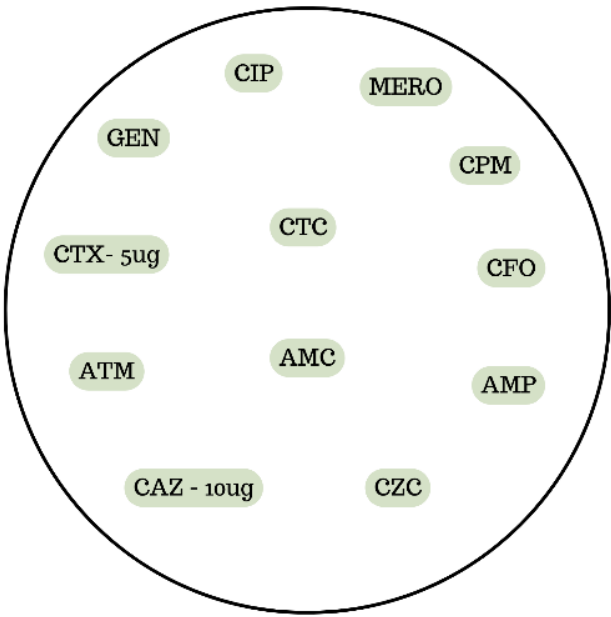


Figura 6. Localização dos discos de antimicrobianos na placa de ágar Müller Hinton para leitura interpretativa.

Legenda: AMC - Amoxicilina + ac. clavulânico (20/10 µg); AMP - ampicilina (10 µg); ATM - Aztreonam (30 µg); CPM - Cefepime (30 µg); CTX5 - Cefotaxima (5 µg); CTX- Cefotaxima (30 µg); CTC - Cefotaxima + ac. clavulânico (30/10 µg); CFO - Cefoxitina (30 µg); CAZ10 - Ceftazidima (10 µ); CAZ - Ceftazidima (30 µg); CZC- Ceftazidima + ac. clavulânico (30/10 µg); GEN- Gentamicina (10 µ); CIP – Ciprofloxacino (10 µ); MERO – Meropenem (10 µ).

A avaliação da resistência aos beta-lactâmicos foi obtida, com auxílio de régua milimetrada, através da aferição do diâmetro dos halos de inibição de crescimento dos discos testados, sendo possível verificar a sensibilidade, a resistência intermediária ou a resistência aos mesmos, considerando o padronizado pelo BrCAST (2022).

3.4.3 Confirmação da produção de ESBL por *E. coli*

A confirmação da produção de ESBL foi realizada através da leitura dos testes de disco combinado e sinergismo em disco duplo, conforme ilustrado na Figura 6 e seguiu o procedimento preconizado pelo BrCAST ilustrado na Figura 7.

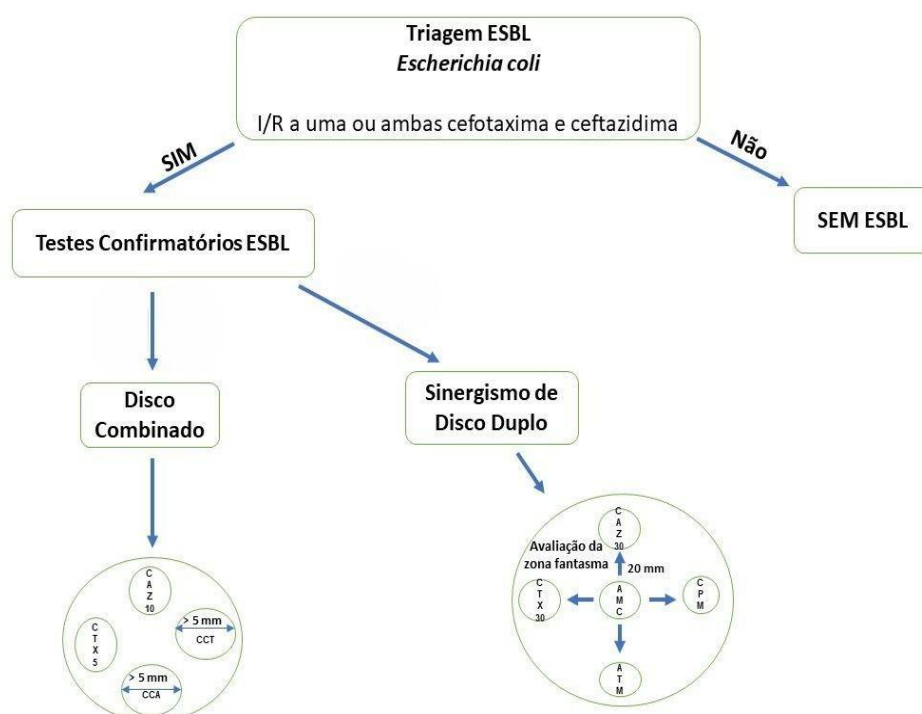


Figura 7. Esquema de triagem e confirmação de ESBL.

Disco Combinado: Localização dos discos de antimicrobianos na placa de ágar Müller Hinton para leitura interpretativa. CAZ – ceftazidima 10 µg, CTX – cefotaxima 5µg, CZC – ceftazidima com ácido clavulânico 30/10 µg, CTC – cefotaxima com ácido clavulânico 30/10 µg. **Sinergismo de Disco Duplo:** Localização dos discos de antimicrobianos, com distância de 20 mm, na placa de ágar Müller Hinton para leitura interpretativa. AMC – amoxicilina com ácido clavulânico 20/10 µg, CAZ – ceftazidima 30 µg, CTX – cefotaxima 30 µg, ATM – aztreonam 30 µg, CPM – cefepime 30 µg.

Fonte: SOUZA, 2021 com modificações.

3.4.3.1 Teste do disco combinado

Para cada teste, os discos contendo a cefalosporina de 30 µg isoladamente e em combinação com o ácido clavulânico 10 µg, foram aplicados. O halo de inibição em torno do disco de cefalosporina combinado com o ácido clavulânico é comparado com o halo em torno do disco com a cefalosporina isoladamente. O teste é positivo se o diâmetro do halo de inibição com o disco combinado for pelo menos 5 mm maior do que aquele com o disco sem o ácido clavulânico, conforme ilustrado na Figura 7.

3.4.3.2 Teste de sinergismo do duplo disco

Para o teste de sinergismo entre os discos de cefalosporina de terceira e quarta geração, os discos foram dispostos a 20 mm de distância de um disco contendo o inibidor de beta-lactamase. Tais discos foram posicionados na placa, sendo que no centro foi depositado um disco de amoxicilina+ácido clavulânico 20/10 µg, e ao redor deste foram colocados discos das cefalosporinas de terceira geração, cefotaxima 30 µg e ceftazidima 30 µg, e a cefalosporina de quarta geração, cefepime 30 µg, junto ao monobactâmico aztreonam 30 µg, a uma distância de 20 mm, centro a centro, conforme exposto na Figura 7. Posteriormente, foram incubadas a 35°C +/- 2 °C por um período de 18 horas. Após a incubação, foi realizada a leitura, sendo considerado resultado positivo para produção de ESBL, quando houve a formação de “zona fantasma”, ou seja, as zonas de inibição em torno de qualquer um dos discos de cefalosporinas ficaram aumentadas na direção do disco que contém o ácido clavulânico, havendo uma deformação no halo de inibição (BrCAST, 2017).

3.4.4 Detecção de AmpC

Na mesma placa, foram testadas as cefalosporinas de terceira geração cefotaxima, no qual foram avaliadas as cepas que apresentaram resistência através de leitura interpretativa. A avaliação da resistência foi obtida, com auxílio de régua milimetrada, através da aferição do diâmetro dos halos de inibição de crescimento dos discos testados. As cepas que apresentaram resistência a cefoxitina foram consideradas possíveis produtoras de AmpC (BrCAST, 2017).

3.4.5 Controle de qualidade dos testes

Foram utilizadas como controle para cada teste realizado neste trabalho as seguintes cepas padrão: *Escherichia coli* ATCC25922 e *Klebsiella pneumoniae* ATCC700603 (BrCAST, 2017).

3.5 Detecção dos genes de resistência

3.5.1 Extração do DNA bacteriano

O processo de extração do DNA total bacteriano foi realizado pela metodologia de lise térmica, na qual cada isolado foi cultivado em 1,5 mL de caldo BHI a 35°C por 24 horas. Posteriormente, os microtubos foram centrifugados por 2 minutos a 13500 g e o sobrenadante descartado. O precipitado foi ressuspensionado em 200 µL de água ultrapura e agitado em vórtex, sendo então incubadas a 100°C por 10 minutos. Em seguida, os microtubos foram resfriados à temperatura ambiente e centrifugados por 2 minutos a 13500 g. Aproximadamente 180 µL do sobrenadante foi transferido para novos microtubos de 600 µL que são armazenados à temperatura de -20°C (FERIA, 2002).

3.5.2 Técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) e eletroforese em gel de agarose

Para verificar a presença dos genes *bla*_{CTX-M-1} e *bla*_{CMY-2-like} foi utilizada a técnica de PCR preparando-se reações com total de 25 µL, sendo 2 µL de DNA; 3 mM de MgCl₂ (Invitrogen®); 0,2 mM de cada dNTPs (dATP, dGTP, dCTP e dTTP - Invitrogen®); tampão da Taq Polimerase 1x (Invitrogen®); 0,4 µM de cada *primer* descritos no quadro 2 e 1U de Taq Polimerase (Invitrogen®). As sequências nucleotídicas dos *primers* e as condições de amplificação encontram-se indicados no Quadro 1.

Quadro 1. Descrição dos genes utilizados, seus primers, sequências nucleotídicas e ciclo otimizado.

Genes	Primers	Sequências	Ciclo
<i>bla</i> _{CTX-M-1}	<i>bla</i> _{CTX-M} F <i>bla</i> _{CTX-M} R	AAAAATCACTGCGCCAGTTC CCGTCGGTGACGATTTTAGCC	94°C 5 min, (94°C 1 min, 55°C 1 min, 72°C 1 min) x40, 72°C 5 min. ¹
<i>bla</i> _{CMY-2-like}	<i>bla</i> _{CMY} F <i>bla</i> _{CMY} R	GGG CCC GGA CAC CYT TTT GC TAA GTG TAG ATG ACA RCA GG	94°C 5 min, (94°C 1 min, 54°C 1 min., 72°C 1 min.)x 35, 72°C 5 min. ²

Legenda: 1 – (GESER *et al.*, 2012); 2- (D'ANDREA *et al.*, 2006).

Os produtos do PCR foram avaliados por meio de eletroforese em gel de agarose (1,5%) e revelados com Sybr Green (Invitrogen®). O gel será visualizado sobre luz ultravioleta e

documentado no fotodocumentador (L-PIX EX) utilizando marcador de tamanho molecular de 100 pb (Fermentas®).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Qualidade Microbiológica da Água

Foi possível observar a diferença de valores de NMP de coliformes totais e termotolerantes da água na entrada e da saída do abatedouro (Figura 8). A água da entrada (córrego), coletada num ponto a montante do abatedouro, apresentou valores entre 450 e 780 NMP/100 mL de coliformes termotolerantes, valores considerados dentro do padrão exigido pela legislação para água de classe 2. No entanto, para os dois índices observa-se uma flutuação de valores entre as coletas, mais discrepante para coliformes totais, onde na primeira apresentou de $4,3 \times 10^4$ NMP/100 mL, enquanto na segunda foi de 780 NMP/100 mL e 1300 NMP/100 mL na terceira. Essa variabilidade nos valores mostra que há alguma fonte de contaminação no percurso até o córrego, justificados pela quantidade de propriedades agrícolas a montante do abatedouro (SAMPAIO *et al.*, 2019), que provavelmente descartam seus efluentes no leito do córrego.

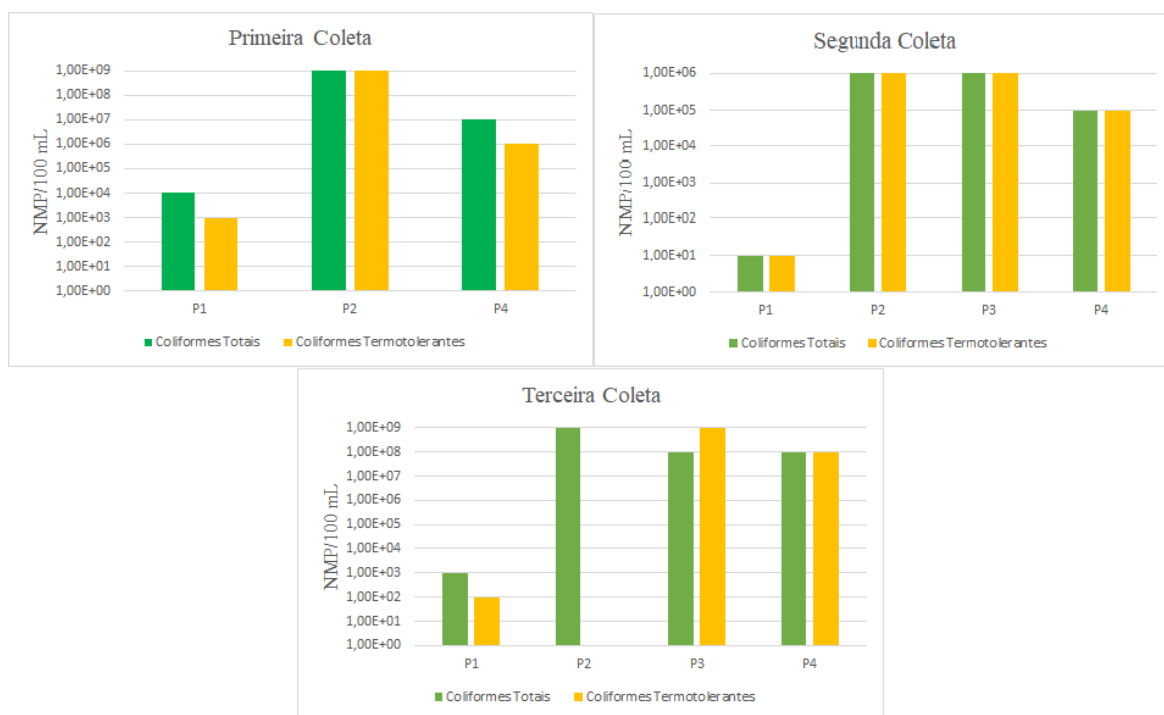


Figura 8. Valores de NMP em cada ponto de coleta.

Legenda: A – primeira coleta, B – segunda coleta, C – terceira coleta. P1: Entrada do abatedouro, córrego que vem direto do rio para dentro do abatedouro; P2: Tanque de equalização, efluente bruto pós abate; P3: Estação de tratamento própria do abatedouro e P4: Saída do efluente tratado.

A quantificação de coliformes no tanque de equalização, apresentou uma densidade populacional num intervalo de 10^7 a 10^9 NMP/100 mL para ambos os coliformes, totais e termotolerantes. A presença destes grupos de microrganismos no efluente bruto proveniente do abatedouro é esperado, tendo em vista que aves são reservatórios naturais de bactérias gram-negativas, pertencentes do grupo coliformes. Tendo em vista que a água participa de todo o processo de abate, desde lavagem dos animais, carcaças e vísceras e tbm do ambiente e aparelhos utilizados, o número de microrganismos presentes na água após o abate é justamente um reflexo de toda essa cadeia (Carvalho *et al.*, 2005). Após o abate dos animais, o efluente bruto é encaminhado para um tanque de equalização, onde é separada a fase sólida da fase líquida. A fase líquida é encaminhada para a estação de tratamento para um tratamento químico e direcionada para as piscinas de anaerobiose e aerobiose, para tratamento biológico e assim por fim, ser descartada para o ambiente.

Os efluentes tratados apresentaram valores entre $1,3 \times 10^6$ NMP/100 mL e $2,3 \times 10^8$ NMP/100 mL para coliformes totais e $1,1 \times 10^8$ NMP/100 mL e $7,0 \times 10^6$ NMP/100 mL para coliformes termotolerantes. Comparando a carga microbiana do efluente tratado com o efluente bruto, pode-se perceber que há uma diminuição da carga microbiana, podendo inferir que os tratamentos realizados dentro do abatedouro estão apresentando resultados. Porém, conforme a Resolução 430 CONAMA, uma vez que o efluente, mesmo após tratamento, apresenta uma carga mínima de coliformes termotolerantes na casa da 10^6 , não poderia ser descartado no córrego por exceder o limite máximo de qualidade para águas de classe 2, que é 1000 coliformes termotolerantes por 100 mililitros. Além disso, nem se fosse de classe 3 poderia estar ocorrendo o descarte, visto que o limite é 2 500 coliformes termotolerantes /100 mililitros. Isso indica que melhorias no tratamento desse efluente devem ser implementadas, na intenção da diminuição da carga microbiana e adequação à legislação.

Uma vez que o tratamento do efluente do abatedouro não está sendo eficiente, o seu descarte contínuo tende a aumentar o número de coliformes do córrego, servindo como um meio de disseminação de doenças transmitidas pela água (DTA). Segundo a OMS, DTA são adquiridas por meio da ingestão direta da água contaminada com microrganismo patogênico, ou transmitidas através do contato direto com a essa água e atividade rotineiras, além das

doenças que podem ser adquiridas por terem seus vetores com parte do ciclo de vida desenvolvido no ambiente aquático.

Tendo em vista que o efluente final ainda apresenta coliformes, é interessante que o abatedouro implemente diferentes tecnologias de tratamento de água além das já preconizadas. No estudo de MEIRAMKULOVA *et al.*, (2021), foi possível observar que ao ser incluso no tratamento de um abatedouro de aves as tecnologias de Eletroquímica associada com radiação UV foi obtido eliminação de 100% dos microrganismos. Quando feitos separadamente, *E. coli* não era eliminada, apenas diminuía a presença desta. Portanto, essas tecnologias físicas que afetam diretamente a estrutura celular bacteriana e por isso promovem sua morte, atreladas aos tratamentos químicos e biológicos podem ser sugeridas aos abatedouros, sempre atrelando com a realidade do local.

4.2 Coleta e Identificação das *Escherichia coli*

Foram isoladas e identificadas 218 bactérias Gram-negativas a partir das amostras obtidas na avaliação presuntiva. Verificou-se que 34,8% (76/218) eram *Escherichia coli*, sendo 31,6% (24/76) provenientes da entrada do abatedouro (P1), 19,7% (15/76) do tanque de equalização (P2), 19,7% (15/76) da estação de tratamento (P3) e 29% (22/76) da saída do abatedouro para o rio (P4).

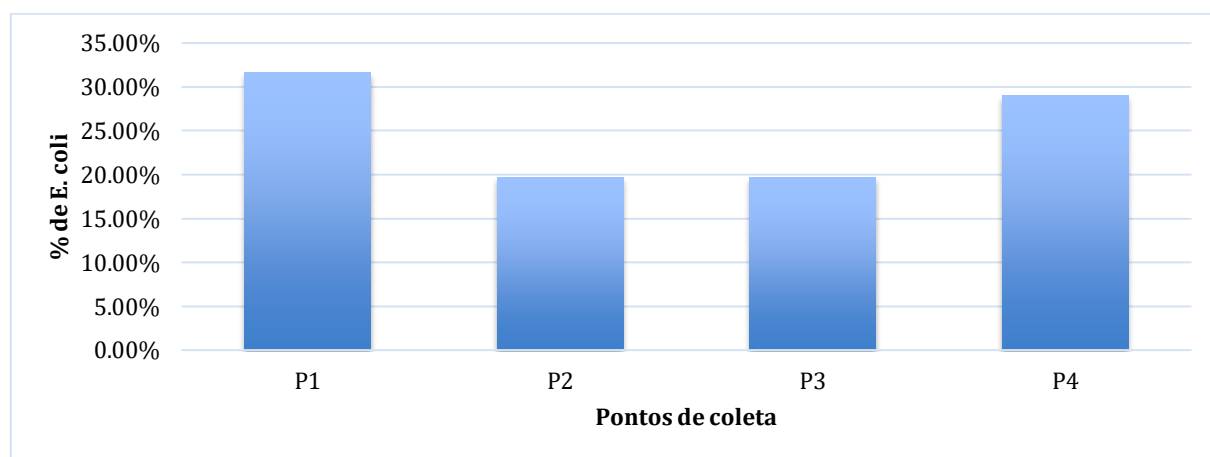


Figura 9. Porcentagem de *Escherichia coli* nos diferentes pontos de coleta.

4.3 Análise do perfil de Resistência aos Antimicrobianos

Como podemos observar na Figura 10, Ampicilina encontra-se sendo o antibiótico menos eficaz com 57,4% (27/47) dos isolados apresentando resistência, como já esperado visto que *Escherichia coli* apresenta resistência intrinsecamente a este antibiótico (BrCast, 2021) e é

um dos beta-lactâmicos mais largamente utilizados na produção animal há anos, com estudos apresentando resistência em aves de abatedouro e granjas (Phiri *et al.*, 2020); (Mgaya *et al.*, 2021). Nenhum isolado apresentou resistência ao carbapenêmico meropenem, apresentando-se como o antimicrobiano mais eficaz (Figura 10). Este dado não é uma surpresa, visto que não são medicamentos usualmente utilizados em produção animal e até mesmo em humanos devem ser administrados como última alternativa (Kock *et al.*, 2018). Desde de 2014 a ONU proibiu o uso de carbapenêmicos em animais de produção, o que contribui para este resultado que vai de acordo também com o que os estudos atuais encontraram (Homeier-Bachmann *et al.*, 2021; Savin *et al.*, 2021).

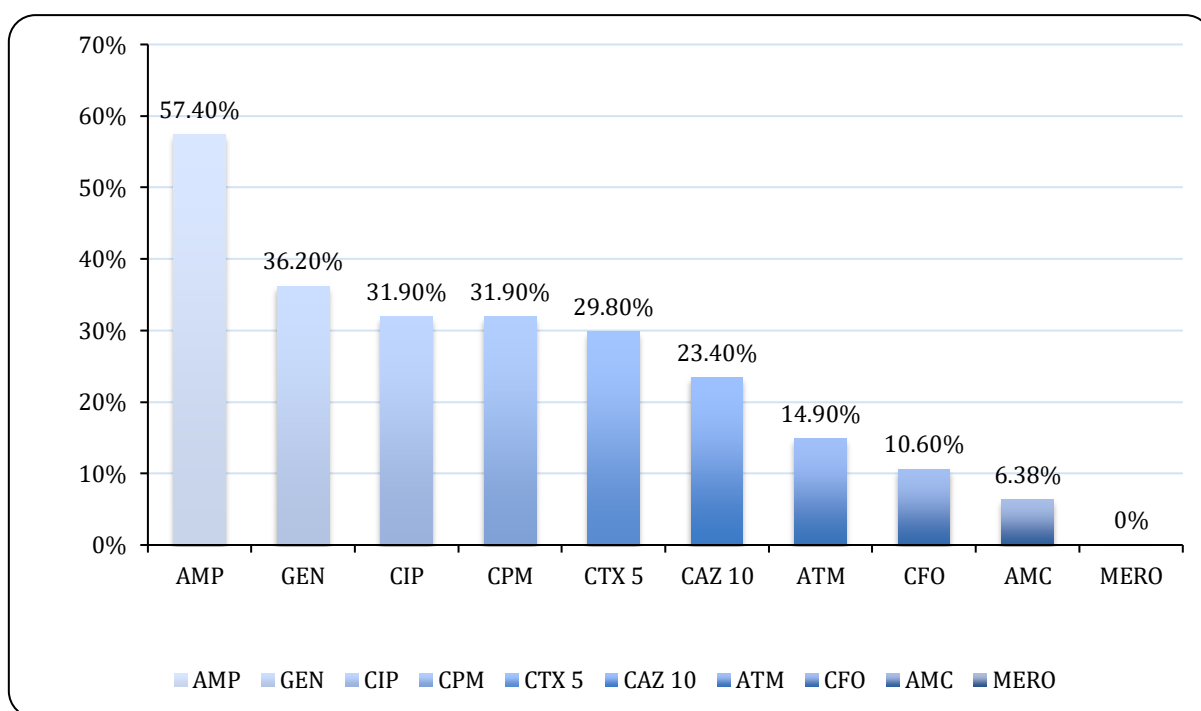


Figura 10. Porcentagem de resistência encontrada para cada antibiótico dentre os isolados resistentes.

Legenda: AMC - Amoxicilina + ac. clavulânico (20/10 µg); AMP - ampicilina (10 µg); ATM - Aztreonam (30 µg); CPM - Cefepime (30 µg); CTX5 - Cefotaxima (5 µg); CFO - Cefoxitina (30 µg); CAZ10 - Ceftazidima (10 µ); GEN- Gentamicina (10 µ); CIP – Ciprofloxacino (10 µ); MERO – Meropenem (10 µ).

Dentre as cepas de *Escherichia coli* estudadas 61,8% (47/76) apresentaram resistência a pelo menos um antibiótico, sendo dentre estas 6,38% (3/47) consideradas multidroga-resistentes (MDR), ou seja, apresentaram resistência a pelo menos 3 classes diferentes de antimicrobianos, neste caso, aminoglicosídeos (gentamicina), quinolonas (ciprofloxacino) e os beta-lactâmicos (Tabela 2). Esse achado corrobora com a literatura, onde *Escherichia coli* MDR já foi comumente encontrada em águas residuais de abatedouro aviário (Homeier-Bachmann *et*

al., 2021); Savin *et al.*, 2021). Achados como este são um alerta para a saúde pública já que segundo O’Neil (2016), estima-se que, se nenhuma ação for tomada, o mundo poderá atingir uma taxa anual de 10 milhões de mortes até 2050 devido a infecções por bactérias multirresistentes.

Em relação aos diferentes pontos de coleta (Figura 11), observa-se que o P1 (entrada) apresenta menor diversidade de resistência a antibióticos quando comparado ao que sai (P4), indicando que ao fim do processo a água tratada que retorna ao rio possui uma carga de resistência microbiana maior. Assim, como foi possível observar com os resultados de NMP, aqui também se consegue notar que o tratamento predominantemente utilizado no mundo, que neste caso é uma combinação muito usual, conhecido como sistema australiano, onde ocorrem processos químicos e biológicos na estação de tratamento e segue por lagoas de estabilização (anaeróbias e aeróbias) (Bogéa *et al.*, 2022), não estão sendo suficientes no que tange o controle de coliformes termotolerantes e consequentemente permitindo a disseminação de *Escherichia coli* resistentes para o meio ambiente. Nos estudos de Homier-Bauchman *et al.* (2021) e Savin *et al.* (2021) os dados são similares, onde mesmo o abatedouro possuindo uma estação de tratamento, a água permanece sendo um veículo de disseminação de resistência antimicrobiana a diferentes classes. No Paraná, Conte *et al.*, (2017) reforça esse déficit do tratamento de água quanto a resistência antimicrobiana quando relata a presença de bactérias gram-negativas resistentes em diferentes etapas de uma estação de tratamento.

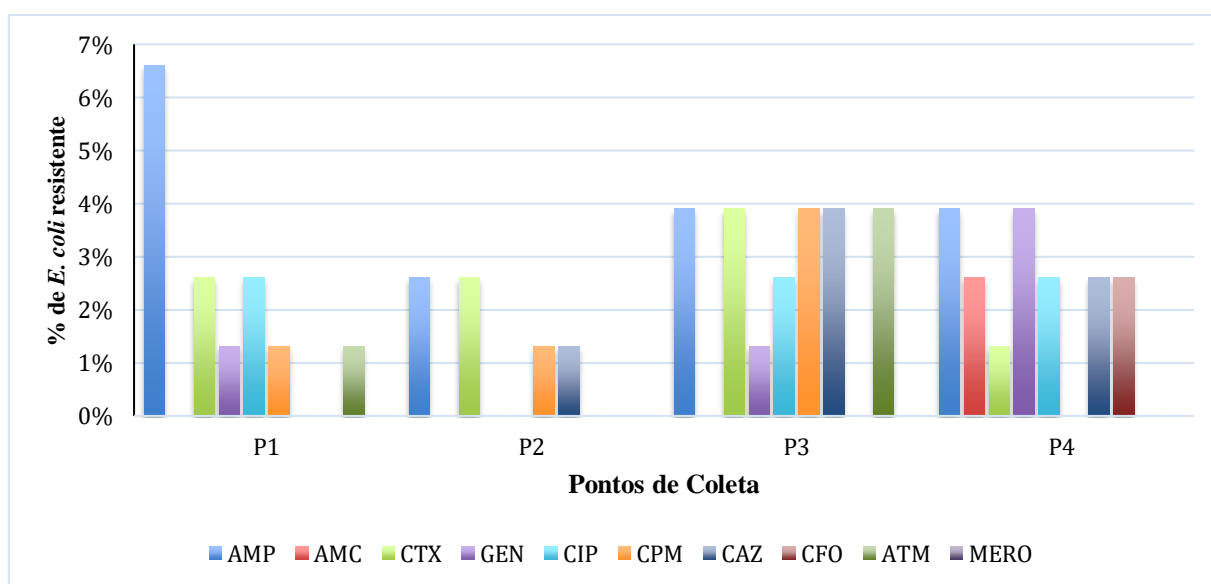


Figura 11. Porcentagem de *Escherichia coli* resistentes a cada antibiótico testado nos diferentes pontos de coleta.

Legenda: AMC - Amoxicilina + ac. clavulânico (20/10 µg); AMP - ampicilina (10 µg); ATM - Aztreonam (30 µg); CPM - Cefepime (30 µg); CTX5 - Cefotaxima (5 µg); CFO - Cefoxitina (30 µg); CAZ10 - Ceftazidima (10 µ); GEN- Gentamicina (10 µ); CIP – Ciprofloxacino (10 µ); MERO – Meropenem (10 µ).

4.4 Avaliação fenogenotípica de *Escherichia coli* produtoras de ESBL e AmpC

Entre os isolados de *Escherichia coli* analisados, uma proporção de 19,7% (15/76) apresentou resistência ou um halo de inibição intermediário em relação à cefotaxima ou ceftazidima durante a leitura interpretativa do antibiograma, indicando a possível produção de beta-lactamase. Todos os isolados foram submetidos aos testes confirmatórios fenotípicos para produção de beta-lactamase, nos quais 10,5% (8/76) foram positivos para o Teste de Sensibilidade de Duplo Disco (TSDD) (Figura 12), 11,8% (9/76) para o Teste de Aproximação com Ceftazidima/Ceftazidima + Ácido Clavulânico (CAZ/CZC) e 15,8% (12/76) para o Teste de Aproximação com Cefotaxima/Cefotaxima + Ácido Clavulânico (CTX/CTC). Houve somente 3 isolados que positivaram nos três testes confirmatórios. (Tabela 2)

Tabela 2. Resultado feno-genotípico.

ISOLADO	ORIGEM	FENÓTIPO	TSDD	CAZ/CZC	CTZ/CTC	GENES	ENZIMA
226	Entrada	AMP - CPM - CAZ - ATM	-	+	+	Nenhum	ESBL
72	Entrada	AMP - CFO	-	-	-	<i>bla</i> _{CTX-M-1}	ESBL e AmpC
168	Entrada	CTX	-	-	-	<i>bla</i> _{CMY-2-like}	ESBL e AmpC
13	Entrada	AMP	-	-	-	<i>bla</i> _{CTX-M-1}	ESBL
162	Entrada	GEN	-	-	-	<i>bla</i> _{CMY-2-like}	AmpC
165	Entrada	Nenhum	-	-	-	<i>bla</i> _{CMY-2-like}	AmpC
184	Entrada	Nenhum	-	-	-	<i>bla</i> _{CMY-2-like}	AmpC
61	Entrada	Nenhum	-	-	+	<i>bla</i> _{CTX-M-1}	ESBL
63	Entrada	Nenhum	-	-	-	<i>bla</i> _{CTX-M-1}	ESBL
204	Entrada	Nenhum	-	-	-	<i>bla</i> _{CTX-M-1}	ESBL
80	Tanque	AMP - CPM - ATM - GEN - CIP - CAZ*	-	-	+	Nenhum	ESBL
120	Tanque	AMP - CPM - CAZ - GEN	+	+	+	<i>bla</i> _{CTX-M-1}	ESBL
25	Tanque	AMP - CPM - CTX - ATM*	+	-	+	Nenhum	ESBL
173	Tanque	AMP - GEN	-	-	-	<i>bla</i> _{CMY-2-like}	ESBL e AmpC
95	Tanque	Nenhum	-	-	-	<i>bla</i> _{CMY-2-like}	AmpC
236	Estação	AMP - CPM - CAZ - CTX - ATM - GEN - CIP	+	+	+	<i>bla</i> _{CTX-M-1} <i>bla</i> _{CMY-2-like}	ESBL e AmpC
237	Estação	AMP - AMC - CAZ - CTX - CFO - GEN - CIP	-	-	-	<i>bla</i> _{CTX-M-1} <i>bla</i> _{CMY-2-like}	ESBL e AmpC
51	Estação	AMP - CPM - CAZ - CTX - ATM - CIP	+	+	+	<i>bla</i> _{CTX-M-1}	ESBL
257	Estação	AMP - CPM - CTX - CAZ - ATM	+	+	+	Nenhum	ESBL
176	Estação	AMP	-	-	-	<i>bla</i> _{CTX-M-1}	ESBL
193	Estação	Nenhum	-	-	-	<i>bla</i> _{CMY-2-like}	AmpC
178	Saída	AMP - AMC - CAZ - CTX - ATM - CFO - GEN	-	-	-	<i>bla</i> _{CMY-2-like}	ESBL e AmpC
104	Saída	CPM - CAZ - CTX - CIP - ATM*	-	+	+	Nenhum	ESBL
235	Saída	AMP - CPM - CTX - CAZ* - ATM*	+	-	-	<i>bla</i> _{CTX-M-1} <i>bla</i> _{CMY-2-like}	ESBL e AmpC
223	Saída	AMP - CPM - CTX - CIP - ATM*	+	-	-	Nenhum	ESBL

126	Saída	AMP - CPM - CTX – CIP	-	+	+	Nenhum	ESBL
146	Saída	CPM - CAZ - CFO - ATM	+	-	-	Nenhum	ESBL e AmpC
258	Saída	AMP - AMC - CFO - GEN	-	-	-	<i>bla</i> _{CTX-M-1}	ESBL e AmpC
85	Saída	GEN	-	-	+	<i>bla</i> _{CTX-M-1}	ESBL
159	Saída	CIP	-	-	-	<i>bla</i> _{CMY-2-like}	AmpC
84	Saída	Nenhum	-	+	+	<i>bla</i> _{CTX-M-1}	ESBL
62	Saída	Nenhum	-	+	-	<i>bla</i> _{CTX-M-1}	ESBL
145	Saída	Nenhum	-	-	-	<i>bla</i> _{CMY-2-like}	AmpC

Legenda: AMC - Amoxicilina + ac. clavulânico (20/10 µg); AMP - ampicilina (10 µg); ATM - Aztreonam (30 µg); CPM - Cefepime (30 µg); CTX - Cefotaxima (5 µg); CFO - Cefoxitina (30 µg); CAZ - Ceftazidima (10 µ); GEN- Gentamicina (10 µ); CIP – Ciprofloxacino (10 µ); MERO – Meropenem (10 µ).

Em verde estão os beta-lactâmicos em rosa macrolídeo e em azul fluoroquinolona..

Em vermelho os 3 isolados MDR.

Quando comparados os resultados da triagem com os de cada teste confirmatório, constatou-se que todos os isolados que apresentaram positividade no TSDD já haviam demonstrado o fenótipo de resistência comum para beta-lactamase de espectro estendido (ESBL). Enquanto no teste CAZ/CZC 77,7% (7/9) e no CTX/CTC 75% (9/12) apresentaram congruência com a triagem.

Quanto a detecção de beta-lactamase do tipo AmpC, somente 6,6% (5/76) isolados apresentaram resistência a cefoxitina, algo já esperado uma vez que a produção natural de AmpC por *Escherichia coli* é particularmente feita por promotores e atenuadores enzimáticos fracos, ou seja, a produção da enzima acaba sendo em uma quantidade baixa, não atingindo um valor suficiente de enzimas que permita a demonstração fenotípica da característica de resistência dos isolados produtores de AmpC. Dentre estes isolados, 60% (3/5) indicaram fenotipicamente uma possível co-produção de resistência associada a ESBL (Tabela 2)



Figura 12. Placa de antibiograma demonstrando um perfil fenotípico de uma ESBL. Seta demonstrando a deformação de halo característica de uma ESBL.

Fonte: Acervo pessoal.

Tratando-se dos dados genotípicos, dentre os 76 isolados, 21% (16/76) positivaram para o gene *bla*_{CTX-M-1}, e 17,1% (13/76) para o gene *bla*_{CMY-2-like}, onde 6,5% (5/76) apresentaram co-produção do gene. Ao se comparar esses dados com o fenotípico, percebe-se que 68,7% (11/16) possuíam o gene *bla*_{CTX-M-1} mas não apresentaram fenótipo de ESBL e 84,6% (11/13) apresentaram o gene *bla*_{CMY-2-like} sem apresentar resistência a cefoxitina (Tabela 2). Segundo Stokes, *et al.*, 2015 isto pode ocorrer pois em ainda que teste fenotípicos indiquem a presença de ESBL, a multiplicidade de beta-lactamases presentes compromete a eficiência desses resultados, sendo interessante identificar e distinguir as enzimas produzidas pelos seus subtipos em nível molecular. Portanto, embora os testes fenotípicos sejam essenciais para identificar os

genes expressos pelos isolados resistentes, a frequência de produção de ESBL pode ser facilmente subestimada se não houver um estudo genotípico sequencial.



Figura 13. Eletroforese em gel do gene *bla_{CTX-M-1}*.

Legenda: do 1 ao 4 são amostras, CP – controle positivo, B – branco.

Fonte: Acervo pessoal.

Quanto a relevância dos genes detectados, segundo um estudo feito por Pavez *et al.* (2019), o gene *bla_{CTX-M-1}* não apenas foi o mais encontrado, como também obteve altas taxas de co-produção em abatedouro de frangos e Savin *et al.* (2020) relatou que este gene esteve presente em 79,1% de seus isolados, tornando-se um dos determinantes de resistência mais abundantes em *E. coli* produtora de ESBL. Li *et al.*, (2019) também demonstrou em seu trabalho que os genes de resistência a antibióticos têm diferentes eficiências de transferência, os genes do grupo *bla_{CTX-M}* apresentaram uma taxa de 100% de transferência ligada em todos os transconjugantes. Assim, é possível perceber o alto potencial de transferência genética deste gene de resistência.

Os genes *bla_{CMY}* são comumente relatados no varejo de carne de frango no Brasil (Botelho *et al.*, 2015). Na Europa, *bla_{CMY-2}* é o gene pAmpC mais prevalente e no Brasil genes *bla_{CMY-2-like}* foram os primeiros genes de pAmpC a serem relatados (Liebana *et al.*, 2013). Ou seja, a detecção deste grupo de genes é extremamente associada a cadeia de produção avícola e preocupante já que são correlacionados a elementos genéticos móveis facilmente transferíveis por inserções plasmidiais. Além disso, genes do tipo *bla_{CMY}* são associado aos antimicrobianos criticamente importantes para os seres humanos e normalmente são capazes de promover a co-produção de outros genes de resistência, até mesmo de outras classes (Savin *et al.*, 2020). Assim, é importante que em estudos futuros sejam aplicados com metodologias moleculares mais profundas, como sequenciamento e MLST para maior precisão dos dados.

Dentre os isolados que apresentaram fenótipo correspondente ao de ESBL, 50% (8/16) não possuíam o gene *bla*_{CTX-M-1}. Quanto ao gene *bla*_{CMY-2-like}, o mesmo ocorreu para 60% (3/5) dos isolados. Isto pode ocorrer pois neste estudo utilizamos somente um gene de resistência associado a cada grupo enzimática aqui abordado, é possível que estes isolados possuam outro gene associado a este tipo de resistência apresentada fenotipicamente.

Cabe destacar o isolado 146, que apesar de não ter apresentado nenhum dos genes pesquisados, seu perfil de resistência poderia ser associação ou a uma co-produção de AmpC e ESBL, ou a presença de uma AmpC de Espectro Estendido (ESAC) onde a enzima através de mutações torna-se capaz de hidrolisar cefepime, algo que não ocorre em produtoras naturais de AmpC (Santiago, 2017), ressaltando a importância de se aprofundar esses achados em testes moleculares futuramente.

A contaminação por patógenos em ambientes aquáticos é um problema sério e ainda hoje com pouca visibilidade (Khan *et al.*, 2018). Corpos d'água possuem disseminadores de microrganismos e genes de resistência bacterianos que podem afetar tanto humanos quanto animais, servindo como via de introdução desses genes nos ecossistemas, alterando a população microbiana ambiental (Barrios *et al.*, 2015). Ambientes aquáticos, principalmente composto por águas residuais, procedentes das atividades antrópicas como criação ou abate de animais, possui maior eficiência na seleção de populações bacterianas resistentes (Hobson *et al.*, 202), bem como na troca e obtenção de genes já que possui uma grande diversidade de espécies no mesmo local (Garner *et al.*, 2017). Sabendo-se disso, a água sem o devido tratamento, é um dos principais veículos de transmissão de microrganismos causadores de doenças e genes de resistência.

Assim, pode-se dizer que água residual de abatedouros torna-se uma ameaça à saúde compartilhada por pessoas e animais, além de representarem risco em potencial ao meio ambiente, sendo portanto um problema relacionado à Saúde Única ou “One Health”, que segundo o painel de especialistas formado por profissionais da Organização Mundial de Saúde (OMS), Organização Mundial da Saúde Animal (OIE), Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) e do Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente (UNEP) a saúde de seres humanos, animais domésticos e selvagens, plantas e ambientes são intimamente ligados e interdependentes, trazendo a necessidade de se visualizar todos esses âmbitos de forma única. Portanto, a OMS define este conceito como uma abordagem para elaboração e implementação de programas, políticas, legislações e pesquisas com comunicação

entre múltiplas áreas e setores que trabalham de forma integrada a fim de alcançar melhores resultados na saúde pública (WHO, 2017).

5 CONCLUSÃO

A partir dos resultados apresentados, foi possível observar que mesmo o local seguindo o modelo padrão de tratamento de efluentes para abatedouros, a água a ser devolvida ao rio não está adequada, com altos índices apresentados no NMP para coliformes totais e termotolerantes como também com a presença de *Escherichia coli* resistentes a mais de 3 classes de antimicrobianos, produtoras de ESBL e AmpC.

Sendo assim, fazer o levantamento epidemiológico deste abatedouro é uma forma de mostrar a necessidade do monitoramento rotineiro das concentrações dos principais parâmetros que caracterizam estes efluentes e buscar novas tecnologias que possam ser mescladas com as já utilizadas, sempre adequando-se a realidade do abatedouro.

Cabe ressaltar que atualmente, no Brasil, são escassos trabalhos que abordem sobre presença de microrganismos resistentes sendo disseminados ou sobre seus genes de resistência em efluentes de abatedouros, estudos desse tipo estão sempre sendo relacionados a águas superficiais, estações de tratamento de afluentes e resíduos de perímetro urbano e hospitalares. Isto ocorre também pois as legislações vigentes não englobam outros microrganismos de relevância clínica, muito menos genes de resistência, portanto é importante que mais estudos como estes sejam publicados para alertar aos órgãos responsáveis a necessidade de se ampliar e atualizar as metodologias de avaliação da qualidade da água. Deste modo, o presente trabalho possibilita entender o impacto desses estabelecimentos de produção como contribuintes para o fenômeno da resistência antimicrobiana no modelo One Health, atingindo diferentes ecossistemas e afetando consequentemente a saúde humana e animal

6 REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS E SANEAMENTO BÁSICO (ANA). Base Nacional de Usos da Água e as Resoluções ANA nº 92 e nº 93/2021. **Boletim do SNIRH**, 2022. Disponível em: <https://www.snirh.gov.br/>. Acessado em: 30 de maio de 2023.
- AMBLER, R. P. The structure of β -lactamases. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences**, v. 289, n. 1036, p. 321-331, 1980.
- ANDRADE L. N. & DARINI A. L. C. Bacilos gram-negativos produtores de beta-lactamases: que bla bla bla é esse? **Journal Infection Control**, v. 6, n. 1, p. 16-25, 2017.
- APHA; AWWA; WEF. Quality assurance/quality control. In: _____. Standard methods for the examination of water and wastewater: online. Washington, DC, c2017. Part 9020. **Approved by Standard Methods Committee**, 2015.
- ASLAN, A.; COLE, Z.; BHATTACHARYA, A.; OYIBO, O. Presence of antibiotic-resistant *Escherichia coli* in wastewater treatment plant effluents utilized as water reuse for irrigation. **Water**, v. 10, 2018.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL (ABPA), **Relatório Anual 2023**. Disponível em: <https://abpa-br.org/noticias/abpa-lanca-seu-relatorio-anual-2023/>. Acesso em: 23 de Maio de 2023.
- BARRIOS, R. L. A.; SIERRA, C. A. S.; MORALES, J. D. C. J. 2015. Bacterias resistentes a antibióticos en ecosistemas acuáticos. **Producción + Limpia**, v.10, n.2, p. 160-172, 2015.
- BEZERRA, W. G. A.; HORN, R. H.; SILVA, I. N. G.; TEIXEIRA, R. S C.; LOPES, E. S. ALBUQUERQUER, Á. H.; CARDOSO, W. C. Antibióticos no setor avícola: uma revisão sobre a resistência microbiana. **Archivos de Zootecnia**, v. 66, n. 254, p. 301-307, 2017.
- BLAAK, H.; VAN HOEK, A. H. A. M.; HAMIDJAJA, R. A.; VAN DER PLAATS, R. Q. J.; KERKHOF-DE HEER L.; HUSMAN, A. M. R.; SCHETS, F. M. Distribution, Numbers, and Diversity of ESBL-Producing *E. coli* in the Poultry Farm Environment. **PLoS One**, v. 10, e. 0135402, 2015.
- BOGÉA, N. S.; BRAGA, R. M. Q. L.; ANDRADE, M. Á. Avaliação dos parâmetros físico-químicos de uma estação de tratamento de efluentes de um abatedouro frigorífico em São Luís – MA. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 9, p. e50511932056, 2022.
- BONNET, R. Growing Group of Extended-Spectrum β -Lactamases: The CTX-M Enzymes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 1, p. 1-14, 2004.
- BOTELHO, L. A. B., KRAYCHETE, G. B.; COSTA E SILVA, J. L.; REGIS, D. V. V.; PICÃO, R. C.; MOREIRA, B. M.; BONELLI, R. R. Widespread distribution of CTX-M and plasmid-mediated AmpC β -lactamases in *Escherichia coli* from Brazilian chicken meat. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 2, p.249–54, 2015.

BRADFORD, P. A. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: Characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 4, p. 933-51, 2001.

BRASIL, Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA). **Instrução Normativa SDA nº 42, de 20 dezembro de 1999**. Alterar o Plano Nacional do Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal - PNCR e os Programas de Controle de Resíduos em Carne - PCRC, Mel - PCRM, Leite - PCRL e Pescado – PCR. Diário Oficial da União: República Federativa do Brasil -Imprensa Nacional, 21 de dezembro de 1999.

BRASIL, Ministério Da Agricultura E Pecuária (MAPA). **Instrução Normativa GM nº 26, de 9 de julho de 2009**. Aprovar O Regulamento Técnico Para A Fabricação, O Controle De Qualidade, A Comercialização E O Emprego De Produtos Antimicrobianos De Uso Veterinário, na forma dos Anexos a presente Instrução Normativa. Diário Oficial da União: República Federativa do Brasil - Imprensa Nacional, 10 jul. 2009.

BRASIL, Ministério Da Agricultura E Pecuária (MAPA). **Instrução Normativa SDA nº 14, de 17 de maio de 2012**. Proibir em todo o território nacional a importação, fabricação e o uso das substâncias antimicrobianas espiramicina e eritromicina com finalidade de aditivo zootécnico melhorador de desempenho na alimentação animal. Diário Oficial da União: República Federativa do Brasil - Imprensa Nacional, 18 maio 2012.

BRASIL, Ministério Da Agricultura E Pecuária (MAPA). **Instrução Normativa GM nº 45, de 22 de dezembro de 2016**. Proibir, em todo o território nacional, a importação e a fabricação da substância antimicrobiana sulfato de colistina, com a finalidade de aditivo zootécnico melhorador de desempenho na alimentação animal, na forma desta Instrução Normativa. Diário Oficial da União: República Federativa do Brasil - Imprensa Nacional, 30 nov. 2016.

BRASIL, Ministério Da Agricultura E Pecuária (MAPA). **Portaria nº 171, de 13 de dezembro de 2018**. Informa sobre a intensão de proibição de uso de antimicrobianos com a finalidade de aditivos melhoradores de desempenho de alimentos e abre prazo manifestação. Diário Oficial da União, 19 dez. 2018.

BRASIL, Ministério Da Agricultura E Pecuária (MAPA). **Instrução Normativa SDA nº 1, de 13 de janeiro de 2020**. Proibir, em todo território nacional, a importação, a fabricação, a comercialização e o uso de aditivos melhoradores de desempenho que contenham os antimicrobianos tilosina, lincomicina, e tiamulina, classificados como importantes na medicina humana, na forma desta Instrução Normativa. Diário Oficial da União: República Federativa do Brasil - Imprensa Nacional, p. 6, 23 jan. 2020.

BRASIL, Ministério Da Agricultura E Pecuária (MAPA). **Portaria SDA nº 210, de 10 de novembro de 1998**. Aprovar o Regulamento Técnico da Inspeção Tecnológica e Higiênico Sanitária de Carne de Aves. Diário Oficial da União: República Federativa do Brasil - Imprensa Nacional, 11 nov. 1998.

BRASIL, Ministério da Saúde (MS). **Plano de Ação Nacional de Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos no Âmbito da Saúde Única 2018-2022 (PAN-BR)**. Brasília, 2019. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/plano_prevencao_resistencia_antimicrobianos.pdf

Acesso em 20 de Maio de 2023.

BRASIL, Ministério Da Saúde (MS). **Portaria GM/MS nº 888, de 4 de maio de 2021.** Procedimentos De Controle E De Vigilância Da Qualidade Da Água Para Consumo Humano E Seu Padrão De Potabilidade. [S. l.], 7 maio 2021.

BRASIL, Ministério Do Meio Ambiente. **Portaria CONAMA nº 430, de 13 de maio de 2011.** Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução nº 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA. Diário Oficial da União: República Federativa do Brasil - Imprensa Nacional, 16 maio 2011.

BRASIL, Ministério Do Meio Ambiente. **Portaria CONAMA nº 357, de 17 de março de 2005.** Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Diário Oficial da União: República Federativa do Brasil - Imprensa Nacional, 18 mar. 2005.

BRASIL, Ministério Do Meio Ambiente. **Resolução CONAMA nº 274, de 29 de novembro de 2000.** Classifica as águas doces, salobras e salinas e determina os limites e categorias de balneabilidade. Diário Oficial da União: República Federativa do Brasil - Imprensa Nacional, 8 jan. 2001.

BRAZILIAN COMMITTEE FOR ANTIMICROBIAL SENSITIVITY TESTS (BrCAST). 2017. **EUCAST Guidelines for the detection of specific resistance mechanisms and resistances of clinical and/or epidemiological importance.** Disponível em: <http://brcast.org.br/documentos/>. Acesso 19 de Janeiro de 2022.

BRAZILIAN COMMITTEE FOR ANTIMICROBIAL SENSITIVITY TESTS (BrCAST). 2022. **Tables of cut-off points for interpretation of CIMs and diameters of halos.** Disponível em: <http://brcast.org.br/documentos/>. Acesso 19 de Janeiro de 2022.

BRAZILIAN COMMITTEE FOR ANTIMICROBIAL SENSITIVITY TESTS (BrCAST). 2020. **Intrinsic Resistance and Rare Phenotypes.** Disponível em: <http://brcast.org.br/documentos/>. Acesso 19 de Janeiro de 2022.

BROWER, C. H.; MANDAL, S.; HAYER, S.; SCRAN, M.; ZEHRA, A.; PATEL, S. J.; KAUR, R.; CHATTERJEE, L.; MISHRA, S.; DAS, B. R.; SINGH, P.; SINGH, R.; GILL, J. P. S.; LAXMINARAYAN, R. The Prevalence of Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing Multidrug-Resistant *Escherichia coli* in Poultry Chickens and Variation According to Farming Practices in Punjab, India. **Environmental Health Perspectives**, v. 125, n. 7, 1-10, 2017.

BUSH, K.; JACOBY, G. A. Updated functional classification of β -lactamases. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 54, n. 3, p. 969-976, 2010.

CARVALHO, A. C. F. B.; CORTEZ, A. L. L.; SALOTTI, B. M.; BÜRGER, K. P.; VIDALMARTINS, A. M. C. Presença de microrganismos mesófilos, psicrótrópicos e coliformes em diferentes amostras de produtos avícolas. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, p. 303-307, 2005.

CARVALHO, F.; GEORGE, J.; SHEIKH, H. M. A.; SELVIN, R. Advances in screening, detection and enumeration of *Escherichia coli* using nanotechnology-based methods: a review. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 14, p. 829-846, 2018.

CIOCA, G.; MUNTEANU, F. D. Estimation of the amount of disposed antibiotics. Sustainability (Switzerland), v. 11, n. 6, p. 1–9, 2019.

CONTE, D.; PALMEIRO, J. K.; NOGUEIRA, K. S.; LIMA, T. M. R.; Marco André Cardoso 5, Roberto Pontarolo 6, Flávia Lada Degaut Pontes 7, Libera Maria Dalla-Costa 8 *et al.* Characterization of CTX-M enzymes, quinolone resistance determinants, and antimicrobial residues from hospital sewage, wastewater treatment plant, and river water. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 136, p. 62–69, 2017.

CORMIER A.; ZHANG, P.; CHALMERS, G.; WEESE, J. S.; DECKERT, A.; MULVEY, M.; MCALLISTER, T.; BOERLIN, P. 2019. Diversity of CTX-M-positive *Escherichia coli* recovered from animals in Canada. **Veterinary Microbiology**, v. 231, p. 71–75, 2019.

D'ANDREA, M. M.; NUCLEO, E.; LUZZARO, F.; GIANI, T.; MIGLIAVACCA, R.; VAILATI, F.; KROUMOVA, V.; PAGANI, L.; ROSSOLINI, G. M. CMY-16, a Novel Acquired AmpC-Type β -Lactamase of the CMY/LAT Lineage in Multifocal Monophyletic Isolates of *Proteus mirabilis* from Northern Italy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 2, p. 618–624, 2006.

DE MESQUITA SOUZA SARAIVA, M.; LIM, K.; MONTE, D. F. M.; GIVISIEZ, P. E. N.; KARIUKI, S.; JÚNIOR, A. B.; DE OLIVEIRA, C. J. B.; GEBREYES, W. A. Antimicrobial resistance in the globalized food chain: a One Health perspective applied to the poultry industry. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 56, p. 465-486, 2022.

De SÁ, M. F. **Dinâmica da população de coliformes após a aplicação de dejetos de suínos no solo e durante a sua compostagem automatizada**. 2012. 83 f. Dissertação (Mestrado em Ciência do solo) - Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul. 2012.

DE SILVA, K. C.; LINCOPAN, N. Epidemiologia das beta-lactamases de espectro estendido no Brasil: Impacto clínico e implicações para o agronegócio. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 48, n. 2, p. 91–99, 2012.

EMATER-RIO. RELATÓRIO DE PEQUENOS E MÉDIOS ANIMAIS ANO 2023. Anual. Disponível em: <https://emater.rj.gov.br/node/177>. Acesso em: 8 de fevereiro de 2023.

FERIA, C. Patterns and mechanisms of resistance to beta-lactams and beta-lactamase inhibitors in uropathogenic *Escherichia coli* isolated from dogs in Portugal. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 49, n. 1, p. 77–85, 2002.

FERREIRA, L.; FILHO, R. A. C. P.; ANDRADE, L. N.; JUNIOR, A. B.; DARINI, A. L. C. Avicultura Agroecológica: Estratégia de Diferenciação e Agregação de Valor para o Produtor Familiar. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 4, n. 14, p. 361-364, 2017.

GARNER, E.; BENITZ, R.; WAGONER, E.; SAWYER, R.; SCHABERG, E.; HESSION, W. C.; KROMETICS, L. H.; BADGLEY, B. D.; PRUDEN, A. Stormwater loadings of antibiotic resistance genes in an urban stream. **Water Research**, v. 123, p. 144-152, 2017.

GESER, N.; STEPHAN, R.; HÄCHLER, H. Occurrence and characteristics of extended-spectrum β -lactamase (ESBL) producing Enterobacteriaceae in food producing animals, minced meat and raw milk. **BMC Veterinary Research**, v. 8, n. i, 2012.

HOBSON, C.; CHAN, A. N.; WRIGHT, G. D. 2021. The Antibiotic Resistome: A Guide for the Discovery of Natural Products as Antimicrobial Agents. **Chemical Reviews**, v.121, p. 346, 2021.

GUIMARÃES, D.O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, p. 667-679, 2010.

HOMEIER-BACHMANN, T.; HEIDEN S. E.; LÜBCKE, P. K.; BACHMANN, L.; BOHNERT, J.A.; ZIMMERMANN, D.; SCHAUFLE, K. Antibiotic-Resistant Enterobacteriaceae in Wastewater of Abattoirs. **Antibiotics**, v.10, n.5, p.568, 2021.

HUOVINEN, S.; HUOVINEN, P.; JACOBY, G. A. Detection of Plasmid-Mediated 3-Lactamases with DNA Probes. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 32, n. 2, p. 175-179, 1988.

JACOBY, G. A. AmpC β -Lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, n. 1, p. 161–182, 2009.

KHAN, K.; LU, Y.; SAEED, M. A.; BILAL, H.; SHER, H., KHAN K., ALI, J.; WANG, P.; UWIZEYIMANA, H.; BANILA, Y.; LI, Q.; LIU, Z.; NAWAB, J.; ZHOU, Y.; SU, C.; LIANG, R. Prevalent fecal contamination in drinking water resources and potential health risks in Swat, Pakistan. **Journal of Environmental Sciences**, v. 72, p. 1-12, 2018.

KIPPER, D.; MASCITTI, A. K.; CARLI, S.; CARNEIRO, A. M.; STRECK, A. F.; FONSECA, A. S. K.; IKUTA, N.; LUNGE, V. R. Emergence, Dissemination and Antimicrobial Resistance of the Main Poultry-Associated Salmonella Serovars in Brazil. **Veterinary Sciences**, v. 9, n. 8, p. 405, 2022.

KÖCK, R.; DANIEL-HAARDT, I.; BECKER, K.; MELLMANN, K.; FRIEDRICH, A. W.; MEVIUZ, D.; SCHWARZ, S.; JURKE, A. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in wildlife, food-producing, and companion animals: a systematic review. **Clinical Microbiology and Infection**. v. 24, n. 12, p. 1241-1250, 2018.

KOGA, V. L.; MALUTA, R.P.; SILVEIRA, W. D.; RIBEIRO, R. A.; HUNGRIA, M.; VÉSPERO, E. C.; NAKAZATO, G.; KOBAYASHI, R. K. T. Characterization of CMY-2-type beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolated from chicken carcasses and human infection in a city of South Brazil. **BMC Microbiology**, v. 19, n. 174, 2019.

LI, Q.; CHANG, W.; ZHANG, H.; HU, D.; WANG, X. The role of plasmids in the multiple antibiotic resistance transfer in ESBLs-producing *Escherichia coli* isolated from wastewater treatment plants. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 2019.

LIEBANA, E.; CARATTOLI, A.; COQUE, T. M.; HASMAN, H.; MAGIORAKOS, A. P.; MEVIUS, D.; PEIXE, L.; POIREL, L.; SCHUEPBACH-REGULA, G.; TORKENE, K.; TORREN-EDO, J.; TORRES, C.; THRELFALL, J. Public health risks of enterobacterial isolates producing extended-spectrum β -lactamases or AmpC β -lactamases in food and food producing animals: an EU perspective of epidemiology, analytical methods, risk factors, and control options. **Clinical Infectious Diseases**, vol. 56, n. 7, p. 1030–1037, 2013.

LIVERMORE, D. M. β -lactamases in laboratory and clinical resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v.4, n.8, p.557-84. 1995.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. **Microbiologia de Brock**. 14. ed. Porto Alegre: ArtMed, 2016.

MARSHALL, B. M.; LEVY, S. B. Food animals and antimicrobials: Impacts on human health. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 4, p. 718–733, 2011.

MEIRAMKULOVA, K.; TEMIRBEKOVA, A.; SASPUGAYEVA, G.; KYDYRBEKOVA, A.; DEVRISHOY, D.; ZHANAR, T.; AUBAKIROVA, K. KOVALCHUK, N.; MEIRBEKOV, A.; MKILIMA, T. Performance of a combined treatment approach on the elimination of microbes from poultry slaughterhouse wastewater. **Sustainability (Switzerland)**, v. 13, n.6, P. 3467, 2021.

MELO, E. S.; AMORIM, W. R.; PINHEIRO, R. E. E.; CORRÊA, P. G. N.; CARVALHO, S. M. R.; SANTOS, A. R. S. S.; BARROS, D. S.; OLIVEIRA, E. T. A. C.; MENDES, C. A.; SOUSA, F. V. Doenças transmitidas por alimentos e principais agentes bacterianos envolvidos em surtos no Brasil: revisão. **PubVet**, v. 12, n. 10, p. 1-9, 2018.

MGAYA, F. X.; MATEE, M. I.; MUHAIRWA, A. P.; HOZA, A. S. Occurrence of multidrug resistant *escherichia coli* in raw meat and cloaca swabs in poultry processed in slaughter slabs in Dar Es Salaam, Tanzania. **Antibiotics**, v. 10, n. 4, p. 343, 2021.

MOHAMUDHA, P. R.; HARISH, B. N.; PARIJA, S. C. AmpC Beta-Lactamases Among Gram Negative Clinical Isolates from a Tertiary Hospital, South India. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 596-602, 2010.

NOGUEIRA, K. S. **Prevalência e caracterização molecular de beta-lactamases de espectro ampliado (ESBL) em enterobactérias isoladas no Hospital de Clínicas de Curitiba**. 2011. Tese (Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS (ONU). **Resolution A/RES/64/292. The right to water**. UN Committee on Economic, Social and Cultural Rights. 2010.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA A EDUCAÇÃO, A CIÊNCIA E A CULTURA (UNESCO). **Relatório Mundial das Nações Unidas sobre Desenvolvimento dos Recursos Hídricos**. 2021. Disponível em: https://unesdoc.unesco.org/ark:/48223/pf0000375751_por. Acesso em: 2 de Junho de 2023.

O'NEILL, J. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. 2016.

PARENTE, C. E. T.; AZEREDO, A.; VOLLÚ, R. E.; ZONTA, E.; AZEVEDO-SILVA, C. E.; BRITO, E. M. S.; SELDIN, L.; TORRES, J. P. M.; MEIRE, R. O.; MALM, O. Fluoroquinolones in agricultural soils: Multi-temporal variation and risks in Rio de Janeiro upland region. **Chemosphere**, vol. 219, p. 409–417, 2019.

PAVEZ, M.; TRONCOSO, C.; OSSES, I.; SALAZAR, R.; ILLESCA, V.; REYDET, P.; RODRÍGUEZ, C.; CHAHIN, C.; CONCHA, C.; BARRIENTOS, L. High prevalence of CTX-M-1 group in ESBL-producing enterobacteriaceae infection in intensive care units in southern Chile. **Brazilian Journal of Infectious Disease**, v. 23, n. 2, p. 102-110, 2019.

PHILIPPON, A.; LABIA, R.; JACOBY, G. Minireview Extended-Spectrum Beta-Lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 33, n. 8, p. 1131-6, 1989.

PIMENTA, R. L. **Avaliação da Resistência Antimicrobiana e da Virulência em Cepas Bacterianas Isoladas de Aves em Estabelecimentos de Corte e Postura no Estado do Rio de Janeiro**. 2018. Tese (Doutor em Ciências, Tecnologia, e Inovação em Agropecuária) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

PHIRI, N.; MAINDA, G.; MUKUMA, M.; ZINYANGWE, N. N.; BANDA, J. L.; KWENDA, G.; MUONGA, E. M.; FLAVIEN, B. N.; MWANSA, M.; YAMBA, K.; MUNYEME, M.; MUMA, J. B. Antibiotic-resistant Salmonella species and Escherichia coli in broiler chickens from 2 farms, abattoirs and open markets in selected districts of Zambia. **Journal of Epidemiological Research**, v. 6; n. 1; 2020.

PRÜSS-USTÜN, A.; WOLF, J.; BARTRAM, J.; CLASEN, T.; CUMMING, O.; FREEMAN, M. C.; GORDON, B.; HUNTER, P. R.; MEDLICOTT, K.; JOHNSTON, R. Burden of disease from inadequate water, sanitation and hygiene for selected adverse health outcomes: An updated analysis with a focus on low- and middle-income countries. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 222, n. 5, p. 765–777, 2019.

ROTH, N.; KASBOHRER, A.; MAYRHOFER, S.; ZITZ, U.; HOFACRE, C.; DOMIG, K. J. The application of antibiotics in broiler production and the resulting antibiotic resistance in Escherichia coli: A global overview. **Poultry Science Journal**, v. 98, n. 4, p. 1791–1804, 2019.

SAMPAIO, C. A. D. P.; IDE, G. M.; BATALHA, C. P.; PEREIRA, L. C.; BUENO, L. F. Análise técnica de água de fontes rurais. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 24, p. 213-217, 2019.

SANTIAGO, G. S. **Caracterização da Resistência Antimicrobiana e Estudo Fenogenotípico da Produção de Beta-lactamases em Enterobactérias Associadas à Etiologia da Mastite Bovina**. 2013. Dissertação (Mestre em Ciências) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

SANTIAGO, G. S. **Compreensão de Mecanismos Fenotípicos e Genotípicos Relacionados à Produção de B-Lactamases do Tipo AmpC em Enterobacteriaceae**. 2017. Tese (Doutora em Ciências) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

SANTIAGO, G.S.; COELHO, I. S.; FARIAS, B. O.; ALENCAR, T. A.; MOREIRA, A. B.; BRONZATO, G. F.; SOUZA, M. M. S.; CASTRO, B. G.; FERREIRA, H. N.; COELHO, S. M. O. Detection of mutations in ampC promoter/attenuator gene in *Escherichia coli* from dairy cows in Rio de Janeiro and Mato Grosso, Brazil. **African Journal of Microbiology Research**, v. 13, p. 388-391, 2019.

SANTIAGO, G.S.; MOTTA, C.C.; BRONZATO, G.F.; GONÇALVES, D.; DE SOUZA, M.M.S.; COELHO, I. S.; FERREIRA, H.N.; COELHO, S. M. O. Revisão: Produção de β -lactamases do Tipo AmpC em Enterobacteriaceae. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 38, p. 17-30, 2016.

SANTIAGO, G. S.; PASSARINI, J. F.; CERQUEIRA, J. A.; DA CUNHA, H. V. F. Avaliação da reutilização de cama de frango sobre a condenação de carcaças por colibacilose. **Pubvet**, v. 13, n. 8, p. 1–6, 2019.

SANTIAGO, G.S.; MOTTA, C. C.; , BRONZATO, G.F., GONÇALVES, D., de SOUZA, M.M.S., COELHO, I. S., FERREIRA, H. N.; COELHO, S. M. O. Produção de β -lactamases do Tipo AmpC em Enterobacteriaceae. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 38, n. 3, p. 17–30, 2016.

SAVIN, M.; BIERBAUM, G.; BLAU, K.; PARCINA, M.; SIB, E.; SMALLA, K.; SCHMITHAUSEN, R.; HEINEMANN, C.; HAMMERL, J. A.; KREYENSCHMIDT, J. Colistin-Resistant Enterobacteriaceae Isolated From Process Waters and Wastewater From German Poultry and Pig Slaughter houses. **Frontiers Microbiology**, v.11, n.575391. 2020.

SAVIN, M.; ALEXANDER, J.; BIERBAUM, G.; HAMMERL, J. A.; HEMBACH, N.; SCHWARTZ, T.; SCHMITHAUSEN, R.; SIB, E.; VOIGT, A.; KREYENSCHMIDT, J. Antibiotic-resistant bacteria, antibiotic resistance genes, and antibiotic residues in wastewater from a poultry slaughter house after conventional and advanced treatments. **Scientific Reports**, v.11, n.16622. 2021.

STOKES, A.; O'BRIEN, G.; BEAMAN, M. H. Extended spectrum beta-lactamase testing of community Enterobacteriaceae in the west of Australia: Poor performance of phenotypic methods. **Pathology**, v. 47, n. 2, p. 161–164, 2015.

UNITED NATIONS GENERAL ASSEMBLY. **Transforming our world: the 2030 Agenda for Sustainable Development**. New York, 2015.

VASCONCELOS, C. V. **Caracterização e tratamento do composto orgânico de resíduos urbanos de Belo Horizonte-MG para a utilização em ações de Agricultura Urbana**. 2019. 62 f. Dissertação (Mestrado em Agricultura orgânica) Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 2019

VOUNBA, P.; ARSENAULT, J.; BADA-ALAMBÉDJI, R.; FAIRBROTHER, J. M. Pathogenic potential and the role of clones and plasmids in beta-lactamase-producing *E. coli* from chicken faeces in Vietnam. **BMC Veterinary Research**, v. 15, n. 103, p. 1-13, 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Tripartite and UNEP support OHHLEP's definition of "One Health"**. 2021. Disponível em: <https://www.who.int/news/item/01-12-2021-tripartite-and-unep-support-ohhlep-s-definition-of-one-health>. Acesso em: 02 de Agosto de 2023.