

## BACTÉRIAS EMERGENTES NO ESGOTO HOSPITALAR, ANÁLISE DE RESISTÊNCIA A DESINFETANTES.

João Cairo Ferreira<sup>1\*</sup>; Michel Iuri Caetano<sup>2</sup>; Laura Lahr Lourenço da Silva<sup>3</sup>; Luciana Furlaneto-Maia<sup>4</sup>; Ajadir Fazolo<sup>5</sup>; Kátia Valéria Marques Cardoso Prates<sup>6</sup>

Resumo – Este trabalho tem como objetivo demonstrar a verificação mensurando a existência das bactérias que mais influenciam nas infecções hospitalares (*Pseudomonas aeruginosas*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter spp.*, *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*). Para o desenvolvimento do trabalho foram utilizados efluentes hospitalares, brutos e tratados, coletados e armazenados conforme norma brasileira (NBR) 9898. Após estes procedimentos os efluentes foram diluídos e semeados em meio Chromagar *orientation*, onde posteriormente as colônias foram identificadas, quantificadas e selecionadas. Foram confirmadas a presença das bactérias pesquisadas tanto no efluente hospitalar, quanto o misturado com o efluente sanitário e o efluente após o tratamento. Havendo o decréscimo em número de colônias de *Echerichia coli*, como esperado, porém havendo uma queda não tão significativa para outras colônias como de *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosas*, havendo um decréscimo baixo na quantidade de bactérias desta primeira e um crescimento aparente nesta segunda. O que demonstrou que esses microrganismos estão presentes em todos os efluentes, persistindo ao tratamento desenvolvido, além desta constatação as colônias isoladas foram testadas quanto a sua resistência em relação aos desinfetantes utilizados em unidades hospitalares. Indicando a necessidade de um maior controle, ao impacto da presença dessas bactérias nos corpos d'água, no ecossistema e a saúde pública.

**Palavras-Chave** – Bactérias patogênicas, qualidade sanitária em recursos hídricos, saúde pública

## EMERGING IN HOSPITAL SEWAGE BACTERIA, ANALYSIS OF RESISTANCE DISINFECTANT.

Abstract - This paper aims to prove the existence measuring the existence of bacteria that most influence on hospital infections (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter spp.*, *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*). For the development of this work were used hospital effluent, raw and treated. Collected and stored according to Brazilian Standard (NBR) 9898, after these procedures effluents were diluted and plated on medium Chromagar *orientation*, where later the colonies were identified, quantified and selected. We confirmed the presence of the bacteria studied both in hospital sewage, as toilet mixed with the effluent and the effluent after treatment. Having decrease in the number of *Escherichia coli* colonies, as expected, there is however not as significant a decrease for other colonies as *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*, with a decrease in the amount of bacteria down this first and this second apparent growth. What has demonstrated that these microorganisms are present in all effluent treatment developed persisting beyond this finding isolated colonies were tested for their resistance towards disinfectants used in hospitals. Indicating the need for greater control, the impact of the presence of these bacteria in water bodies in the ecosystem and public health.

**Keywords** - Pathogenic bacteria, sanitary quality in water resources, public health

<sup>1\*</sup> UTFPR - Londrina – Mestrando em Engenharia Ambiental: cairojoao@gmail.com.

<sup>2</sup> UTFPR – Londrina - Graduando em Engenharia Ambiental: mmic\_iuri@hotmail.com

<sup>3</sup> UTFPR – Londrina – Técnica do Laboratório de Microbiologia Ambiental: laura-lahr@hotmail.com

<sup>4,5,6</sup> UTFPR – Londrina – Professor do Programa de Pós Graduação em Engenharia Ambiental: lucianamaia@utfpr.edu.br<sup>4</sup>; afazolo@utfpr.edu.br<sup>5</sup>; kprates@utfpr.edu.br<sup>6</sup>.

## INTRODUÇÃO

O amplo uso da água pelos seres humanos nos dimensiona a descarga referente aos efluentes lançados nos corpos hídricos como um dos possíveis fatores de disseminação de microrganismos patogênicos. No Brasil os efluentes hospitalares podem ser despejados diretamente na rede coletora de esgotos sem tratamento prévio. A emergência da resistência microbiana está cada vez tornando-se um problema hídrico, pois a pressão seletiva dos antimicrobianos, pode ser apontado como um importante fator de seleção e disseminação desses microrganismos no meio ambiente.

O lançamento de esgotos hospitalares na rede de esgoto ou em corpos hídricos não deve afetar o equilíbrio ecológico aquático necessário para atender as necessidades da comunidade, devendo ser previamente tratado antes de sua disposição final para não causar impacto no corpo receptor. O Ministério da Saúde possui, desde 1994, uma norma para projetos físicos de estabelecimentos assistenciais de saúde - Portaria GM/MS1884/94, substituída recentemente pela Resolução ANVISA – RDC nº 050/02, que estabelece:

“Caso a região onde o Estabelecimento Assistencial de Saúde (EAS) estiver localizado tenha rede pública de coleta e tratamento de esgoto, todo o esgoto resultante desse pode ser lançado nessa rede sem qualquer tratamento. Não havendo rede de coleta e tratamento, todo esgoto terá que receber tratamento antes de ser lançado em rios, lagos, etc. (se for o caso).”

Portanto, o esgoto só receberá tratamento específico quando não houver sistemas de coleta e tratamento na região. Neste caso, a responsabilidade pela destinação final não deve estar concentrada apenas nos estabelecimentos assistenciais de saúde, mas principalmente sobre o município, já que a operação, manutenção e controle exigidos por um sistema de tratamento independente, dependerá de um controle técnico rigoroso com custos elevados, tornando esta solução impraticável por um único EAS mas viável quando adotada para a coletividade.

AUGUSTINHO et. Al (2004) demonstra que grandes centros urbanos concentram o maior número de estabelecimentos de saúde e elevado contingente populacional e geram aumento da quantidade de efluentes poluídos e contaminados não devidamente tratados, provocando diversas doenças. RESENDE (2010) considera que os efluentes líquidos hospitalares estão sendo classificados como esgotos domésticos, não exigindo tratamento especial, senão aquele que deve ser dado aos esgotos sanitários de qualquer comunidade. Porém este tratamento realizado juntamente com o efluente doméstico, não tem um monitoramento abrangente e eficaz em relação às bactérias patogênicas que mais influenciam nas infecções hospitalares no Brasil.

Sendo este monitoramento embasado somente nos organismos indicadores de contaminação fecal, que predominantemente não são patogênicos, mas que segundo VON SPERLING (2011) dão uma satisfatória indicação de quando uma água apresenta contaminação por fezes humanas ou de animais e, por conseguinte, da sua potencialidade para transmitir doenças. Que também cita que após o lançamento no corpo receptor ou no sistema de esgotos há ainda uma grande diluição no despejo contaminado.

O que nos direciona a necessidade de um monitoramento mais completo destas bactérias, é que margeia-se este levantamento, desenvolvido mediante a isolamento e identificação das bactérias de interesse *Pseudomonas aeruginosas*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter spp.*, *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*, e além desta constatação a resistência dessas bactérias aos desinfetantes usualmente utilizados nos hospitais brasileiros.

## MATERIAL E MÉTODOS

Para o desenvolvimento deste trabalho foram coletados efluentes em três pontos específicos, sendo o primeiro (Ponto A) em um hospital da região metropolitana de Londrina – PR, diretamente da última caixa séptica, visando com isso os efluentes hospitalares que serão dispensados na rede de esgoto da cidade. O segundo (Ponto B), na entrada do efluente sanitário na Estação de Tratamento de Esgoto – ETE que atende o hospital onde o efluente foi coletado anteriormente (efluente bruto). O último ponto de coleta (Ponto C), foi o da saída de efluentes da ETE, final do tratamento antes de ser lançado no corpo receptor (efluente tratado) Figura 1.



(a)



(b)



(c)

Legenda:

- (a) Caixa Séptica de um Hospital da Região Metropolitana de Londrina – Ponto A
- (b) Entrada de Efluentes na Estação de Tratamento de Esgoto – ETE da Metropolitana de Londrina – Ponto B
- (c) Saída de Efluentes na Estação de Tratamento de Esgoto – ETE da região Metropolitana de Londrina – Ponto C

Figura 1: Pontos de Coleta de Efluentes (Pontos A, B e C)

Os efluentes foram coletados utilizando-se um coletor de polietileno leitoso, previamente esterilizado fixado em haste extensível de cloreto de polivinila (PVC), e armazenados em frascos de polietileno leitoso estéreis de 500 ml em caixa térmica com gelo até o início do processamento das amostras em laboratório, conforme NBR 9898 de Junho de 1987.

De cada ponto, foram feitas diluições (até se alcançar a quinta diluição) seriadas em solução de NaCl (0,8%) das amostras em seguida, foram semeadas em triplicata 100 µL das diluições  $10^{-1}$ ,  $10^{-3}$  e  $10^{-5}$ , em Difco *CHROMagar Orientation* e incubadas por 24 horas a 35° C na ausência de luz. As bactérias que cresceram no meio foram quantificadas sendo realizada a contagem com número total de bactérias presentes em placa, sendo expresso em unidades formadoras de colônia por ml (UFC/ml) e posteriormente selecionadas seguindo o padrão de cores e aspecto para cada colônia de bactéria de interesse (Tabela 1).

Tabela 1: Aspecto e Coloração das Bactérias Estudadas em Chromagar Orientation

Bactéria	Cor em CHROMagar Orientation	Aspecto da Colônia
<i>Staphylococcus aureus</i>	Dourada (natural)	Pequenas, Cremosas
<i>Escherichia coli</i>	Púrpura com halo transparente	Grandes – Seca
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Azul Esverdeada	Grandes - Mucoide
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Verdes Claras	Grandes – Brilhantes
<i>Acinetobacter spp</i>	Branca Fosca	Pequenas

Fonte: Elaborada pelo autor (DIFCO)

Após análise do crescimento no meio por cor e aspecto, as colônias foram transferidas e isoladas em ágar Mac Conkey (incubadas por 24 horas a 35°C), para obtenção de culturas puras para posterior identificação por testes morfotintorial e bioquímicos como descrito nas Tabelas 2 e 3 (BROOKS *et. Al* (2009) – ANVISA (2010) – CLARK *et Al.* (2010))

Tabela 2 – Caracterização dos testes morfotintorial e bioquímicos para as bactérias Gram positivas estudadas.

Bactéria	Morfologia	Coagulase	Gram	Catalase	Manitol
<i>Staphylococcus aureus</i>	Cocos	+	+	+	+

Tabela 3 – Caracterização dos testes bioquímicos para as bactérias Gram negativas estudadas.

Bactéria	Morfologia	Gram	Cat.	H2S	Glicose	Sac./Lac	Citrato	Cetr.
<i>Acinetobacter spp</i>	Cocobacilar Cocos Diplococos	-	+	-	+	-	+	-
<i>Klebsiella pneumonia</i>	Bacilos Grandes	-	+	-	+	+	+	-
<i>Escherichia coli</i>	Bacilos	-	+	-	+	+	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Bacilos (cadeias curtas)	-	+	-	+	+	-	+

Legenda:

Gram: Coloração de Gram

Cat: Catalase

H2S: Formação de H2S

Glic: Fermentação de Glicose

Sac./Lac: Fermentação de Sacarose e/ou Glicose

Cetr: Crescimento em Ágar Cetrimide

Para verificação de sensibilidade a desinfetantes foram utilizadas os compostos e diluições destes produtos utilizadas no hospital estudado, (hipoclorito de sódio, cloreto de benzalcônio e ácido peracético/peróxido de hidrogênio) sempre respeitando-se as condições de armazenamento e validade dos produtos.

Cada linhagem bacteriana já diluída em solução salina estéril, foi destinada a suspensão constituída pela solução desinfetante (0,8mL) diluída de acordo com o fabricante em água estéril. Posteriormente, adicionou-se a suspensão bacteriana (1,2mL) e cronometrou-se os tempos 15", 30", 60" e 300" de exposição para então realizar o repique em caldo Brain Heart Infusion (BHI). A mistura foi incubada a 37°C durante 24 horas para observação da turvação do meio, formação de película na superfície ou de precipitado no fundo dos tubos, para confirmação da presença ou ausência do microrganismo testado frente aos diferentes antissépticos e tempo de exposição conforme COSTA *et Al.*(1998).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em todos os pontos de amostragem foram identificadas as bactérias em estudo, crescendo nas placas de petri. Analisando-se os resultados para diluição de  $10^{-5}$ , o número de UFC  $\text{ml}^{-1}$  observados contados e identificados foram de  $1,2 \times 10^7$ ,  $9 \times 10^6$  e  $7 \times 10^6$ , respectivamente para cada ponto A, B e C. Foi escolhido esta diluição de  $10^{-5}$  devido a um crescimento exacerbado para as outras diluições em alguns dos pontos estudados (Ponto A e B).

Este decréscimo evidente no decaimento bacteriano referentes aos Pontos A e B, vai de encontro ao apresentado por VON SPERLING (2011) onde apresenta que o sistema de tratamento desenvolvido, utilização de lagoa anaeróbia e lagoa facultativa que deveria ter uma efetividade de remoção de colônias bacterianas entre 80% e 99%, não tem acontecido.

Deve-se salientar que devido às características específicas do *chromagar orientation*, as colônias observadas estão dentro do escopo de estudo desta investigação, pois após identificadas e confirmadas as colônias bacterianas foram divididas em porcentagem de existência por espécie estudada, o que demonstra a porcentagem em relação ao total de bactérias existentes.

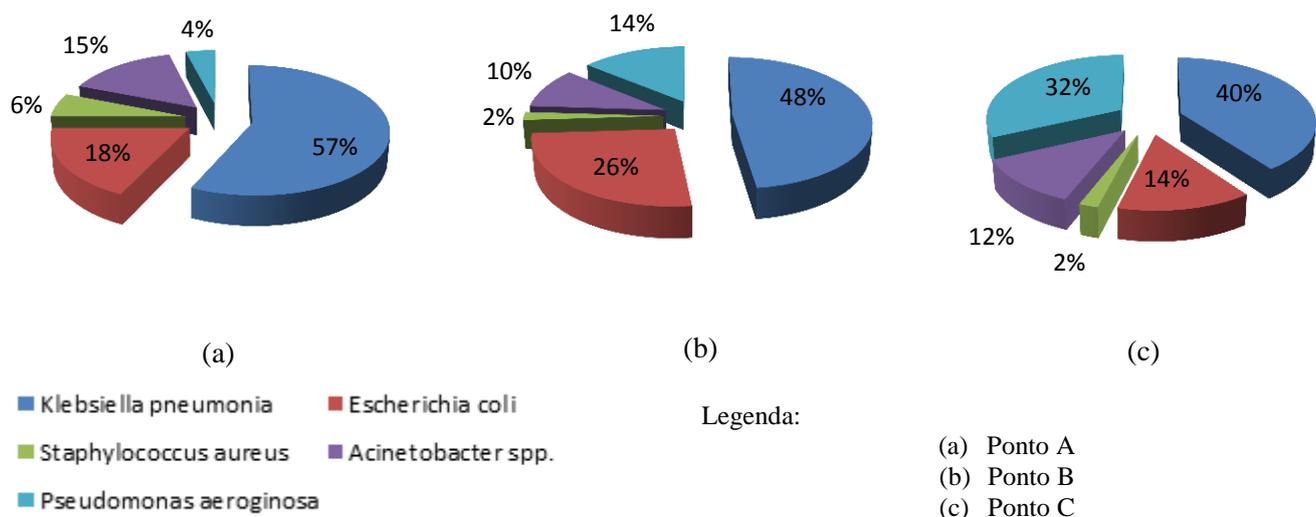


Figura 2: Porcentagem média de crescimento bacteriano por espécie estudada – Pontos A, B E C

Para o Ponto A com o total de  $1,2 \times 10^7$  UFC/ml, 57% das colônias bacterianas é representada por *Klebsiella pneumonia*, 18% são *Escherichia coli*, 15% representadas por *Acinetobacter spp.*, 6% de *Staphylococcus aureus* e 4% de *Pseudomonas aeruginosa*. Já no Ponto B, as colônias de bactérias totais de  $9 \times 10^6$  demonstram decaimento de crescimento, porém por motivos relacionados a diluição com o esgoto sanitário das residências, sendo ainda a *Pseudomonas aeruginosa* as mais representativas nas placas cultivadas (48%), seguidas pelo crescimento de *Escherichia coli* com 26% das colônias.

O que pode confirmar também as definições de VON SPERLING (2011), onde coloca que em termos de tratamento de esgotos, a caracterização de origem fecal (*Escherichia coli*) não é tão importante, uma vez que já se sabe, de antemão, que os esgotos contêm matéria e organismos fecais.

Outro ponto importante a se relacionar é o crescimento em porcentagem de população das colônias de *Pseudomonas aeruginosa* (14%), diferentemente do que acontece com as outras

espécies de bactérias estudadas *Staphylococcus aureus* e *Acinetobacter spp*, que demonstraram decaimento sendo observados 2% e 10% respectivamente.

O Ponto C tem também características específicas em relação aos outros pontos, demonstrando como esperado e afirmado por VON SPERLING (2011) que os organismos indicadores sendo um deles *Escherichia coli*, corroboram em sua eficiência de remoção de patógenos, ou seja, tenha decaimento, o que realmente acontece em relação a porcentagem de colônias desta bactéria em relação ao Ponto B, sendo encontrado neste momento 14% o que se repete em proporção menor para as colônias de *Klebsiella pneumonia* (40%).

Porém, este decréscimo não acontece em relação às outras colônias de bactérias estudadas, que mantem-se para *Staphylococcus aureus* (2%), e demonstra crescimento na porcentagem das outras colônias *Pseudomonas aeruginosa* (32%) denotando grande crescimento porcentual, o que pode indicar condições propícias para seu crescimento e reprodução, juntamente com as colônias de *Acinetobacter spp*. (12%) demonstrando um crescimento menor.

Outro ponto relevante para análise das bactérias estudadas foi existência destas bactérias isoladas após contato com os desinfetantes mais utilizados em unidades hospitalares da região metropolitana de Londrina – PR, pois segundo BODDIE *et Al.* (1997), a desinfecção é um dos mais importantes aspectos de prevenção de enfermidades e neste contexto muitos desinfetantes foram desenvolvidos especificamente para a prevenção das doenças.

Para isso foram escolhidas as bactérias que desenvolveram crescimento no Ponto C, devido a especificidade deste ponto ser o que pode estar diretamente ligado a um possível repasse de contaminação dessas bactérias resistentes a estes desinfetantes, para o corpo hídrico ou para as populações.

Tabela 4 – Indicação de crescimento em caldo BHI de bactérias multirresistentes a desinfetantes hospitalares.

Bactérias	Hipoclorito de Sódio				Cloreto de Benzalcônio				Peróxido de Hidrogênio			
	15"	30"	60"	300"	15"	30"	60"	300"	15"	30"	60"	300"
<i>Klebsiella pneumonia</i>	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>Acinetobacter spp.</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Todas as bactérias estudadas tem resistência a um dos desinfetantes mais utilizados nos hospitais da região metropolitana de Londrina – PR, sendo o contato entre bactérias e desinfetante o fator limitante para a desinfecção. Sendo as colônias de *Klebsiella pneumonia* resistente a hipoclorito somente até 30” de contato, a cloreto de benzalcônio até 15” e a peróxido de hidrogênio resistente em até 60”.

A *Escherichia coli* demonstra uma vulnerabilidade ao hipoclorito de sódio, mesmo em contato em um período muito curto de tempo, não indicando crescimento, porém em relação a cloreto benzalcônio demonstra uma resistência a este desinfetante e a peróxido de hidrogenia apresenta uma resistência semente até 15”.

As colônias de *Staphylococcus aureus* e *Acinetobacter spp*, demonstram uma sensibilidade grande em relação ao peridóxido de hidrogênio não havendo crescimento em nenhuma das amostras inoculadas, ao contrário do hipoclorito de sódio, onde as bactérias inoculadas demonstram resistência e uma relativa resistência ao cloreto de benzalcônio.

Analisando as colônias de *Pseudomonas aeruginosa*, nota-se que houveram crescimento em todas as colônias inoculadas, demonstrando uma resistência a qualquer desses desinfetantes, podendo esta ser considerada multirresistente a todos estes.

## CONCLUSÕES

O controle para lançamento de efluentes aos corpos hídricos no Brasil, tem estrutura bem desenvolvida, porém este controle não abrange as bactérias estudadas neste. Somente a constatação da existência dessas bactérias nos efluentes tratados e não tratados, não evidenciam que estas bactérias existentes no final do tratamento são as mesmas bactérias existentes no efluente hospitalar.

Porém esta hipótese não pode ser descartada, devido a existência de mutações e especializações bacterianas, tornando-as multirresistentes tanto aos componentes químicos existentes no efluente tratado e não tratado, como também aos e antimicrobianos (desinfetantes) existentes também no mesmo e utilizados para desinfecção.

A existência de possíveis bactérias multirresistentes nos corpos hídricos nos direciona a uma necessidade de voltarmos uma possível revisão de nossas legislações e abordagens em relação a estas bactérias. No momento atual desinfetantes, ainda com alta eficiência a estes patógenos microbianos, podem torna-se ineficientes, devido ao lançamento e falta de controle que pode levar o quadro atual a um panorama caótico em relação a novas doenças ou doenças já conhecidas imunes a nossa defesas biológicas.

Outro ponto de preocupação para esta análise desenvolvida é que o tratamento realizado pela estação de tratamento de esgoto, tem realmente diminuído a quantidade das bactérias estudadas, porém não as extinguindo e sim fazendo uma possível seletividade entre os microrganismos. Podendo assim, ao invés de tratar, estarmos selecionando somente as bactérias mais resistentes e voltando-as aos corpos hídricos que serão consumidos em outras localidades.

Devido a isso existe a necessidade notória de um maior controle pela comunidade científica e pela população em geral no que diz respeito ao impacto da presença dessas bactérias nos corpos hídricos, em seu ecossistema e a saúde pública. Visando a quebra desta relação de crescimento da população de bactérias multirresistentes e manutenção da eficiência dos antimicrobianos existentes e utilizados atualmente.

## REFERÊNCIAS

- ABNT, Associação Brasileira de Normas Técnicas (1986) *Preservação e técnicas de amostragem de efluentes líquidos e corpos receptores* – Rio de Janeiro – RJ.
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2002) RDC 050/02 *Regulamento Técnico para planejamento, programação, elaboração e avaliação de projetos físicos de estabelecimentos assistenciais de saúde* – Decreto nº 3.029, de 16 de abril de 1999, em reunião realizada em 20 de fevereiro de 2002. Brasília - DF.
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2010) *Manual de Detecção e Identificação de Bactérias de Importância Médica* – V Módulo – ANVISA - Rio de Janeiro – RJ.
- AUGUSTINHO L., FERREIRA A.R. (2004) *Impactos ambientais dos efluentes líquidos hospitalares no rio Paraguai, Cáceres, MT*. V Simpósio sobre Recursos Naturais e Socioeconômicos do Pantanal, Corumbá 2004 Corumbá - MT.
- BODDIE R.L., NICKERSON S.C. & ADKINSON R.W. (1997) *Efficacies of teat germicides containing 0.5% chlorhexidine and 1% iodine during experimental challenge with Staphylococcus aureus and Streptococcus agalactiae* J. Dairy Sci. 80:2809-2814.

- BROOKS, GEO F.; CARROL, Karen C.; BUTEL, Janet S.; MORSE, Stephen A. (2009) *Microbiologia Médica Lange*. 24ª Edição McGraw Hill Rio de Janeiro - RJ
- COSTA E.O., RIBEIRO A.R., WATANABE E.T., GARINO Jr F., SILVA J.A.B. & THIERS F.O. (1998) *Avaliação in vitro dos desinfetantes utilizados na pós ordenha (teat dipping) para controle da mastite bovina* Revista Napgama 1(1):18-22.
- MADIGAN, Michael T.; MARTINKO, John M.; DUNLAP, Paul V.; CLARK, David P. (2010) *Microbiologia de Brock*. 12ª Edição Artmed São Paulo - SP.
- RESENDE, Aline Cristina Batista (2009); *Detecção de Microrganismos Presentes no Efluente Hospitalar e na estação de tratamento de esgoto de Goiânia: presença de bactérias gram-negativas Resistentes aos antimicrobianos* – Dissertação apresentada ao programa de Pós graduação em ciências ambientais e da saúde - Goiania- GO.
- VON SPERLING, Marcos (2011) *Introdução a qualidade das águas e ao tratamento de esgotos*. 3ª Edição Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) Belo Horizonte – MG.