

ILDERLANE DA SILVA LOPES

**DISSEMINAÇÃO DE FENÓTIPO DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS E
MECANISMOS DE EFLUXO MULTIDROGAS EM ATENÇÃO PRIMÁRIA À SAÚDE
DE VIÇOSA – MG, NO ÂMBITO DA SAÚDE ÚNICA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Orientadora: Maria Aparecida S. Moreira

Coorientadores: Ricardo Seiti Yamatogi
Rodrigo Alves Barros

**VIÇOSA – MINAS GERAIS
2023**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

L864d
2023

Lopes, Ilderlane da Silva, 1984-

Disseminação de fenótipo de resistência a antimicrobianos e mecanismos de efluxo multidrogas em unidades de atenção primária à saúde de Viçosa-MG, no âmbito da saúde única / Ilderlane da Silva Lopes. – Viçosa, MG, 2023.

1 dissertação eletrônica (86 f.): il. (algumas color.).

Inclui anexos.

Inclui apêndices.

Orientador: Maria Aparecida Scatamburlo Moreira.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Veterinária, 2023.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2023.248>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Saúde única. 2. Cuidados primários de saúde.
3. Epidemiologia molecular. I. Moreira, Maria Aparecida Scatamburlo, 1963-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Veterinária. Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária. III. Título.

CDD 22. ed. 362.1098151

Bibliotecário(a) responsável: Alice Regina Pinto Pires CRB-6/2523


ILDERLANE DA SILVA LOPES

**DISSEMINAÇÃO DE FENÓTIPO DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS E
MECANISMOS DE EFLUXO MULTIDROGAS EM ATENÇÃO PRIMÁRIA À SAÚDE
DE VIÇOSA – MG, NO ÂMBITO DA SAÚDE ÚNICA**


Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 02 de março de 2023.

Assentimento:

Documento assinado digitalmente
 ILDERLANE DA SILVA LOPES
Data: 14/05/2023 16:58:10-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Ilderlane da Silva Lopes
Autora

Documento assinado digitalmente
 MARIA APARECIDA SCATAMBURLO MOREII
Data: 15/05/2023 13:15:19-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Maria Aparecida Scatamburlo Moreira
Orientadora

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por todo seu amor e por ser minha fortaleza em todos os momentos;

À minha família, que é minha base, que me incentiva e me apoia em minhas decisões;

À minha orientadora Maria Aparecida Scatamburlo Moreira, Cidinha, pela oportunidade concedida de ser sua orientada e por toda demonstração de carinho e compreensão quando precisei.

Agradeço aos professores Ricardo Yamatogi e Rodrigo Alves pelas orientações e conhecimentos repassados, como coorientadores;

Às minhas amigas, Elka Machado, Lorena Castro, Denise Porto e Weslane Noronha por toda amizade compartilhando de minhas lutas, aflições, medos, ansiedade...Por serem paz em meio à guerra;

Às minhas amigas Jaqueline, Graciele, Luciana, Sônia pela amizade e por terem sido minha “família” em Viçosa.

Às minhas amigas e parceiras Mariana Barros, Jéssica Lobo e meu amigo Douglas, pela amizade, companheirismo, ensinamentos, apoio nas atividades do laboratório, por tornar possível o experimento e pelos momentos agradáveis juntos.

Aos demais integrantes do LDBAC, Richard Polveiro, Sanely, Thâmela e Junnia Pena;

Aos estagiários Leonardo, Caio, Ana Julia, Juliana e Luisa pelo apoio no experimento;

À equipe do Laboratório do Bioagro, representado pela professora Denise Bazzolli, aluna de doutorado Jéssica Rosa e Patrícia Fontes que possibilitaram a execução de parte do experimento;

Aos técnicos Luiz Carlos, Nívia, Alex, Marquinhos, que sempre contribuíram na retirada de dúvidas e auxílio nas atividades do experimento;

À secretária do curso, Rosi, por toda ajuda sempre que solicitei e por sempre estar disposta a resolução dos problemas;

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo financiamento da pesquisa.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa de estudo.

À Universidade Federal de Viçosa-UFV pela oportunidade de estudar e ampliar meus conhecimentos.

RESUMO

LOPES, Ilderlane da Silva, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2023. **Disseminação de fenótipo de resistência a antimicrobianos e mecanismos de efluxo multidrogas em atenção primária à saúde de Viçosa – MG, no âmbito da saúde única.** Orientadora: Maria Aparecida Scatamburlo Moreira. Coorientadores: Ricardo Seiti Yamatogi e Rodrigo Alves Barros.

A resistência a antimicrobianos representa uma ameaça à saúde pública em razão do número crescente e alarmante das infecções causadas por superbactérias. Entre os mecanismos de resistência, o sistema de efluxo multidrogas (SEM) tem revelado importante papel no surgimento de multirresistência. Estudos têm sido realizados em locais de assistência à saúde de maior complexidade, no entanto, é relevante estudar outros ambientes de saúde e inserir o contexto da saúde única. Neste sentido, objetivou-se verificar a disseminação de fenótipo de resistência aos antimicrobianos e mecanismos de SEM da Atenção Primária à Saúde de Viçosa-MG. Para tanto, no período de março e abril de 2019, foram realizadas entrevistas (questionários) e coletas (swabs) de amostras de focinhos dos animais e das mãos de humanos (usuários e profissionais de saúde) e do ambiente pertencentes às três Unidades Básicas de Saúde (UBS) selecionadas. Posteriormente, foram realizados o isolamento, identificação e investigação do perfil de resistência aos antimicrobianos. Os isolados resistentes foram submetidos à pesquisa genotípica dos SEM e os que continham tais genes foram submetidos às provas da Concentração Inibitória Mínima (MIC), na presença e ausência de inibidores (Carbonil Cianida m-Clorofenilhidrazona – CCCP e Fenil-Arginil- β -Naftilamida - PA β N) de SEM e realizado a quantificação do SEM. Por fim, caracterizou-se os isolados através de PCR *fingerprint* para verificar a disseminação dos isolados no contexto da saúde única. A participação feminina foi expressiva, sendo 76 (68,47%) e 59 (71,95%) entre usuários e profissionais, respectivamente. O público de usuários foi composto de 61 (54,9%) de nível de escolaridade fundamental incompleto. Observou-se que existem falhas quanto ao processo de higienização das mãos, entre usuários e profissionais, o que é somatizado pelo fato de algumas UBS não possuírem materiais suficientes para a realização do procedimento, assim como por não obterem treinamentos sobre o assunto. Obteve-se 1.536 microrganismos das mãos de humanos, dos ambientes das três UBS e de cães semidomiciliados, sendo que os microrganismos mais prevale

entre as três esferas estudadas foram *Staphylococcus* coagulase negativa (CoNS), leveduras e *Bacillus* spp. Porém foi possível detectar *S. aureus* e bactérias Gram-negativas (*K. pneumoniae*, *Enterobacter* spp., *Pantoea* spp. e *Acinetobacter pittii*) em cães e humanos. Dos 38 *S. aureus*, 22 (57,9%) e 21 (55,27%) foram resistentes à penicilina e à eritromicina, respectivamente. Todos foram sensíveis ao cloranfenicol, trimetoprim, norfloxacin, nitrofurantoína, sulfazotrim e linezolida. Verificou-se resistência de 4 (50%) *Klebsiella pneumoniae* à ampicilina, amoxicilina, nitrofurantoína e sulfonamidas; 5 (62,5%) *Enterobacter* spp. foram resistentes à amoxicilina e sulfonamidas e 4 (50%) resistente à ampicilina. Todos foram sensíveis à tetraciclina, gentamicina, norfloxacin, sulfazotrim, trimetoprim, cloranfenicol e doxiciclina. O gene *norC* foi detectado nos 38 (100%) isolados de *S. aureus*, seguido por *tet38*, *ImrS* e *norB* (97,4%) e gene *norA* presente em 94,74% dos isolados. *AcrA* estava presente em 100% dos isolados Gram negativos, seguido de *acrB* em 100% dos isolados de *K. pneumoniae*, em 5 (62,5%) dos *Enterobacter* spp. e em 6 (85,7%) *Pantoea* spp. Quanto à resistência fenotípica associada ao SEM comparando os valores da MIC na presença e ausência do CCCP, para *S. aureus* e de PAβN, para isolados Gram-negativos, não foi observada redução dos valores da MIC. Porém, houve atividade do SEM em 33 (100%) *S. aureus* testados e para três isolados Gram-negativos. Observou-se que existe uma diversidade de agentes nas UBS, destacando *Staphylococcus aureus* e isolados Gram-negativos resistentes e que contêm genes de SEM que indica circulação e disseminação destes, entre animais e humanos (usuários e profissionais de saúde) e entre as UBS avaliadas.

Palavras-chave: Saúde Única. Atenção Primária à Saúde. Epidemiologia molecular.

ABSTRACT

LOPES, Ilderlane da Silva, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March 2023. **Dissemination of antimicrobial resistance phenotype and mechanisms of multidrug efflux in primary health care in Viçosa - MG, within the scope of single health.** Adviser: Maria Aparecida Scatamburlo Moreira. Co-advisers: Ricardo Seiti Yamatogi and Rodrigo Alves Barros.

Antimicrobial resistance is a growing public health threat due to the increasing number of infections caused by superbugs. Among resistance mechanisms, the multidrug efflux system (MES) has been found to play an important role in the emergence of multidrug resistance. Studies have been carried out in more complex healthcare settings; however, it is relevant to study other health environments and incorporate the context of One Health. Therefore, the objective of this study was to verify the dissemination of antimicrobial resistance phenotypes and MES mechanisms in Primary Health Care in Viçosa-MG. To achieve this, interviews (questionnaires) and collections (swabs) of samples from the snouts of animals and from the hands of humans (users and health professionals), as well as from the environment belonging to the three Basic Health Units (BHU), were carried out in March and April 2019. Subsequently, the isolation, identification and investigation of the antimicrobial resistance profile were carried out. Resistant isolates were submitted to MES genotypic research, and those containing such genes were submitted to Minimum Inhibitory Concentration (MIC) tests in the presence and absence of MES inhibitors (Carbonyl Cyanide m-Chlorophenylhydrazone – CCCP and Phenyl-Arginyl- β -Naphthylamide - PA β N), and MES quantification was performed. Finally, the isolates were characterized by PCR fingerprint to verify the spread of isolates in the context of One Health. The study found that female participation was significant, with 76 (68.47%) and 59 (71.95%) among users and professionals, respectively. The user population was composed of 61 (54.9%) with incomplete primary schooling. It was observed that there were flaws in the hand hygiene process between users and professionals, due to some BHU not having enough materials to carry out the procedure, as well as not obtaining training on the subject. A total of 1,536 microorganisms were obtained from the hands of humans, the environments of the three BHU, and semi-domiciled dogs. The most prevalent microorganisms among the three spheres studied were negative

coagulase *Staphylococcus* (CoNS), yeasts, and *Bacillus* spp. However, it was possible to detect *S. aureus* and Gram-negative bacteria (*K. pneumoniae*, *Enterobacter* spp., *Pantoea* spp., and *Acinetobacter pittii*) in dogs and humans. Of the 38 *S. aureus* isolates, 22 (57.9%) and 21 (55.27%) were resistant to penicillin and erythromycin, respectively. All were sensitive to chloramphenicol, trimethoprim, norfloxacin, nitrofurantoin, sulfazotrim, and linezolid. Four (50%) *K. pneumoniae* isolates were resistant to ampicillin, amoxicillin, nitrofurantoin, and sulfonamides, while five (62.5%) *Enterobacter* spp. were resistant to amoxicillin and sulfonamides, and four (50%) were resistant to ampicillin. All were sensitive to tetracycline, gentamicin, norfloxacin, sulfazotrim, trimethoprim, chloramphenicol, and doxycycline. The *norC* gene was detected in all 38 (100%) *S. aureus* isolates, followed by *tet38*, *ImrS*, and *norB* (97.4%) with the *norA* gene present in 94.74% of the isolates. *acrA* was present in all Gram-negative isolates, followed by *acrB* in 100% of *K. pneumoniae* isolates, in 5 (62.5%) of *Enterobacter* spp., and in 6 (85.7%) of *Pantoea* spp. With respect to phenotypic resistance associated with MES, no reduction in MIC values was observed when comparing MIC values in the presence and absence of CCCP for *S. aureus* and PA β N for Gram-negative isolates. However, MES activity was observed in all 33 (100%) tested *S. aureus* isolates and in three Gram-negative isolates. The study observed a diversity of agents in the BHU, highlighting *S. aureus* and resistant Gram-negative isolates that contain MES genes, which indicates their circulation and dissemination between animals and humans (users and health professionals) and among the evaluated BHU.

Keywords: Single Health. Primary Health Care. Molecular epidemiology.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL.....	11
	REFERENCIAS.....	14
2	OBJETIVOS.....	16
2.1	Geral.....	16
2.2	Específicos.....	16
	Atenção Primária à Saúde: perfis microbiológico e de resistência antimicrobiana, e perfil social no contexto da Saúde Única.....	17
1	INTRODUÇÃO.....	18
2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
2.1	Preceitos éticos.....	19
2.2	Local do estudo.....	19
2.3	Coleta dos dados.....	20
2.4	Coleta das amostras.....	20
2.5	Identificação dos isolados.....	21
2.6	Perfil de resistência de <i>Staphylococcus aureus</i> e isolados Gram-negativos.....	23
3	RESULTADOS	23
3.1	Informações obtidas através dos questionários.....	23
3.2	Identificação dos microrganismos.....	26
3.3	Perfil de resistência antimicrobiana.....	28
4	DISCUSSÃO.....	30
4.1	Perfil Microbiológico.....	30
4.2	Resistência antimicrobiana.....	35
4.3	Contexto social.....	37
5	CONCLUSÕES.....	41
	REFERENCIAS.....	42
	Sistemas de efluxo multidrogas e disseminação da resistência: <i>staphylococcus aureus</i> e bactérias gram-negativas isoladas das unidades básicas de saúde no contexto da saúde única.....	47
1	INTRODUÇÃO.....	48
2	MATERIAIS E MÉTODOS	50

2.1	Isolados.....	50
2.2	Detecção de genes dos sistemas de efluxo multidrogas.....	50
2.3	Detecção fenotípica dos Sistemas de Efluxo multidrogas.....	52
2.3.1	<i>Seleção dos isolados para os testes.....</i>	52
2.3.2	<i>Produtos utilizados.....</i>	52
2.3.3	<i>Concentração Inibitória Mínima (MIC).....</i>	52
2.3.4	<i>Quantificação de efluxo</i>	53
2.4	Epidemiologia molecular.....	54
3	RESULTADO E DISCUSSÃO.....	55
4	CONCLUSÕES.....	69
	REFERENCIAS.....	70
	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	75
	MATERIAL SUPLEMENTAR.....	76
	APÊNDICES.....	80
	ANEXOS.....	86

1 INTRODUÇÃO GERAL

O Sistema Único de Saúde (SUS) é um modelo de saúde pública que oferece à comunidade desde atendimentos simples, através da Atenção Primária, até os mais complexos, como casos de transplante, garantindo acesso integral, universal e gratuito à toda população do país (BRASIL, 2022). A Atenção Primária à Saúde é a base deste sistema, sendo a principal porta de entrada do cidadão ao sistema de saúde, assim como de integração e coordenação do cuidado necessário (SELLERA et al., 2020).

Este acesso ocorre através das Unidades Básicas de Saúde (UBS), que normalmente são instaladas próximas aos locais onde as pessoas residem, trabalham e vivem, desempenhando um papel fundamental para a garantia de acesso à saúde à toda população (BRASIL, 2012). Através das UBS são oferecidos diversos serviços tais como, consultas, tratamentos dentários, aplicação de vacinas, curativos, aferimento de pressão entre outros. Estão envolvidos neste contexto, vários profissionais de saúde que mantêm contato, direto ou indireto, com os usuários do sistema.

Assim como em ambientes hospitalares, nas UBS o número de pessoas atendidas e de profissionais de saúde que circulam nesses ambientes é alto. Da mesma forma, verifica-se uma diversidade de casos clínicos que podem incluir tanto patologias de origem infecciosas como não infecciosas.

Diante deste cenário, os estabelecimentos de saúde podem representar risco de transmissão de agentes para usuários e profissionais de saúde que frequentam esses ambientes (BONADONNA et al., 2021), uma vez que o ambiente hospitalar constitui um local favorável a contaminação de pacientes e demais frequentadores, seja pelo ar (BONADONNA et al., 2021; OLIVEIRA et al., 2021), superfícies (OLIVEIRA, et al., 2021) ou águas residuais (KAUR; YADAV; TYAGI, 2020; ASFAW et al., 2017), além de possibilitar a disseminação de microrganismos patogênicos, como bactérias multirresistentes, através de profissionais de saúde de UBS, por meio das mãos durante o atendimento (GUEDES et al., 2018), dos equipamentos e dos instrumentos hospitalares (SOUZA et al., 2021).

Sabe-se que a resistência aos antimicrobianos representa um dos principais problemas de saúde pública em nível mundial, principalmente no que se refere aos

microrganismos multirresistentes (LEPE; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, 2022), sendo considerada como uma das 10 principais ameaças à saúde global (OMS, 2019).

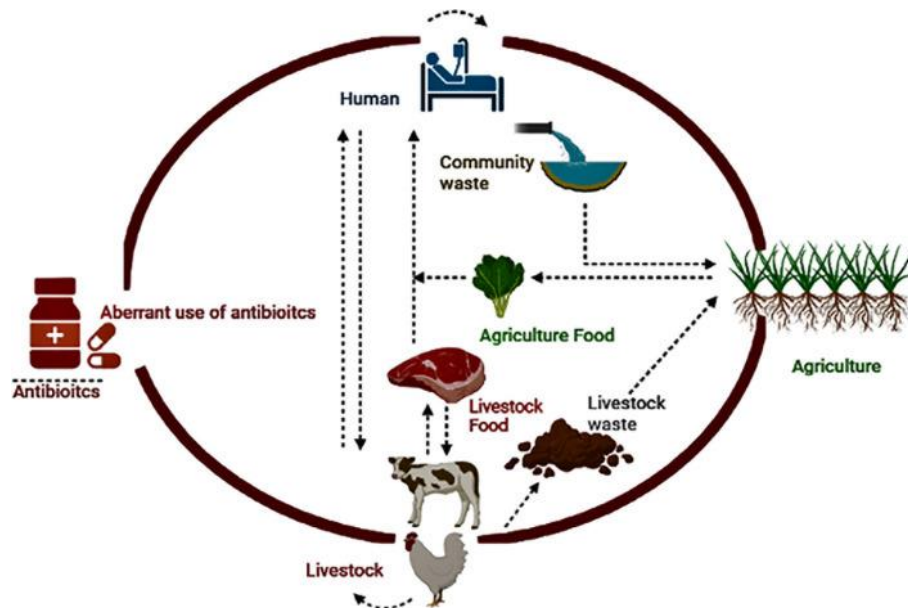
Os patógenos bacterianos adquirem resistência aos antimicrobianos por duas estratégias principais: por mutações específicas e transferência vertical a prole; e por aquisição de genes de resistência antimicrobiana (RAM) externos através de transferência horizontal de genes (EISENREICH et al., 2022). A rápida disseminação de genes de resistência antimicrobiana através desses mecanismos potencializa a gravidade do problema (SERNA; CONZALE-ZOM, 2022).

Com o aumento da resistência antimicrobiana, reduzem as opções por tratamentos eficazes, com o conseqüente aumento da morbidade e mortalidade de pacientes acometidos por bactérias multirresistentes (REYGAERT, 2018), além dos custos elevados que isso acarreta ao SUS. Conforme dados obtidos pelo Centros de Controle e Prevenção de Doença (CDC) (2015) nos Estados Unidos estima-se que cerca de 23.000 pessoas morrem como conseqüência de infecções por algum organismo multirresistente.

Atualmente, para a investigação da disseminação da RAM são necessárias abordagens de Saúde Única (ZAHEER et al., 2020), enfatizando o papel colaborativo indispensável de humanos, animais e ambiente na mitigação da resistência antimicrobiana global (ASLAM et al., 2021), considerando que a saúde humana está intimamente ligada à saúde dos animais e à viabilidade dos ecossistemas (CHRISTAKI; MARCOU; TOFARIDES, 2020).

A figura 1 representa essa interação entre os três elos da Saúde Única mostrando que o uso de antibióticos na pecuária, agricultura e na medicina humana e a forma de eliminação no ambiente influencia no surgimento, manutenção e disseminação da resistência bacteriana. Assim, pode-se notar que, onde existe o uso de antibióticos, surgem reservatórios de genes e patógenos resistentes às drogas, incluindo humanos, animais de companhia e de produção, alimentos e meio ambiente (SERNA; CONZALE-ZOM, 2022).

Figura 1. Potencial Saúde Única associados à resistência antimicrobiana.



Fonte: Aslam et al. (2021)

O termo Saúde Única tem origem no reconhecimento de que as doenças muitas vezes emergem das interações entre humanos, animais e do ambiente compartilhado (DALTON et al., 2020). Uma abordagem de Saúde Única envolve especialistas em saúde humana, animal, ambiental e outras disciplinas e setores relevantes no monitoramento e controle de ameaças à saúde pública (CDC, 2022). Para Solomon (2017) compreender e aplicar uma abordagem de Saúde Única no combate a RAM é importante pois oferece uma perspectiva única para concepção, implementação e avaliação de programas e políticas de saúde pública.

A resistência antimicrobiana continua a surgir, propagar-se e persistir em todo o elo da saúde humana (comunitária e hospitalar) e animal (incluindo animais para alimentação, animais de companhia e aquicultura) em uma variedade de ambientes (SCOTT et al., 2019). Trabalhos na literatura têm demonstrado sobre o papel de cada esfera, humano, animal e ambiente nos mecanismos da RAM. Em um estudo, verificou-se em isolados de *Staphylococcus aureus* obtidos de humanos, bovinos e animais de estimação taxas de multirresistentes de 19 (76%), 9 (36%) e 14 (70%), respectivamente (PAHLAVANZADEH et al., 2021). Em outra pesquisa com animais de companhia foram detectadas bactérias da família *Enterobacteriaceae* produtoras de beta-lactamase de espectro estendido e *S. aureus* resistentes à meticilina (KASPAR et al., 2018). Desta forma, salienta-se a importância de estudos com uma

abordagem integrada da avaliação da resistência antimicrobiana, devido à estreita relação entre RAM e humanos, animais e ecossistemas (ZHOU et al., 2022).

Diante destas informações, este estudo selecionou as Unidades Básicas de Saúde (UBS) por ser um ambiente de assistência à saúde, em que há poucas pesquisas, assim como pela possibilidade de disseminação de bactérias resistentes, através do contato entre profissionais de saúde e os usuários.

REFERÊNCIAS

ASFAW, T. *et al.* Antibiotic Resistant Bacteria from Treated and Untreated Hospital Wastewater at Ayder Referral Hospital, Mekelle, North Ethiopia. **Advances in Microbiology**, v.7, nº 12, 2017.

ASLAM, B. *et al.* Antibiotic Resistance: One Health One World Outlook. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v.11, p. 1-20, 2021.

BONADONNA, L.; BRIANCESCO, R.; COCCIA, A. M. *et al.* Microbial Air Quality in Healthcare Facilities. **International Journal of Environmental Research Public Health**, v.18, n.12, p. 1-19, 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Política Nacional de Atenção Básica** / Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. – Brasília: Ministério da Saúde, 2012. 110 p.: il. – (Série E. Legislação em Saúde).

BRASIL. **Sistema Único de Saúde**, estrutura, princípios, e como funciona. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/s/sus>. Acesso em: 14 de novembro de 2022.

CHRISTAKI, E.; MARCOU, M.; TOFARIDES, A. Antimicrobial Resistance in Bacteria: Mechanisms, Evolution, and Persistence. **Journal of Molecular Evolution**, v.88, n.1, p. 26-40, 2020.

EISENREICH W, RUDEL T, HEESEMANN J, GOEBEL W. Link Between Antibiotic Persistence and Antibiotic Resistance in Bacterial Pathogens. **Front Cell Infect Microbiol**. 2022.

GUEDES, J. S. *et al.* Adesão dos profissionais a prática de higiene das mãos em um centro de saúde do distrito federal: avaliação da técnica correta. **Revista Prevenção de Infecção e Saúde**, v.4: 7482, 2018.

KASPAR, U. *et al.* Zoonotic multidrug-resistant microorganisms among small companion animals in Germany. **PLoS One**, v.13, n.12, p. 1-15, 2018.

KAUR, R.; YADAV, B.; TYAGI, R. D. **Microbiology of hospital wastewater**. Current Developments in Biotechnology and Bioengineering, p.103-48, 2020.

LEPE, J. A.; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L. Resistance mechanisms in Gram-negative bacteria. **Medicina Intensiva (Engl Ed)**, v. 46, 7, p. 392-402, 2022.

OLIVEIRA, M. T. *et al.* Potentially pathogenic bacteria isolated from neglected air and surfaces in hospital. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 57, p.1-11, 2021.

OMS - Organização Mundial de Saúde. **Novo relatório pede ação urgente para evitar crise de resistência antimicrobiana**. Disponível em: <https://www.who.int/news/item/29-04-2019-new-report-calls-for-urgent-action-to-avert-antimicrobial-resistance-crisis#:~:text=Currently%2C%20at%20least%20700%2C000%20people,die%20from%20multidrug%2Dresistant%20tuberculosis>. Acesso em: 14 de junho de 2022.

PAHLAVANZADEH, S. *et al.* Antibiotic resistance and phylogenetic comparison of human, pet animals and raw milk *Staphylococcus aureus* isolates. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 79, p. 1-6, 2021.

REYGAERT, W. C. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. **AIMS Microbiology**, v. 4, n. 3, p. 482-501, 2018.

SELLERA, P. E. G. *et al.* Monitoramento e avaliação dos atributos da Atenção Primária à Saúde em nível nacional: novos desafios. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 25, n. 4, p.1401-1411, 2020.

SERNA, C.; GONZALEZ-ZORN, B. Antimicrobial resistance and *One Health*. **Revista Espanola de Quimioterapia**, v. 35, Suppl 3 (Suppl 3), p.37-40, 2022.

SOUZA, S. G. P. *et al.* Bacteria with a Potential for Multidrug Resistance in Hospital Material. **Microbial Drug Resistance**, v. 27, n. 6, p. 835-842, 2021.

ZAHEER, R. *et al.* Surveillance of *Enterococcus* spp reveals distinct species and antimicrobial resistance diversity across a One Health continuum. **Scientifica reports**, v.10, n.1, p. 1-16, 2020.

ZHOU, N., CHENG, Z., ZHANG, X. *et al.* Global antimicrobial resistance: a system-wide comprehensive investigation using the Global One Health Index. **Infectious Diseases Poverty**, v.11, n. 92, p. 1-16, 2022.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

- Verificar a disseminação de fenótipo de resistência aos antimicrobianos e mecanismos de Sistemas de Efluxo Multidrogas (SEM) em três Unidades Básicas de Saúde (UBS) da Atenção Primária à Saúde de Viçosa-MG

2.2 Específicos

- Determinar o perfil socioeconômico dos usuários e profissionais de saúde por meio de aplicação de questionários, bem como dos animais e do ambiente das UBS;
- Isolar e identificar *S. aureus* e bactérias gram-negativas em três Unidades Básicas de Saúde (UBS) do município de Viçosa-MG;
- Determinar os perfis de resistência antimicrobiana dos isolados;
- Detectar a presença dos principais sistemas de efluxo multidrogas entre os isolados *S. aureus* e bactérias Gram-negativas;
- Quantificar o efluxo realizado pelos sistemas de efluxo detectados frente aos antimicrobianos presentes nos respectivos perfis de resistência;
- Verificar os perfis epidemiológicos moleculares dos isolados

CAPÍTULO I

Atenção Primária à Saúde: perfis microbiológico e de resistência antimicrobiana, e perfil social no contexto da Saúde Única

1 INTRODUÇÃO

A resistência antimicrobiana representa um problema importante na saúde pública. Estima-se que ocorrerá aproximadamente 10 milhões de mortes por ano a partir de 2050 em decorrência das infecções provocadas pelas denominadas “superbactérias” (O’Neill, 2016). Cerca de 700.000 pessoas morrem anualmente devido as doenças causadas por microrganismos resistentes aos antibióticos (OMS, 2019), fenômeno este, de curso natural que ocorre quando os microrganismos são expostos a antibióticos (BHAT, 2021).

Quando se discute resistência antimicrobiana (RAM), não se pode atribuir sua causa a um único determinante, mas sim, devemos compreendê-la no âmbito maior e mais complexo que envolve três elos distintos, homem, ambiente e animal. Já se sabe, por exemplo, o papel exercido pelo cão como disseminador de bactérias resistentes. Santos et al. (2022) comprovaram que cães domiciliados são portadores de *Staphylococcus* spp. resistentes à vancomicina e oxaciclina. Enquanto Hamame et al. (2022) constataram que ocorre transmissão de bactérias contendo genes *mcr* (gene de resistência à colistina) de animais de estimação para humanos. A transmissão é favorecida pelo contato direto tais como acariciar, lambar e cheirar entre animais de estimação e humanos (BHAT, 2021).

Em cães semidomiciliados a transmissão pode ser mais preocupante, em decorrência do acesso livre à rua, sendo mais afetados por fatores ambientais, acarretando maior diversidade bacteriana e podem constituírem em fortes disseminadores de bactérias resistentes ao retornarem aos domicílios. A influência do meio ambiente na disseminação da resistência aos antibióticos tem sido amplamente reconhecida (PRESTINACI, PEZZOTTI; PANTOSTI, 2015) devido à alta diversidade microbiana encontrada neste nicho (PANTHEE et al., 2022). Resíduos de antibióticos são lançados no ambiente, o que contribui para seleção de bactérias resistentes que contaminam cães semidomiciliados e, conseqüentemente, humanos que possam ter contato com tais animais (MARCHETTI et al., 2021).

O ambiente hospitalar tem sido o principal foco de estudo sobre resistência bacteriana, devido a fatores favoráveis ao desenvolvimento inerentes ao ambiente, tais como alto consumo de antibióticos, pacientes imunodeprimidos e entrada permanente de espécies patogênicas (ROCA et al., 2015). No entanto, é preciso estender as pesquisas para outras áreas de atenção à saúde, como as Unidades

Básicas de Saúde (UBS). Estes espaços são considerados a principal porta de entrada no atendimento pelo Sistema Único de Saúde (SUS), com capacidade de resolver até 80% dos problemas de saúde da população, sem que haja a necessidade de encaminhamento para hospitais (FS, 2020.), além disso, compreendem ambientes que permite a interação dos diferentes seguimentos da saúde única.

Investigar a resistência antimicrobiana nos diversos níveis de atenção à saúde são primordiais para se buscar ações que visem combater tal fenômeno. Dessa forma, esta pesquisa tem por objetivo identificar microrganismos isolados em animais (cães), humanos (usuários e profissionais) e em ambiente das Unidades Básicas de Saúde, assim como traçar os seus perfis de resistência aos principais antimicrobianos usados na medicina veterinária e humana, articulando os dados ao perfil social de usuários e profissionais de saúde para fornecer informações importantes que caracterizem à população e a área de estudo.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Preceitos éticos

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPE) sob o nº 3.014.634 e pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA sob o nº 79/2018, ambos da Universidade Federal de Viçosa (anexos A e B).

2.2 Local do estudo

Em Viçosa - MG, a atenção básica à saúde é composta por 18 Equipes da Saúde da Família (eSFs) que estão organizadas em três Núcleos Ampliados de Saúde da Família e Atenção Básica (NASF-AB) e alojados em diferentes Unidades Básicas de Saúde (UBS). Dessa forma, foram intencionalmente selecionadas uma UBS de cada NASF. Além disso, o critério de seleção utilizado foi incluir as ESFs parceiras das atividades desenvolvidas pelo Programa de Residência em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa. As UBS foram denominadas pelas letras W, Y e Z, para preservar a identidade dos locais de estudo.

2.3 Coleta dos dados

A coleta dos dados foi realizada em março/abril e agosto/setembro de 2019 em dois períodos distintos, seco e chuvoso. Foi obtida através da aplicação de questionários (Apêndice A) aos usuários do sistema de saúde (pessoas que procuram as UBS para atendimento) e profissionais de saúde (Apêndice B). Os questionários abordaram questões relativas às características sociodemográficas; do domicílio; atividade laboral e higienização das mãos.

Para caracterização do ambiente da UBS foi preenchido, um roteiro de observação (Apêndice C) contendo questões sobre: instalações sanitárias; resíduos sólidos do estabelecimento; higiene com equipamentos; controle de pragas e vetores e higiene do ambiente.

Com relação aos cães, foi utilizada uma ficha (Apêndice D) para coleta de informações básicas do animal semidomiciliado, como: sexo, cor, porte, tipo de pelagem e local onde foi encontrado.

2.4 Coleta das amostras

Foram coletadas amostras de humanos (profissionais de saúde e usuários das UBS), animais (cães) e do ambiente.

Dos profissionais que compõem a eSF selecionou-se amostrar todos os agentes comunitários de saúde (ACS), enfermeiros, dentistas, técnicos em saúde bucal, técnicos de enfermagem, fisioterapeutas, farmacêuticos, educadores físicos e médicos, uma vez que são profissionais que mantêm contato direto com os usuários, e no caso dos ACS, também fazem a intermediação entre os domicílios e as UBS. Foram coletadas também amostras de outros trabalhadores de saúde (auxiliar administrativo, auxiliar de serviços gerais e motorista à serviço dos funcionários que trabalham nas UBS) que indiretamente participam do atendimento ao público das UBS. As amostras foram coletadas sempre no término do expediente de trabalho de cada profissional, que poderia ser no final da manhã ou ao final da tarde.

Com relação aos usuários da UBS, foram coletados material de indivíduos com idade mínima de 18 anos, assim que adentraram às UBS, quando então iniciava o expediente nas unidades, independente do motivo da procura pelo serviço de saúde, respeitando a quantidade de uma pessoa por família.

Foi realizada uma única coleta da amostra da mão dominante de cada participante (profissionais e usuários) por meio de swab estéril (Absorve, CRAL®) em meio Stuart, com movimentos giratórios da parte inferior das palmas até a extremidade dos dedos e voltando ao punho, repetindo-se esse procedimento três vezes na direção de cada dedo. O swab foi reintroduzido no recipiente original, adicionado em caixa térmica.

A coleta das amostras dos cães foi realizada por residentes do Programa de Residência em Medicina Veterinária da UFV, pois os mesmos faziam parte da equipe técnica do projeto e considerando a habilidade dos mesmos com o manejo dos animais. Para tanto, utilizando um swab estéril (Absorve, CRAL®) em meio Stuart, porém para estes, friccionando-o na parte externa do focinho dos animais com movimentos circulares, delicados e firmes. A escolha pela região do focinho se deve, pelo fato de geralmente o cão ter o hábito de cheirar as pessoas, sendo o primeiro movimento apresentado na tentativa de contato com as pessoas.

Quanto às amostras do ambiente foram realizadas pelo método de sedimentação utilizando placas de Petri contendo Ágar Sangue a 5%, em duplicatas, que foram dispostas abertas nos ambientes das UBS por aproximadamente 15 minutos.

Após as coletas, as placas e os swabs foram colocados em caixas térmicas refrigeradas e transportados para o Laboratório de Doenças Bacterianas (LDBAC) do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa – UFV, para processamento das amostras.

2.5 Identificação dos isolados

Imediatamente após chegar no LDBAC, os swabs foram estriados em placas de Petri (duplicatas) contendo Ágar Sangue ovino a 5% e incubadas em aerobiose a 37° C, realizando a leitura em 24, 48 e 72 horas. Posteriormente, realizou-se a caracterização e identificação das colônias, conforme a cor, aspecto e hemólise. Em seguida, foi realizada coloração de Gram e os isolados transferidos para ágar BHI e incubados à 37° C por 24 h em estufa bacteriológica para obtenção de cultura pura. Posteriormente, os isolados foram transferidos para caldo BHI e incubados a 37°C, centrifugados a 4.000 rpm durante 5 minutos e desprezado o sobrenadante. O precipitado foi ressuspensão com 800 µl de caldo BHI estéril e 200 µl de glicerol

autoclavado e estocado em microtubos em duplicata. Em seguida, foram congelados em nitrogênio líquido e mantidos em ultrafreezer (-80°C) para posterior realização dos ensaios.

Os microrganismos obtidos foram reativados em caldo BHI e realizada a preliminar identificação dos isolados através da semeadura em placas contendo Ágar Cromogênico Geral (Probac do Brasil, Brasil), que foram incubadas a 37°C por 24 h e realizado a leitura conforme a cor obtida no ágar, seguindo a interpretação exibida no Quadro 1.

Quadro 1. Interpretação dos resultados obtidos pelo crescimento bacteriano em Ágar Cromogênico Geral.

Cor típica da colônia	Microrganismo pré-identificado
Rosa a avermelhado	<i>Escherichia coli</i>
Azul turquesa	<i>Enterococcus</i> spp.
Azul metálico	<i>Klebsiella</i> spp., <i>Enterobacter</i> spp., <i>Citrobacter</i> spp.
Halo marrom	<i>Proteus</i> spp.
Creme, translúcida	<i>Pseudomonas</i> spp.
Dourada, opaca, pequena	<i>Staphylococcus aureus</i>
Rosa opaca, pequena	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>

Fonte: Probac do Brasil, 2019.

Selecionou-se *S. aureus* e bactérias Gram-negativas, alvos da presente pesquisa. Desta forma, aqueles pré-identificados como *S. aureus* foram submetidos também às provas da catalase e coagulase em plasma de coelho (QUINN, 1994). Para identificação genotípica, foi realizada a extração do DNA genômico por meio do Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega) seguindo as orientações do fabricante e análise da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para o gene *nuc* utilizando os iniciadores *nuc - f* (5'- GCGATTGATGGTGATACGGTT -3), *nuc - r* (5'- AGCCAAGCCTTGACGAACTAAAGC -3 ') conforme os programas de amplificação para espécie citados por Yang et al. (2007).

Os isolados Gram-negativos foram submetidos às provas bioquímicas adicionais através do kit EPM-MILi (PROBAC), à identificação genotípica através da extração de DNA (kit) com posterior sequenciamento por 16S rRNA realizado em equipamento AB 3500 Genetic Analyzer, conduzido pela ACTgene, Rio Grande do Sul, Brasil.

2.6 Perfil de resistência de *Staphylococcus aureus* e isolados Gram-negativos

O antibiograma foi realizado pelo método de difusão em disco de Kirby-Bauer (BAUER et al., 1966). Os isolados foram semeados em caldo BHI e incubados a 37°C até obtenção de turvação equivalente a 0,5 na escala de Mac Farland, que foi aferida utilizando um espectrofotômetro (BioMate™ - 3 series Spectrophotometer - Thermo Electron Corporation). Em seguida, com auxílio de um swab, os inóculos foram semeados em ágar Mueller Hinton, em duplicatas, e após foram aplicados os discos impregnados com os antimicrobianos mais utilizados na medicina humana e veterinária da marca Sensidisc: penicilina G (10 UI), cloranfenicol (30 µg), ciprofloxacina (05 µg), doxiciclina (30 µg), eritromicina (15 µg), gentamicina (10 µg), tetraciclina (30 µg), nitrofurantoína (300µg), norfloxacina (10 µg), sulfonamidas (300 µg), sulfazotrim (25 µg), linezolida (30 µg), trimetoprim (5 µg), amoxicilina (10 µg), ampilina (10 µg), cefepime (30 µg), estreptomicina (10 µg), azitromicina (15 µg). As placas foram incubadas em estufa por 24h a 37°C e realizou-se a interpretação dos halos de inibição de acordo com Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI, 2022).

3 RESULTADOS

3.1 Perfil dos participantes e ambientes investigados

Fizeram parte da pesquisa 107 animais, 82 profissionais de saúde e 111 usuários das três UBS. Na Tabela 1 estão apresentados os dados sociodemográficos dos usuários e profissionais de saúde.

Tabela 1. Dados sociodemográficos dos usuários e profissionais de saúde de três Unidades Básicas de Saúde de Viçosa-MG, 2019.

Variáveis	Usuários		Profissionais	
	N = 111	%	N = 82	%
<i>Sexo</i>				
Masculino	35	31,53	23	28,05
Feminino	76	68,47	59	71,95
<i>Escolaridade</i>				
Analfabeto	9	8,1	-	-
Fundamental incompleto	61	54,9	-	-
Fundamental	21	19	5	6,09
Médio incompleto	5	4,5	-	-
Médio	12	10,82	32	39,1
Superior incompleto	1	0,9	6	7,31
Superior	2	1,8	39	47,5
<i>Tipo de moradia</i>				
Casa	88	79,28	51	62,2
Apartamento	12	10,82	27	32,92
Sítio/Chácara	11	9,9	2	2,44

N = número de de usuários/profissionais participantes.

A participação feminina na pesquisa foi expressiva, sendo composta de 76 (68,47%) usuárias e 59 (71,95%) profissionais de saúde. O público maior de usuários foi composto por pessoas de nível fundamental incompleto e que residem em casas. Um percentual de 9,9% mora em sítio/chácara.

Sobre os profissionais de saúde, observou-se que 39 (47,5%) possuíam curso superior e 32 (39,1%) nível médio. A formação profissional do grupo com ensino superior compreendia os cursos de Letras, Pedagogia, Medicina, Odontologia, Farmácia, Fisioterapia, Educação Física, Gestão Ambiental ou Magistério Básico. Enquanto o grupo com ensino médio completo era composto por profissionais dos cursos de Técnico em Higiene Bucal, Técnico em Enfermagem ou Técnico em Administração. Os que afirmaram não ter concluído o ensino superior pertenciam aos cursos de Enfermagem, Tecnologia em Processos Gerenciais, Medicina. Sessenta e dois por cento desses profissionais de saúde reside em casas.

Quanto aos parâmetros higiênicos, a Tabela 2 ilustra que todos os usuários relataram ter o hábito de lavar as mãos como procedimento de higiene. Porém, 77 (69,3%) não descreveram como é realizado tal procedimento e quatro (3,6%)

disseram utilizar apenas água no procedimento. Apenas 11 (9,9%) usuários passaram por algum tipo de treinamento sobre higienização. Dos 82 profissionais, 39 (47,56%) já tiveram treinamento sobre higienização. Todos relataram ter o hábito de lavar as mãos. No entanto, 44 (53,6%) não descreveram quais procedimentos realizados na higienização das mãos. Além disso, 50 (61%) mencionaram utilizar luvas durante os procedimentos clínicos.

Tabela 2. Hábitos de higienização das mãos de profissionais de saúde e usuários de três Unidades Básicas de Saúde de Viçosa – MG, 2019.

Parâmetros	Profissionais de saúde		Usuários	
	N = 82	%	N = 111	%
Treinamento sobre higienização	39	47,5	11	9,90
Lavagem das mãos	82	100	110	99
Uso de luvas durante os procedimentos	50	60,9	n.a	n.a

N= número de usuários/profissionais participantes; n.a = não se aplica;

Quando questionados sobre a guarda de animal de estimação, 63 (56,8%) usuários e 41 (50%) profissionais afirmaram possuir algum animal, como cães e gatos.

No que se refere à caracterização das instalações sanitárias dos ambientes das UBS, observou-se que nas três unidades havia presença de banheiros, funcionando perfeitamente, no entanto não havia papel toalha para secagem das mãos. O ambiente apresentava-se limpo, exceto na UBS Z. Na UBS W, o piso não estava em boas condições, mostrando-se quebradiço. Apenas na UBS W havia vaso sanitário e mictório no banheiro masculino. A ventilação e iluminação nas três unidades eram adequadas, contudo na UBS Z a iluminação elétrica do banheiro não estava funcionando.

Em relação ao resíduo de lixo presente nas UBS, observou-se que todos os locais possuíam lixeiras com tampa acionada por pedal e armazenados de forma adequada, livres de insetos e roedores, exceto a UBS W que verificou-se presença de insetos.

Quanto as características dos cães, estudou-se 52 (48,5%) cães machos, 52 (48,5%) fêmeas e em três animais não foi descrito o sexo. Setenta e nove (73%) eram dóceis. Sessenta e quatro (59,8%) não eram castrados, 45 (42%) tinham porte médio

e 39 (36,4%) porte pequeno. Setenta e um por cento tinham pelos curtos. No que se refere à presença de parasitas, 74 (69,1%) dos cães apresentavam ectoparasitas.

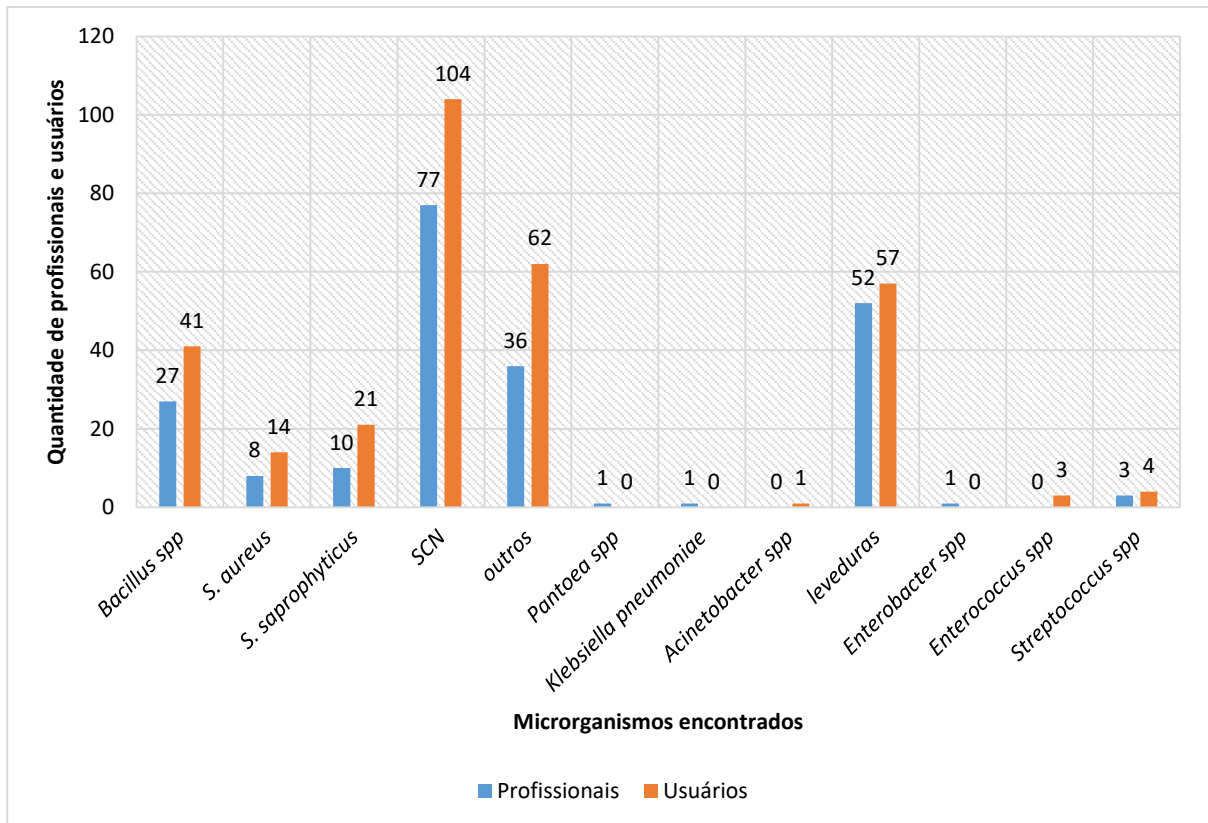
3.2 Identificação dos microrganismos

Ao todo, foram obtidos um total de 1.536 microrganismos (verão e inverno) das mãos de humanos (usuários e profissionais), dos ambientes das três UBS e de cães semidomiciliados. No entanto, os resultados foram expressos em “presença” ou “ausência”, uma vez que não foi realizada a quantificação dos isolados. A identificação dos microrganismos incluiu desde testes preliminares até ensaios mais avançados, como técnicas de sequenciamento, apesar disto, para alguns isolados não foi possível a identificação e estes foram agrupados na categoria “outros”.

Observamos na figura 1 que dos 82 profissionais de saúde, 77 (93,9%) continham *Staphylococcus* coagulase negativa (CoNS) em suas mãos, 52 (63,4%) leveduras e 27 (32,9%) *Bacillus* spp. Apesar da baixa frequência, *S. aureus* foi detectado em oito (9,7%) e *Streptococcus* spp. em três (3,6 %) profissionais de saúde. Um profissional foi detectado com *Pantoea* spp.

Ainda na figura 1, verifica-se que CoNS novamente foi o grupo mais presente em usuários, sendo detectado nas mãos de 104 (92,8%) indivíduos, seguido de leveduras em 57 (50,8%) e *Bacillus* spp. em 41 (36,6%). *S. aureus* foi detectado nas mãos de 14 pessoas.

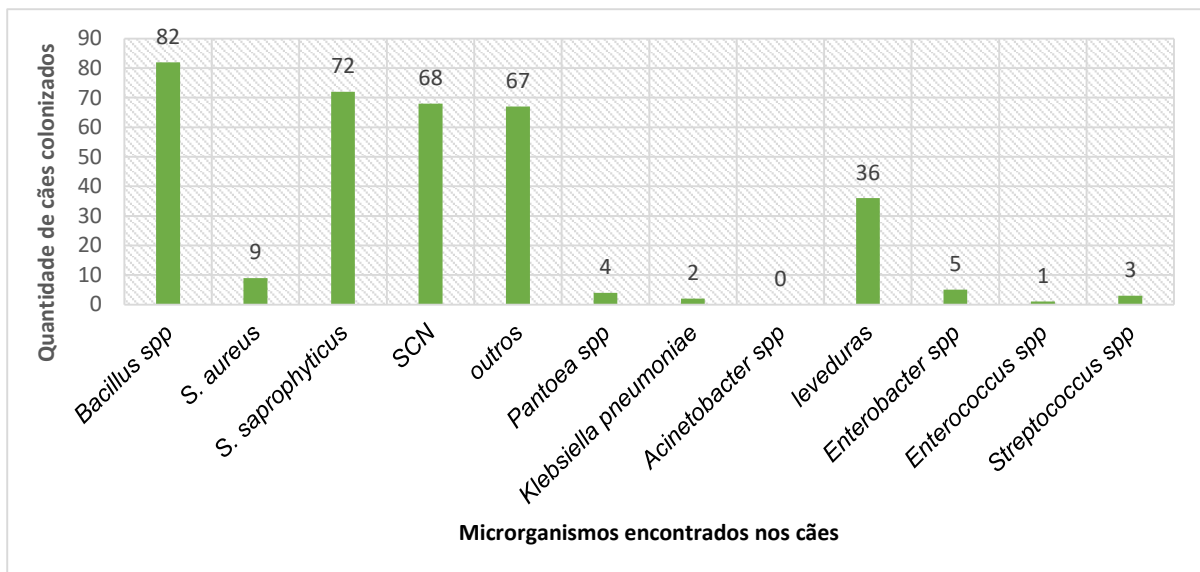
Figura 1. Número de profissionais de saúde e usuários que frequentam três Unidades Básicas de Saúde pertencentes ao município de Viçosa-MG (2019) que apresentaram microrganismos em suas mãos.



Fonte: Autora, 2023.

Dos 107 cães, detectamos *Bacillus* spp. em 82 (76%) animais, *S. saprophyticus* em 72 (67,2%) e CoNS em 68 (63,5%). É importante ressaltar a presença de *S. aureus* em nove (8,4%) cães e *K. pneumonia* em dois (1,8%). A presença de *Pantoea stewartii* e *Pantoea ananatis* foi constatada em três cães e em um, respectivamente.

Figura 2 – Número de cães semidociliados que vivem próximos as três UBS no município de Viçosa – MG (2019) que continham microrganismos na região do focinho.



Fonte: Autora, 2023.

Nos ambientes das UBS pôde-se detectar *Bacillus* spp., leveduras, *Staphylococcus saprophyticus* e outras bactérias CoNS, porém não foi encontrado *S. aureus*.

3.3 Perfil de resistência antimicrobiana

O antibiograma foi realizado para 38 *S. aureus* (Quadro S1) sendo 27 de origem humana e 11 de origem canina. Devido ao não isolamento de *E. coli*, optou-se por trabalhar com todos os 20 isolados Gram-negativos: sete *Pantoea* spp., oito *Enterobacter* spp., um *Acinetobacter pittii* e quatro *Klebsiella pneumoniae*.

Dos 38 isolados de *S. aureus*, 22 (57,9%) foram resistentes à penicilina, sendo dois, sete e 13 pertencentes às UBS W, UBS Y e UBS Z, respectivamente. Vinte e um (55,27%) isolados foram resistentes à eritromicina, sendo sete, oito e seis oriundos das UBS W, Y e Z, respectivamente. Todos os 38 isolados foram sensíveis para cloranfenicol, trimetoprim, norfloxacin, nitrofurantoína, sulfazotrim e linezolid (Tabela 3).

Tabela 3. Perfil de resistência antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* isolados de focinhos de cães e das mãos de humanos (profissionais e usuários) em três UBS de Viçosa-MG em 2019, com base no Clinical Laboratory Standard Institute (2022).

Antimicrobiano	Resistente		Sensível		Intermediária	
	n	(%)	n	(%)	n	(%)
Penicilina	22	57,9	16	42,1	0	0
Eritromicina	21	55,27	12	31,57	5	13,15
Tetraciclina	3	7,9	35	92,1	0	0
Sulfonamidas	3	7,9	22	57,9	13	34,2
Doxiciclina	1	2,6	36	94,8	1	2,6
Gentamicina	1	2,6	36	94,8	1	2,6
Clorafenicol	0	0	38	100	0	0
Linezolid	0	0	38	100	0	0
Nitrofurantoína	0	0	38	100	0	0
Norfloxacin	0	0	38	100	0	0
Sulfametoxazol	0	0	38	100	0	0
Trimetoprim	0	0	38	100	0	0
Ciprofloxacina	0	0	37	97,4	1	2,6

n = número absoluto.

O perfil de resistência antimicrobiana dos isolados Gram-negativos está contemplado na Tabela 4. O perfil de resistência completo encontra-se no Quadro S2. Verificou-se que dois (50%) isolados de *K. pneumoniae* foram resistentes à ampicilina, amoxicilina, nitrofurantoína e sulfonamidas. Um isolado foi multirresistente conferindo resistência as classes dos macrolídeos, betalactâmicos, nitrofurantoínas e sulfonamidas.

Perfil semelhante foi apresentado pelos isolados de *Enterobacter* spp., em que quatro (50%) foram resistentes à ampicilina e cinco (62,5%) foram à sulfonamidas e amoxicilina. Além disso, quatro (50%) isolados de *Enterobacter* spp. tiveram perfil “intermediário” para ciprofloxacina. Um isolado apresentou resistência a quatro classes de antibióticos a saber: macrolídeos, betalactâmicos, nitrofurantoína e sulfonamidas.

Para *Pantoea* spp., dois (50%) foram resistentes à ampicilina, sulfonamidas e amoxicilina. O único isolado de *Acinetobacter pittii* foi resistente à amoxicilina, ampicilina e nitrofurantoína.

Todos os isolados Gram-negativos foram sensíveis à tetraciclina, gentamicina, norfloxacin, sulfazotrim, cloranfenicol e doxiciclina.

Tabela 4. Perfil de resistência antimicrobiana de bactérias Gram-negativas provenientes de animais e humanos de três UBS de Viçosa-MG (2019) com base no Clinical Laboratory Standard Institute (2022).

Antibióticos testados	Microrganismos identificados (n=19)								
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>			<i>Enterobacter spp.</i>			<i>Pantoea spp.</i>		
	n = 4			n = 8			n = 7		
	R	S	I	R	S	I	R	S	I
Amoxicilina	2	1	1	5	2	1	2	5	0
Ampicilina	2	1	1	4	2	2	2	4	1
Nitrofurantoína	2	2	0	1	1	6	0	7	0
Sulfonamidas	2	2	0	5	2	1	2	5	0
Azitromicina	1	3	0	1	7	0	0	7	0
Estreptomicina	0	3	1	0	8	0	0	6	1
Trimetoprim	0	4	0	0	8	0	0	7	0
Tetraciclina	0	4	0	0	8	0	0	7	0
Gentamicina	0	4	0	0	8	0	0	7	0
Norfloxacin	0	4	0	0	8	0	0	7	0
Sulfazotrim	0	4	0	0	8	0	0	7	0
Cloranfenicol	0	4	0	0	8	0	0	7	0
Doxiciclina	0	4	0	0	8	0	0	7	0
Ciprofloxacina	0	1	3	0	4	4	0	6	1
Cefepime	0	3	1	0	7	1	0	7	0

n = número de microrganismos; R = resistente; S = sensível; I = intermediário

4 DISCUSSÃO

4.1 Perfil microbiano

Verificamos alta ocorrência de isolamento CoNS em mãos de profissionais de saúde, resultado semelhante ao encontrado por Custódio et al. (2009), em que obtiveram maior ocorrência de CoNS em 44,5% das amostras de mãos de profissionais de saúde de um hospital particular em Itumbiara, Goiás. O grupo dos CoNS, segundo Becker, Heilmann e Peters (2014), são agentes oportunistas típicos, representando um dos principais patógenos nosocomiais, tendo impacto substancial na saúde humana (HEILMANN; ZUEBUHR; BECKER, 2018). Segundo os autores,

essas espécies, que colonizam diferentes nichos da pele e mucosa humana e animal, frequentemente carregam fatores de virulência distintos e são capazes de se desenvolverem em superfícies artificiais, sendo considerados patógenos graves e que requerem programas de prevenção de infecção com disciplina de higiene em ambientes hospitalares (MICHALIK et al., 2020). Maríncola et al. (2021) afirmam que os CoNS nosocomiais são importantes por adquirirem resistência a vários antimicrobianos

Staphylococcus aureus também foi encontrado em profissionais de saúde, sua presença nos alerta para cuidados com higiene, seja pessoal ou das instalações em ambiente hospitalar. Sabe-se que aproximadamente 25% dos humanos são persistentemente colonizados por *S. aureus* (ALNASERI et al., 2015). Este agente é conhecido pelo seu potencial fenótipo de multirresistência apresentada em infecções clínicas, gerando complicações terapêuticas. Cepas de *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA) têm gerado grande preocupação entre as doenças infecciosas devido às altas taxas de morbidade e mortalidade apresentadas (HASSOUN; LINDEN; FRIEDMAN, 2017).

A presença de *Pantoea* spp. em profissional de saúde é incomum, sendo considerada uma praga para plantações de milho e gramíneas forrageiras (MARTINS; NORONHA, 2018). No entanto, o grupo *Pantoea* spp. é altamente diversificado cuja espécies são encontrados em ambientes aquáticos, terrestres e em associação com plantas, insetos, humanos e animais (WALTERSON; STAVRINIDES, 2015). Neste estudo, foi constatada a presença desse microrganismo em cães, o que sugere um possível contato entre profissionais de saúde e estes animais. A presença de *Pantoea* spp. nesses dois grupos nos alerta também para a uma possível participação de bactérias fitopatogênicas no processo de transmissão de genes de resistência antimicrobiana entre humanos e animais, que podem atingir por consequência os ambientes hospitalares.

O grupo de profissionais da saúde com maior contaminação por microrganismos foi o de Agentes Comunitários de Saúde (ACS), categoria com maior quantitativo dentre os profissionais. A elevada detecção de microrganismos nesses agentes pode ser atribuída a constantes visitas domiciliares aos usuários das UBS, que possibilitam um contato com maior número de pessoas da comunidade e de diferentes localidades. Os ACSs, geralmente costumam realizar as visitas em várias casas em um único dia. Esses profissionais relataram não utilizar luvas durante suas

atividades diárias e nem higienizar as mãos durante os atendimentos. Este dado requer atenção, pois estes profissionais podem atuar como veículos na disseminação de bactérias com potencial patogênico.

O ato de lavar as mãos é uma ação básica, que ainda carece de maior comprometimento por parte de todos os envolvidos no processo (MAGNAGO et al., 2019). Neste estudo, 52,44% (43) dos profissionais de saúde não haviam recebido treinamentos que abordassem a higienização de mãos, percentual preocupante. Alguns desses profissionais de saúde mantêm contato direto com usuários das UBS, devendo, portanto, passar por treinamentos de atualização e conscientização sobre higienização.

Verificou-se entre os usuários alta contaminação por *Bacillus* spp., leveduras e CoNS, além da presença de *S. aureus* em 14 pacientes. Embora a maioria das pessoas colonizadas por *S. aureus* permaneça assintomática, este patógeno por ser oportunista pode causar doenças potencialmente fatais (JENKINS; BEAN, 2020). Atualmente há relatos sobre o aumento das taxas de resistência aos antimicrobianos por *S. aureus* aos antimicrobianos e o aparecimento de cepas multirresistentes, o que dificulta o tratamento clínico de pacientes infectados (GUO et al., 2020).

No que se refere ao gênero *Bacillus* spp, algumas espécies assumem importância na saúde pública, a citar *Bacillus cereus*, como produtoras de toxinas (ABDEEN et al., 2020) que resultam em intoxicação alimentares em humanos.

Apesar da baixa ocorrência em usuários a presença de *Enterococcus* spp. têm sua importância, são as principais causas de infecções associadas aos cuidados de saúde em todo o mundo, em particular no trato urinário, tecidos moles e infecções associadas a dispositivos. A multirresistência é comum, o que prolonga o tempo de hospitalização, aumenta o custo do tratamento e aumenta os riscos de falha do tratamento e morte (GARCIA-SOLACHE; RICE, 2019). Isso é observado nas infecções causadas por *Enterococcus faecium* que têm aumentado significativamente nas últimas décadas (GAGETTI et al., 2019). Por serem microrganismos comensais do trato gastrointestinal humanos (GARCIA-SOLACHE; RICE, 2019), sugere-se que a presença destas bactérias em usuários associa a possíveis falhas de higienização das mãos.

A alta prevalência de isolados microrganismos em usuários pode estar relacionada ao baixo nível de escolaridade dos participantes, associado a falta de informações e orientações sobre a importância de práticas corretas de higienização

das mãos, uma vez que nenhum dos entrevistados havia recebido treinamento. A falta de um treinamento sobre a correta higienização das mãos, justifica o fato de 77 (69,3%) usuários relatarem não realizar qualquer procedimento para higienização das mãos, o que possivelmente, pode ter contribuído para os níveis elevados de contaminação observada. A higienização das mãos é de elevada importância, sendo a estratégia mais relevante na prevenção de infecções associadas à assistência à saúde (IRAS) (NHMRC, 2019).

Dentre os entrevistados que mencionaram realizar higienização das mãos, a maioria afirmou utilizar algum tipo de produto durante o procedimento, sendo o uso do sabão o produto citado na maioria das respostas. No entanto, 4 (3,6%) relataram lavar as mãos apenas com água. A água por si só, não tem atividade para uma higienização satisfatória e se faz necessário a utilização de um produto que preferencialmente tenha ação germicida ou bactericida. Os desinfetantes para as mãos à base de álcool são ideais pois funcionam matando os organismos na pele, ao invés de removê-los fisicamente (BOLON, 2016)

Este estudo também revelou que 50% dos profissionais de saúde possuíam algum tipo de animal de estimação, em que cães e gatos foram os mais mencionados. A proximidade entre tutor e animais tem se firmado cada vez mais nos últimos anos. Este fato, deve-se a vários fatores como ao que muitas pessoas estão optando por não terem filhos e encontram nos animais uma companhia. No entanto, com esse encurtamento das relações entre animais e ser humano tem contribuído para um maior risco de transmissão de patógenos zoonóticos (OVERGAAUW et al., 2020), além da disseminação de bactérias resistentes a antimicrobianos. Esse contato entre animais e tutores tem sido alvo de pesquisas. Overgaauw et al. (2009) demonstraram que metade dos tutores de animais permite que o animal lamba seus rostos. Sessenta por cento dos animais de estimação visitam o quarto; 45% dos cães e 62% dos gatos são permitidos na cama.

Além disso, 63 (56,75%) dos usuários possuem algum tipo de animal de estimação, sendo cães e gatos a maior prevalência. Sabe-se que essa proximidade possibilita a transmissão e/ou troca de patógenos entre animais e seus tutores. Cães que mantêm contato com seus tutores podem influenciar na variabilidade da microbiota dos seus tutores (WETZELS et al, 2021).

Quanto aos achados microbiológicos verificados nos focinhos dos cães participantes do estudo, destaca-se a presença de agentes de importância em saúde

pública, como *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus saprophyticus* e *S. aureus*. Pantosti (2012) comprovam que *S. aureus* isolados de animais de companhia são principalmente de origem humana e são transmitidas entre tutores e seus animais. Apesar desses animais viverem praticamente na rua, não descartamos a existência de contato entre usuários e esses animais, uma vez que estes vivem nas redondezas das UBS e muitas vezes adentram o local e mantêm contato com os usuários do sistema.

Segundo Lee et al. (2015), *K. pneumoniae* é uma bactéria clinicamente importante como causadora de infecções nosocomiais graves, tais como septicemia, pneumonia, infecção de tecidos moles, infecção do trato urinário, entre outros. Estudo realizado por Wareth e Neubauer (2021) destaca *K. pneumoniae* multirresistente com vários genes de resistência antimicrobiana em amostras de animais, alimentos e meio ambiente. Ainda segundo estes autores, no contexto de saúde única, esses resultados são alarmantes e apontam o risco de disseminação de genes de resistência entre animais, meio ambiente e profissionais de saúde.

Além destes agentes acima citado, verificou-se a presença de *Staphylococcus saprophyticus* em 72 (65,45%) animais, isso tem importância, uma vez que estudo realizado por Paiva-Santos, Sousa e Giambiagi-de-Marval (2018) sugerem que cepas de *S. saprophyticus* de origem não humana tem o mesmo potencial para colonizar o trato urinário humano. Ou seja, isso significa os cães podem ser transmissores desse agente para o homem.

O cão é considerado um animal doméstico que tem sido criado como de estimação por muitos, e em alguns casos vivem soltos em ruas, podendo ser veículo de transmissão de patógenos para humanos. A presença de agentes em cães semidomiciliados pode ser devido ao ambiente, pois em geral, vivem nas ruas onde não possuem nenhuma assistência à saúde estando sujeitos à contaminação por vários microrganismos.

No que diz respeito ao ambiente das UBS, algumas falhas podem ter contribuído para o perfil microbiológico apresentado na pesquisa. Não havia papel toalha em nenhuma das três unidades. Não havia sabão líquido para higienização das mãos nas unidades W e Z. Isso é preocupante, já que a falta de infraestrutura e de suprimentos se tornam barreiras para a não adesão a higiene das mãos por profissionais de saúde (ATAIYERO; DYSON; GRAHAM, 2019).

Esse fato pode ter influenciado negativamente na lavagem das mãos dos profissionais de saúde, o que consequentemente também tenha influenciado na quantidade de microrganismos observada nos profissionais dessas UBS, pois o maior quantitativo de *Bacillus* spp, CoNS e *S. aureus* foi proveniente das UBS Y e UBS Z. Magnago et al. (2019) destaca bem a importância da higienização das mãos em ambientes hospitalares, sendo fundamental para prevenir danos relacionados à assistência à saúde.

Pesquisa realizada por Boiochi, Davies e Hilton (2019) em setes hospitais no Reino Unido identificou insetos como carreadores de bactérias, em que a maior prevalência foi de bactérias do gênero *Bacillus* spp. (24%) seguido de *Staphylococcus* spp. (19%), comprovando a importância da manutenção dos ambientes de saúde limpos e ausentes de insetos.

Sabe-se que o uso de desinfetante para mãos à base de álcool tem sido uma ótima escolha em locais com poucos recursos e tem se mostrado bastante eficaz, tanto a nível de pacientes como de ambiente hospitalar (SAITO et al., 2017). Através da implementação de práticas eficazes de higienização correta das mãos, podem prevenir três em cada quatro mortes relacionadas à resistência antimicrobiana que ocorrem em unidades de saúde (OPAS, 2021).

4.2 Resistência a antimicrobianos

Os isolados de *S. aureus* encontrados em mãos de profissionais de saúde, usuários e em cães próximos a UBS apresentaram resistência a eritromicina e penicilina. Resultado semelhante encontrado por Stefanaki et al. (2017) que observaram alta resistência para a benzilpenicilina (71,9%) e eritromicina (34,3%) de isolados provenientes de pacientes com infecções de pele e tecidos moles que deram entrada em um hospital na Grécia. Kobayashi, Sadoyama e Vieira (2009), ao pesquisarem o perfil de sensibilidade antimicrobiana para isolados clínicos de *S. aureus* em um hospital público de Goiânia, estado de Goiás, verificaram resistência à penicilina de 97,6% e eritromicina de 70,4%.

A resistência elevada à eritromicina pode ser devido ao maior uso desta droga no tratamento de infecções humanas causadas por *Staphylococcus aureus* (ROJAS HERNANDEZ, 2001). Assim como ao uso de antibióticos pertencentes aos macrolídeos semissintéticos como azitromicina e claritromicina, para tratar infecções

causadas por outras bactérias que não sejam *S. aureus* pode contribuir para que haja resistência à eritromicina em isolados clínicos (FOSTER et al., 2017).

À medida que as penicilinas se tornaram um componente essencial no âmbito hospitalar, os patógenos Gram-positivos foram as primeiras bactérias a apresentar resistência em proporções de surto (BUSH; BRADFORD, 2020). Alguns dos mecanismos bacterianos no desenvolvimento de resistência contra os β -lactâmicos podem ser através da alteração da estrutura das proteínas de ligação das penicilinas (PBPs) para reduzir a atração entre os antibióticos e as PBPs ou, na grande maioria, pela produção de β -lactamase, que é uma enzima capaz de destruir o anel β -lactâmicos (ZAPUM, CONTRERAS-MARTEL; VERNET, 2008; BUSH e BRADFORD, 2020).

Destacamos que um isolado de *S. aureus*, proveniente de um profissional de saúde foi multirresistente sendo resistente à eritromicina, penicilina e gentamicina. Este último, é um dos antibióticos importantes usado em todo o mundo para tratamento de infecções por *S. aureus* (RAHIMI, 2016). Isso nos alerta para a importância da adesão de profissionais a higienização das mãos, a fim de evitar a transmissão de potenciais patógenos resistentes.

A resistência de *K. pneumoniae* detectada para ampicilina, amoxicilina e sulfonamidas foi comum à encontrada por Sousa et al. (2019), que detectaram em *Klebsiella pneumoniae* isoladas de animais domésticos e silvestres resistência de 94% à ampicilina e 93% à amoxicilina e sulfonamidas. Ampicilina e amoxicilina são considerados fármacos pertencentes ao grupo dos beta-lactâmicos. Hennequin e Robin (2016) afirmam que o primeiro mecanismo de resistência aos β -lactâmicos em *K. pneumoniae* é a produção de β -lactamase, seguida de alterações na permeabilidade e extrusão por bombas de efluxo.

Em *Enterobacter* spp., constatou-se perfil de resistência também aos antimicrobianos ampicilina, amoxicilina e sulfonamidas, sendo que um isolado de origem canina apresentou perfil de multirresistência. O que é preocupante, uma vez que esse cão pode disseminar o patógeno para outros hospedeiros. Conforme Davin-Regli, Lavigne e Pagès (2019), estes patógenos estão frequentemente associados à esse fenótipo de multirresistência, principalmente em decorrência à sua adaptação ao ambiente hospitalar e à facilidade de adquirir inúmeros elementos genéticos móveis.

A resistência de bactérias Gram-negativas às sulfonamidas pode ser atribuída ao uso bem antigo desse antimicrobiano no tratamento de diversas infecções

bacterianas. Daí sua aplicação ser comumente utilizada em associação com trimetoprim (GRIFFITH et al., 2018). Quanto ao mecanismo de resistência envolvido, está relacionado à presença de genes plasmidiais, *sul1*, *sul2* e *sul3* (SKÖLD, 2000), que são facilmente transferíveis entre diferentes hospedeiros.

No gênero *Pantoea* spp, entre os sete isolados, apenas dois apresentaram resistência à ampicilina, amoxicilina e sulfonamidas. Existem poucos estudos voltados para mecanismo de resistência neste gênero, pois *Pantoea stewartii*, espécie encontrada, está relacionada como agente casual da murcha do milho doce (ROPER, 2011), sendo considerada uma bactéria fitopatogênica. Mais pesquisas envolvendo este grupo são necessárias para verificar o verdadeiro papel deste patógeno na resistência bacteriana em ambientes de assistência à saúde. Vale ressaltar que mesmo bactérias não patogênicas podem disseminar genes de resistência pelos processos clássicos conhecidos.

4.3 Contexto social

A presença feminina observada em nossa pesquisa foi consideravelmente alta, tanto entre usuários como em profissionais de saúde. No primeiro caso, isso pode estar atribuído pela maior preocupação das mulheres com sua saúde. Britto e Camargo (2011) valida esta informação ao constataram que as mulheres realizam *check-ups* regulares e procuram a consulta independentemente do estado de saúde. Enquanto para as profissionais de saúde, isso se deve possivelmente pela maior escolha das mulheres por profissões ligadas ao cuidado tais como enfermagem, auxiliar de dentista. Independente da razão para a representatividade feminina, esses dados nos permite projetar ações voltadas para prevenção e controle de infecções sejam direcionadas para o público feminino. Pesquisa realizada por Póvoas et al. (2019) reforça essa indicação, ao demonstrarem que mulheres são mais infectadas, por exemplo, por microrganismos do trato urinário do que homens, confirmando essa predisposição feminina. Em nossa pesquisa, a presença de *Staphylococcus aureus* foi maior entre as mulheres.

Outra informação importante na elaboração das ações, se refere ao grau de escolaridade observada pelos participantes, pela qual verificou-se que a maior parte dos usuários foi composta por pessoas de nível fundamental incompleto, isso é reflexo ainda, de um país em desenvolvimento, em que peca em políticas públicas, como as

direcionadas à educação. A falta de conhecimento pode influenciar negativamente outras áreas, como da saúde. Cuidados higiênicos são fundamentais para evitar contaminações e aquisição de doenças que tenham como agentes, bactérias multirresistentes. Partindo desta percepção, as campanhas educativas permanentes devem ser voltadas para este público, adotando ferramentas simples e de fácil compreensão, como uso de cartazes, panfletos, palestras de vocabulário fácil, entre outras.

Dados obtidos na pesquisa, revelaram que tanto usuários como profissionais de saúde possuem cães e gatos. Pomba et al. (2016) afirmam que seres humanos podem adquirir bactérias resistentes a antimicrobianos não apenas de animais de produção, mas também através do contato com animais de companhia. Esta transferência ocorre por meio do contato físico entre humanos e animais (HAMAME et al., 2022). Desta forma, é necessário orientar tutores sobre o cuidado com seus animais, levando-os a consultas periódicas com médicos veterinários de modo a prevenir o adoecimento dos animais. Aliados a isso, 44 participantes, entre usuários e profissionais, afirmaram que seus animais têm acesso à rua, o que pode aumentar o risco de exposição à patógenos que carregam importantes genes de resistência, devendo ser orientados a evitarem que tenham acesso à rua.

Ainda no que se refere à contaminação em animais, detectou-se presença de bactérias em cães semidomiciliados, cães estes que mantinham contato com os usuários das UBS ao adentrarem o estabelecimento, o que foi comprovado pela observação durante a entrevista. Jung et al. (2020) ao verificar perfis de distribuição de resistência antimicrobiana de espécies bacterianas isoladas de cães errantes e cães internados em hospitais concluíram que essas bactérias expressam resistência a pelo menos uma droga e podem atuar como um reservatório de resistência antimicrobiana (RAM). Portanto, são necessários mais programas de controle desses animais de ruas, como campanhas de castração no intuito de diminuir o número de animais de ruas e conseqüentemente o contato com pessoas. Palestras conscientizando para não abandono de animais também seria uma alternativa plausível.

Informações sobre higienização revelaram que todos (usuários e profissionais) têm o hábito de lavar as mãos. No entanto, muitos não descreveram como é realizado o procedimento, indicando não conhecimento da técnica correta ou desleixo para a atividade. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa (2007)

descreve um protocolo padrão para higienização simples das mãos, que abrange 11 etapas ordenadas e sistemáticas, que vai desde a abertura da torneira até a secagem das mãos. Dessa forma, é importante ter a divulgação dessa informação fixada nos vários setores das UBS, para que tanto a comunidade como os profissionais de saúde tenham acesso e pratiquem a higienização correta das mãos, diminuindo o risco de aquisição de patógenos graves.

Apenas 9,9% e 47,56%, dos usuários e profissionais de saúde, respectivamente, obtiveram algum treinamento sobre higienização das mãos. É compreensível quando se refere aos usuários, considerando o nível de escolaridade dos mesmos, porém, quanto aos profissionais de saúde, isso é inadmissível, pois, espera-se que este grupo seja detentor de conhecimentos básicos, como sobre higienização, por ser um agente importante na propagação de informação e constituinte fundamental no controle da RAM em locais de assistência à saúde. Mediante isso, indicamos que a gestão dessas unidades de saúde proporcione capacitações frequentes e permanentes para treinamentos desses profissionais, assim como, campanhas educativas envolvendo os usuários das UBS.

A caracterização das instalações sanitárias dos ambientes das UBS trouxe informações relevantes. Foi possível detectar falta de material de auxílio na higiene das mãos, como papel toalha; torneiras com contato manual, banheiros sem mictórios, o que facilita a falta da adesão à higiene das mãos e sujidade do local. Possibilitar uma infraestrutura adequada em cada UBS é fundamental para a correta higienização das mãos, cabendo à gestão das unidades a responsabilidade de garantir as condições necessárias para isso. Pois, executando uma higienização correta das mãos (usuários e profissionais de saúde) é possível controlar a contaminação por microrganismos importantes e sua conseqüente propagação para terceiros.

A disseminação de bactérias resistentes aos antibióticos ocorre tanto no ambiente hospitalar como na comunidade (SANTOS, 2004). Um dos desafios para combater resistência antimicrobiana (RAM) é entender o verdadeiro problema, particularmente em locais onde a vigilância é mínima e os dados são escassos (MURRAY et al., 2022). As Unidades básicas de saúde (UBS) estão dentre esses locais pouco assistidos no que se refere às pesquisas sobre RAM, mas que representam um ambiente que intercala as três esferas da saúde única e que é propício a disseminação de microrganismos. Estudar este ambiente de atenção à saúde, trouxe dados relevantes sobre microrganismos encontrados, assim como seu

perfil de resistência, dados sociodemográficos (usuários e profissionais de saúde), condições de infraestrutura das UBS, dentre outros, que podem auxiliar no entendimento ao surgimento e disseminação das RAM dentro desse contexto.

As estratégias de prevenção e controle de infecções continuam sendo a base para combater as disseminações da RAM (MURRAY et al., 2022). Assim, baseado nos dados obtidos neste estudo, acredita-se que seja possível lançar estratégias de prevenção e controle de infecções nas UBS através de campanhas educativas permanentes para usuários e profissionais de saúde, abordando diversos temas tais como: higienização das mãos, controle de resistência, uso racional de antimicrobianos e prevenção de doenças.

5 CONCLUSÕES

Existe uma diversidade de microrganismos presentes em animais (cães semidomiciliados), humanos (usuários e profissionais de saúde) e nos ambientes das UBS de Viçosa-MG.

Staphylococcus aureus resistentes a penicilina e eritromicina e bactérias Gram-negativas resistentes a ampicilina, sulfonamidas e amoxicilina estão presentes entre profissionais de saúde, usuários das UBS e entre cães semidomiciliados que vivem próximos às UBS.

Os perfis socioeconômicos dos usuários e profissionais de saúde apresentados demonstram dados importantes na elaboração de ações de adesão a higienização das mãos e consequente controle de microrganismos nas UBS.

REFERÊNCIAS

- ABDEEN, E. E. *et al.* Prevalence of Virulence Determinants among *Bacillus cereus* Isolated from Milk Products with Potential Public Health Concern. **Pakistan Journal Biological Sciences: PJBS**, v. 23, n. 3, p. 206-212, 2020.
- ALNASERI H. *et al.* Inducible Expression of a Resistance-Nodulation-Division-Type Efflux Pump in *Staphylococcus aureus* Provides Resistance to Linoleic and Arachidonic Acids. **Journal Bacteriology**, v. 197, n. 11, p.1893-905, 2015.
- ATAIYERO, Y.; DYSON, J.; GRAHAM, M. Barriers to hand hygiene practices among health care workers in sub-Saharan African countries: A narrative review. **American Journal of Infection Control**, v. 47, n.5, p. 565-573, 2019.
- BAUER, A. W. *et al.* Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal Clinical Pathology**, v. 45, n. 4, p. 493-496, 1966.
- BHAT, A. H. Bacterial zoonoses transmitted by household pets and as reservoirs of antimicrobial resistant bacteria. **Microbial Pathogenesis**, v. 155, p.1-8, 2021.
- BOIOCCHI, F.; DAVIES, M. P.; HILTON, A. C. An Examination of Flying Insects in Seven Hospitals in the United Kingdom and Carriage of Bacteria by True Flies (Diptera: Calliphoridae, Dolichopodidae, Fanniidae, Muscidae, Phoridae, Psychodidae, Sphaeroceridae). **Journal Medical Entomology**, v. 56, n. 6, p.1684-1697, 2019.
- BOLON, M. K. Hand Hygiene: An Update. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 30, n. 3, p. 591-607, 2016.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Higienização das mãos em serviços de saúde**/ Agência Nacional de Vigilância Sanitária. – Brasília: Anvisa, 2007. 52 p.
- BRITO, A. M. M.; CAMARGO, B. V. Representações sociais, crenças e comportamentos de saúde: um estudo comparativo entre homens e mulheres. **Temas psicol.** [online]. v. 19, n. 1, p. 283-303, 2011.
- BUSH, K.; BRADFORD, P. A. Epidemiology of β -Lactamase-Producing Pathogens. **Clinical Microbiology Reviews**, v.33, n.2, p.1-37, 2020.
- CUSTÓDIO, J. *et al.* Avaliação microbiológica das mãos de profissionais da saúde de um hospital particular de Itumbiara, Goiás. **Revista de Ciências Médicas**, v. 18, n.1, p.7-11, jan./fev., 2009.
- CLSI - CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. 28th ed. CLSI supplement M100. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018.
- CLSI - CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. 28th ed. CLSI supplement M100-ED32:2022. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2022.

DAVIN-REGLI, A.; LAVIGNE, J. P.; PAGÈS, J. M. *Enterobacter* spp.: Update on Taxonomy, Clinical Aspects, and Emerging Antimicrobial Resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 32, n.4, p. 1-32, 2019.

FOSTER, T. J. Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* current status and future prospects. **FEMS Microbiology Reviews**, v.41, n.3, p. 430-449, 2017.

FS- Fundação Saúde. Sistema Único de Saúde completa 30 anos de regulamentação. **Fs.rj.gov.br**. Disponível em: <http://www.fs.rj.gov.br/sistema-unico-de-saude-sus-completa-30-anos-de-sua-regulamentacao/>. Acesso em: 16.02.2023.

GAGETTI, P. *et al.* Resistance to β -lactams in *Enterococci*. **Revista Argentina de Microbiologia**, v. 51, n. 2, p.179-183, 2019.

GARCÍA-SOLACHE, M.; RICE, L. B. The *Enterococcus*: a Model of Adaptability to Its Environment. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 32, n. 2, p. 1-28, 2019.

GRIFFITH, E. C. *et al.* The Structural and Functional Basis for Recurring Sulfa Drug Resistance Mutations in *Staphylococcus aureus* Dihydropteroate Synthase. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1-16, 2018.

GUO, Y. *et al.* Prevalence and Therapies of Antibiotic Resistance in *Staphylococcus aureus*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v.10, p. 1-11, 2020.

HAMAME, A. *et al.* Mobile Colistin Resistance (*mcr*) Genes in Cats and Dogs and Their Zoonotic Transmission Risks. **Pathogens**, v.11, n.6, p.1-20, 2022.

HASSOUN, A.; LINDEN, P. K.; FRIEDMAN, B. Incidence, prevalence, and management of MRSA bacteremia across patient populations-a review of recent developments in MRSA management and treatment. **Critical Care**, v. 21, n.1, p.1-10, 2017.

HEILMANN, C.; ZIEBUHR, W.; BECKER, K. Are coagulase-negative *staphylococci* virulent? **Clinical Microbiology and Infection**, v. 25, n.9, p.1071-1080, 2019.

HENNEQUIN, C.; ROBIN, F. Correlation between antimicrobial resistance and virulence in *Klebsiella pneumoniae*. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 35, p. 333-341, 2016.

JUNG, W. K. *et al.* Distribution and antimicrobial resistance profiles of bacterial species in stray dogs, hospital-admitted dogs, and veterinary staff in South Korea, **Preventive Veterinary Medicine**, v.184, 2020,

JENKINS, C. L.; E BEAN, H. D. Influence of media on the differentiation of *Staphylococcus* spp. By volatile compounds. **Journal of Breath Research**, v.14, n. 1, p. 1-24, 2020.

KOBAYASHI, C. C. B. A.; SADOYAMA, G.; E VIEIRA, J. D. G. Determinação da resistência antimicrobiana associada em isolados clínicos de *Staphylococcus aureus*

e *Pseudomonas aeruginosa* em um hospital público de Goiânia, estado de Goiás. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.42, n. 4, p. 404-410, julho 2009.

LEE, W.H. *et al.* Vaccination with *Klebsiella pneumoniae*-derived extracellular vesicles protects against bacteria-induced lethality via both humoral and cellular immunity. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 47, n. 9, p.1-9, 2015.

MAGNAGO, T. S. B. S. *et al.* Infraestrutura pra higienização das mãos em um hospital universitário. **Revista Gaúcha de Enfermagem**, v. 40, p.1-7, 2019.

MARCHETTI, L. *et al.* Pet and Stray Dogs as Reservoirs of Antimicrobial-Resistant *Escherichia coli*. **International Journal Microbiology**, v. 2021, p.1-8, 2021.

MARINCOLA, G. *et al.* Antimicrobial Resistance Profiles of Coagulase-Negative *Staphylococci* in Community-Based Healthy Individuals in Germany. **Frontiers in Public Health**, v. 9, p.1-9, 2021.

MARTINS, O. M.; NORONHA, S. E. de. ***Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* (Enterobacteriales: Enterobacteriaceae)**. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia-Capítulo em livro científico (ALICE) (2018). Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/198799/1/Livro-PragasPriorizadas-1ed-2018-Ainfo-ver-final-1-339-351.pdf>. Acesso em: 15.02.2023.

MICHALIK, M. *et al.* Coagulase-negative *staphylococci* (CoNS) as a significant etiological factor of laryngological infections: a review. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v.19, p. 1-10, 2020.

MURRAY, C. J. L. *et al.*, Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. **The Lancet**, v. 399, n.10325, p. 629-655, 2022.

NHMRC - National Health and Medical Research Council, **Australian Guidelines for the Prevention and Control of Infection in Healthcare**, May 2019.

OPAS – Organização Pan-Americana da Saúde. OMS pede melhor higienização das mãos e outras práticas de controle de infecções. 5 de maio de 2021. **Paho.org**. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/noticias/5-5-2021-oms-pede-melhor-higienizacao-das-maos-e-outras-praticas-controle-infeccoes>. Acesso em: 20.05.2022.

OMS - Organização Mundial de Saúde. **Novo relatório pede ação urgente para evitar crise de resistência antimicrobiana**. Disponível em: <https://www.who.int/news/item/29-04-2019-new-report-calls-for-urgent-action-to-avert-antimicrobial-resistance-crisis#:~:text=Currently%2C%20at%20least%20700%2C000%20people,die%20from%20multidrug%2Dresistant%20tuberculosis>. Acesso em: 14 de junho de 2022.

O'NEILL, J. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. **Government of the United Kingdom**, May 2016.

OVERGAAUW, P. A. M. et al. *One Health Perspective on the Human-Companion Animal Relationship with Emphasis on Zoonotic Aspects*. **International Journal Environmental Research Public Health**, v. 17, n.11, p. 1-29, 2020.

OVERGAAUW, P. A. et al. Zoonotic parasites in fecal samples and fur from dogs and cats in The Netherlands. **Veterinary Parasitology**, v.163, p.115–122, 2009.

PAIVA-SANTOS, W.; DE SOUSA, V. S.; GIAMBIAGI-DEMARVAL, M. Occurrence of virulence-associated genes among *Staphylococcus saprophyticus* isolated from different sources. **Microbial Pathogenesis**, v. 119, p. 9-11, 2018.

PANTHEE, B. et al. Environmental and Human Microbiome for Health. **Life (Basel)**, v. 12, n. 3, p.1-15, 2022.

PANTOSTI, A. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* associated with animals and its relevance to human health. **Frontiers in Microbiology**, v.3, p.1-12, 2012.

POMBA, C. et al. Public health risk of antimicrobial resistance transfer from companion animals. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 72, n. 4, p. 957–968, 2017.

PÓVOA, C. P. et al. Evolução da resistência bacteriana em infecção comunitária do trato urinário em idosos. **Revista de epidemiologia e controle de infecção**, v. 9, n. 1, p. 08-14.

PRESTINACI, F.; PEZZOTTI, P.; PANTOSTI, A. Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon. **Pathogens and Global Health**, v.109, nº07, p. 309- 318, 2015.

RAHIMI, F. Characterization of Resistance to Aminoglycosides in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains Isolated From a Tertiary Care Hospital in Tehran, Iran. **Jundishapur Journal Microbiology**, v. 9, n.1, p.1-6, 2016.

ROCA, I. et al. The global threat of antimicrobial resistance: science for intervention. **New Microbes New Infectious**, v. 6, p. 22-29, 2015.

ROJAS HERNANDEZ, N. M. Patrones de drogorresistencia de cepas de *Staphylococcus aureus* de origen clínico humano. **Revista Cubana de Medicina Tropical** [online]. v.53, n.1, p.53-58, 2001.

ROPER, M. C. *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*: lessons learned from a xylem-dwelling pathogen of sweet corn. **Molecular Plant Pathology**, v. 12, n. 7, p. 628-637, 2011.

SAITO, H. et al. Alcohol-based hand rub and incidence of healthcare associated infections in a rural regional referral and teaching hospital in Uganda ('WardGel' study). **Antimicrobial Resistance & Infection Control**. v. 6, p. 1-12, 2017.

SANTOS, N. Q. A resistência bacteriana no context da infecção hospitalar, **Texto Contexto Enferm**, v. 13 (n.esp), p. 64-70, 2004.

SANTOS, I. C. *et al.* Pet dogs as reservoir of oxacillin and vancomycin-resistant *Staphylococcus* spp. **Research in Veterinary Science**, v.143, p. 28-32, 2022.

SOUSA, A.T.H.I. *et al.* Perfil de resistência antimicrobiana de *Klebsiella pneumoniae* isoladas de animais domésticos e silvestres. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 71, n. 02, p. 584- 593, 2019.

SKÖLD, O. Sulfonamide resistance: mechanisms and trends. **Drug Resist Updat**, v.3, n. 3, p. 155-160, 2000.

STEFANAKI, C. *et al.* Six-Year Retrospective Review of Hospital Data on Antimicrobial Resistance Profile of *Staphylococcus aureus* Isolated from Skin Infections from a Single Institution in Greece. **Antibiotics (Basel)**, v. 6, n.4, p.1-8, 2017.

WALTERSON, A. M.; STAVRINIDES, J. *Pantoea*: insights into a highly versatile and diverse genus within the *Enterobacteriaceae*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 39, n. 6, p.968-984, 2015.

WARETH, G., NEUBAUER, H. The Animal-foods-environment interface of *Klebsiella pneumoniae* in Germany: an observational study on pathogenicity, resistance development and the current situation. **Veterinary Research**, v.52, p. 1-14, 2021.

WETZELS, S.U. *et al.* Wolves, dogs and humans in regular contact can mutually impact each other's skin microbiota. **Scientific Reports**, n. 11, p. 1-11, 2021.

ZAPUN, A.; CONTRERAS-MARTEL, C.; VERNET, T. Penicillin-binding proteins and β -lactam resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 32, n.2, p.361–385, 2008.

CAPÍTULO II

**Sistemas de efluxo multidrogas e disseminação da resistência:
Staphylococcus aureus e bactérias gram-negativas isoladas das Unidades
Básicas de Saúde no contexto da saúde única**

1 INTRODUÇÃO

A descoberta dos antibióticos foi um marco significativo na história da medicina, uma vez que permitiu salvar milhares de vidas. No entanto, com o passar do tempo também foi possível verificar que as bactérias desenvolveram diversos mecanismos de defesa para resistir aos efeitos dos antibióticos (VARGIU et al., 2016), mecanismos estes conhecidos como resistência bacteriana.

Os mecanismos de resistência bacteriana incluem: inativação de antibióticos por meio de modificação ou degradação enzimática; mudanças no sítio alvo da droga alterando a afinidade aos antibióticos; mudanças na permeabilidade da droga através de alterações que afetam a superfície da célula bacteriana e por fim, efluxo ativo de drogas das células bacterianas (NISHIRO et al., 2021). Piddock (2019) define sistemas de efluxo como proteínas de membranas encontradas em todos os tipos de células, expelindo assim, diversos substratos acumulados dentro da célula do meio intracelular para o extracelular. Estudo comprova que as bactérias podem utilizar os sistemas de efluxo como mecanismos de defesa na expulsão de compostos tóxicos (HENDERSON, et al., 2021) e assim participam da virulência bacteriana e autoproteção contra poluentes ambientais (HUANG et al., 2022).

Os sistemas de efluxo clinicamente relevantes podem ser agrupados em famílias estruturais, que utilizam diferentes recursos energéticos para seu funcionamento, como hidrólise de ATP ou força próton-motriz fornecida por gradiente de íons eletroquímicos (HERNANDO-AMADO et al., 2016). As principais famílias são: superfamília ATP- Binding Cassette (ABC), família Multidrug and Toxic Compound Extrusion (MATE), superfamília Major Facilitator (MFS), família Resistance Nodulation and Cell Division (RND) e família Small Multidrug Resistance (SMR), (HUANG et al., 2022; VAN BAMBEKE et al., 2003), superfamília de Efluxo Composto Antimicrobiano Proteobacteriano (PACE) e a família de transportadores de p-aminobenzoil-glutamato (AbgT) relacionada ao transporte de sulfonamidas (HASSAN et al., 2018) .

Alguns sistemas de efluxo podem exportar antimicrobianos específicos (sistema de efluxo droga-específico) e outros podem expelir antimicrobianos de diferentes classes, conhecidas como sistemas de efluxo multidrogas (SEM) (ABD EL-BAKY et al., 2019). Diferentes famílias dos SEM podem estar presentes em determinados gêneros/espécies bacterianos enquanto outras não.

Em *S. aureus*, os sistemas de efluxo multidrogas são representados pelas famílias MFS, SMR, MATE e ABC. Sendo que os sistemas da família MFS têm sido os mais extensivamente estudados entre os estafilococos e incluem as proteínas transportadoras cujo genes são *norA*, *norB*, *norC*, *mdeA*, *sdrM*, *lmrS*, *qacA* e *qacB* (JANG, 2016).

Em bactérias Gram-negativas, estas famílias estão presentes e distribuídas entre os diversos isolados cujo genes são *norM* (família MATE) em *Neisseria* spp. e *emrB* (MFS), *MacAB-TolC* (ABC), *AcrAB-TolC* (RND) em *Escherichia coli* (POOLE, 2007). Contudo, dentre os sistemas de efluxo multidrogas, o RND desempenha um papel fundamental na resistência a multidrogas em bactérias dos gêneros *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Burkholderia* e em outras Gram-negativas (VARGIU et al., 2016). Estes sistemas são formados por uma proteína de membrana interna, uma proteína de membrana externa e uma proteína de fusão de membrana periplasmática (HERNANDO-AMADO et al., 2016).

Staphylococcus aureus, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* têm sido relacionadas como as principais bactérias patogênicas em hospitais, despertando grande preocupação na sociedade para o surgimento de cepas pan-resistentes, quando os patógenos são resistentes a todos os antibióticos disponíveis, tornando as infecções intratáveis (LIU; QIN, 2022).

O estudo de resistência envolvendo tais microrganismos tem sido voltado geralmente para grandes centros e/ou Unidades de Terapias Intensivas. No entanto, essas bactérias podem existir em diversos locais e habitar diversos hospedeiros. Assim, optou-se por estudar a resistência bacteriana em Unidades Básicas de Saúde (UBS), por ser considerada o primeiro local de procura de atendimento pelo usuário por ser um local pouco monitorado quanto à presença de microrganismos resistentes, e por possibilitar a inter-relação desta resistência entre animal, humano e ambiente, fornecendo subsídios para elaboração de ações relacionadas ao controle e ao combate à resistência aos antimicrobianos.

Assim, objetivou-se verificar a resistência bacteriana através do sistema de efluxo multidrogas e sua disseminação entre *S. aureus* e bactérias Gram-negativas isoladas de usuários, profissionais e ambiente das UBS do município de Viçosa, MG, e de cães semidomiciliados que transitavam próximos às UBS.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPE) sob nº 3.014.634 e pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA nº 79/2018, ambos comitês da Universidade Federal de Viçosa e os certificados se encontram nos anexos.

2.1. Isolados

Os isolados foram obtidos de três UBS (W, Y e Z) estudadas e foram identificados por testes microbiológicos básicos, ágar cromogênico (PROBAC), Kit comercial EPM-MILI (NEWPROV), PCR e sequenciamento do 16 rRNA. Os isolados foram submetidos ao teste de antibiograma usando os principais antimicrobianos prescritos na Medicina Veterinária e na Humana conforme descrito no Capítulo I.

Trabalhou-se com 38 isolados de *S. aureus*, sendo 27 provenientes das mãos de usuários e profissionais da saúde das UBS e 11 originados de focinhos de cães semidomiciliados. Também foram utilizados 20 isolados Gram-negativos, sendo três provenientes das mãos de usuários e profissionais da saúde e 17 dos focinhos de cães semidomiciliados. Não obtivemos isolados de *S. aureus* e nem de bactérias Gram-negativas do ambiente.

2.2. Detecção de genes dos sistemas de efluxo multidrogas

Foi utilizada a técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) para detecção dos genes dos sistemas de efluxo multidrogas nos 38 e 20 isolados de *Staphylococcus aureus* e Gram-negativo, respectivamente. A extração do DNA dos isolados foi realizada utilizando kit da Wizard® Genomic DNA Purification Kit (PROMEGA). Para as reações de amplificação foi preparada uma mistura de volume total 25 µL, contendo 12,5 µL de GoTaq® Green Master Mix (Promega), 20 pmol de cada primer, 2 µL de material genético (50 ng) e 6,5 µL de água nucleasse *free*. Nas Tabelas 1 e 2 estão descritos os genes pesquisados, as famílias a quais pertencem estes genes, os respectivos *primers* e os tamanhos dos produtos obtidos.

Tabela 1 – Primers usados para detecção de genes de Sistema de Efluxo Multidrogas em *Staphylococcus aureus*

Gene	Sequência 5'-3'	Produto (pb)	Referência
<i>norA</i>	<i>f</i> - TTCACCAAGCCATCAAAAAG <i>r</i> - CTTGCCTTTCTCCAGCAATA	620	Pourmand et al. (2014)
<i>norB</i>	<i>f</i> - AGCGCGTTGTCTATCTTTCC <i>r</i> - GCAGGTGGTCTTGCTGATAA	213	Hassanzadeh et al. (2017)
<i>norC</i>	<i>f</i> - AATGGGTTCTAAGCGACCAA <i>r</i> - ATACCTGAAGCAACGCCAAC	216	Hassanzadeh et al. (2017)
<i>mrsA</i>	<i>f</i> - TCCAATCATTGCACAAAATC <i>r</i> - AATTCCCTCTATTTGGTGGT	163	Martineau et al. (2000)
<i>ImrS</i>	<i>f</i> - GCAAGCTTATGGCTAAAGTTGAATTAACAAC <i>r</i> - GCGGATCCTTAAAATTTCTTCTATTACTTT	1400	Floyd et al. (2010)
<i>tet38</i>	<i>f</i> - TTCAGTTTGGTTATAGACAA <i>r</i> - CGTAGAAATAAATCCACCTG	400	Truong Bolduc et al. (2005)

Tabela 2 – Primers utilizados para pesquisa de genes envolvidos com o sistema de efluxo multidrogas pertencentes à família Resistance Nodulation and Division (RND) em bactérias Gram-negativas.

Identificação	Gene	Sequência 5'-3'	Produto (pb)	Referência
<i>Pantoea</i> spp	<i>acrA</i>	<i>f</i> - CTTAGCCCTAACAGGATGTG <i>r</i> - TTGAAATTACGCTTCAGGAT	189	Viveiros et al. (2007)
	<i>acrB</i>	<i>f</i> - CGTACACAGAAAGTGCTCAA <i>r</i> - CGCTTCAACTTTGTTTTCTT	183	Viveiros et al. (2007)
<i>Acinetobacter</i> spp	<i>adeA</i>	<i>f</i> - GCTGAGCCACCACCGGCTAAAG <i>r</i> - ACCTTCAACAACGACTCTGTCACC	990	Li et al. (2019)
	<i>adeB</i>	<i>f</i> - CTTGCATTTACGTGTGGTGT <i>r</i> - GCTTTTCTACTGCACCCAAA	168	Li et al. (2019)
	<i>adeC</i>	<i>f</i> - CCCAACCATTGGTGTAAACG <i>r</i> - GAACATCCGTGCTTTAGC	626	Li et al. (2019)
<i>Enterobacter</i> spp	<i>acrA</i>	<i>f</i> - GGTCGTTCTGATGCTCTCA <i>r</i> - GGCTTGCTGGTTATTATCAG	1078	Moreira et al. (2009)
	<i>acrB</i>	<i>f</i> - CGTCTAACAGTGACTCCACGG <i>r</i> - TTCAATCAGACCTTTACCTTC	2730	Moreira et al. (2009)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>acrA</i>	<i>f</i> - TCTGATCGACGGTGACATCC <i>r</i> - TCGAGCAATGATTTCTGCG	157	Heidary et al. (2016)
	<i>acrB</i>	<i>f</i> - CAATACGGAAGAGTTTGGCA <i>r</i> - CAGACGAACCTGGGAACC	64	Heidary et al. (2016)
	<i>oqxA</i>	<i>f</i> - CTCGGCGCGATGATGCT <i>r</i> - CCACTCTTCACGGGAGACGA	392	Rodríguez-Martínez et al.(2013)
	<i>oqxB</i>	<i>f</i> - TTCTCCCCCGGCGGGAAGTAC <i>r</i> - CTCGGCCATTTGGCGCGTA	512	Rodríguez-Martínez et al.(2013)

2.3 Detecção fenotípica dos Sistemas de Efluxo Multidrogas

2.3.1 Seleção dos isolados

Para realização dos testes fenotípicos da MIC, foram selecionados isolados resistentes a pelo menos um antibiótico, devido à baixa ocorrência de isolados multirresistentes frente aos antibióticos testados (teste executado em ensaios anteriores) e que detinham genes SEM. Assim, dos 38 isolados, trabalhou-se com 33 *S. aureus* resistentes à penicilina (PEN) e/ou à eritromicina (ERI). Para a MIC dos Gram-negativos, dos 20 isolados, selecionou-se nove isolados resistentes à ampicilina (AMP) e/ou resistentes à sulfametoxazol (SUL).

2.3.2 Produtos químicos utilizados

Os antimicrobianos: ampicilina (AMP), sulfametoxazol (SUL) e penicilina (PEN) foram adquiridos da Sigma-Aldrich Brasil, assim como os reagentes, Fenil-Arginil- β -Naftilamida (PA β N), Carbonil Cianida m-Clorofenilhidrazona (CCCP), brometo de etídio 1% e o corante Nile Red (NR). A eritromicina (ERI) foi adquirido em uma farmácia de manipulação local.

O CCCP (5 mM) foi diluído em 50% de Dimetilsulfóxido (DMSO) e o corante Nile Red (5 mM) foi diluído em uma solução contendo 10% de dimetilformamida e 90% de etanol ([vol/vol]).

2.3.3 Concentração Inibitória Mínima (MIC)

A Concentração Inibitória Mínima (MIC) foi determinada em placa de microtitulação de 96 poços em CAMHB (caldo Mueller Hinton ajustado para cátions) conforme diretrizes do CLSI (2018) utilizando um inóculo final de 5×10^5 UFC/mL após reativação *overnight* a 37 ° C dos isolados. O teste da MIC foi realizado em duplicata e repetido duas vezes, sendo considerada a MIC a menor concentração capaz de inibir a multiplicação bacteriana, comparando os resultados aos dos controles (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* ATCC 25922).

2.3.4. Quantificação de efluxo

Para *S. aureus*, seguiu-se o protocolo de Kaatz e col. (2000) com algumas modificações. Isolados de *S. aureus* foram cultivados *overnight* em caldo BHI. O inoculo foi diluído a uma DO_{660} de 0,7 a 0,8, e permaneceu em repouso a temperatura ambiente por 20 minutos. Em seguida a DO_{660} foi ajustada a 0,4 com caldo BHI autoclavado contendo CCCP (100 μ M) e EtBr (10 μ g/mL). As culturas permaneceram em repouso por mais uma hora à temperatura ambiente para possibilitar a entrada do EtBr dentro das bactérias. Depois da incubação, 400 μ L da cultura foram sedimentadas (4000 rpm/5 min), o sobrenadante descartado, e então ressuspensas em 400 μ L de tampão fosfato-salino (PBS) pH 7,2. Na sequência, foram distribuídos (em duplicatas) 50 μ L da cultura em microtubos de 500 μ L que previamente haviam recebido 50 μ L de PBS (i), 50 μ L de BHI com CCCP (ii) e 50 μ L de glicose (1M) (iii), formando assim, os três tratamentos (i), (ii) e (iii). A fluorescência da suspensão foi acompanhada através da aquisição a 10 segundos por 60 ciclos em um termociclador Rotor-Gene Q (Qiagen), utilizando-se fonte a 530 nm e detecção a 630 nm.

Para os isolados Gram-negativos, seguiu-se o protocolo publicado por Bohnert, Karamian e Nikaido (2010) com algumas modificações. Os isolados foram reativados em caldo Luria Bertani (LB) e incubados com agitação orbital @Tecnal a 37 °C, 140 rpm, por 24 h. Em seguida, foram repicados em 3 mL de caldo LB *overnight* e incubados novamente em mesma incubadora sob agitação a 37 °C, 140 rpm. Depois os inóculos foram centrifugados a 4400 rpm, por 10 min. O sedimento foi ressuspenso em 1 mL de tampão fosfato de potássio 20 mM contendo 1 mM de $MgCl_2$ formando o tampão PPB (pH 7,0). Realizou-se outra etapa de centrifugação e ressuspensão, e os inóculos bacterianos foram ajustados para uma OD_{660} de 1,0 no PPB e em seguida, foram deixados em repouso durante cerca de 15 min e o volume ajustado para 1 mL com PPB. Na sequência, os tubos contendo os inóculos receberam CCCP (5mM) a uma concentração final de 5 μ M e as culturas permaneceram em repouso por 15 min. Alíquotas de 100 μ L foram transferidas para três microtubos de 0,5 mL, um contendo PA β N (50 μ g/mL) (i), outro contendo ampicilina (32 μ g/mL) (ii) e outro sem conteúdo (vazio) (iii), formando-se assim, os três tratamentos (i),(ii) e (iii). As culturas descansaram por 15 minutos. Em seguida, cada tratamento recebeu Nile Red (5 mM) a uma concentração final de 5 μ M e a suspensão celular foi incubada em incubadora com agitação orbital @Tecnal (140 rpm; 37 ° C) por 2,5 h. As células foram deixadas

à temperatura ambiente por 30 min e depois centrifugada durante 5 min a 4400 rpm. Em seguida, o sobrenadante foi descartado, e o pellet ressuspense em 100 µL de PPB. Imediatamente após esta etapa, a fluorescência foi acompanhada em um termociclador Rotor Gene Q® por 100x, utilizando-se fonte a 530 nm e detecção a 630 nm com aquisição a cada 5 segundos por 20 ciclos. O efluxo do Nile Red foi desencadeado pela rápida energização com 5 µL de glicose 1M e monitorado por mais 200 s.

2.4. Epidemiologia molecular

Para verificar a disseminação dos genes dos sistemas de efluxo multidroga entre amostras de humanos das UBS e os cães semidomiciliados utilizou-se a metodologia de Reação em Cadeia da Polimerase baseada em sequências repetitivas (rep-PCR) denominadas (GTG)₋₅-PCR e BOX-PCR.

Assim, para os isolados de *S. aureus* utilizou-se o primer (GTG) 5'-GAGGGTGGCGGTTCT-3' conforme descrito por Lieckfeldt, Meyer e Borner (1993). Para tanto, foi realizado o preparo da mistura de PCR com volume final de 25µl contendo: 5µl do Tampão 5x Green (Go Taq® Flexi Buffer), 0,2 mM de dNTP, 1 µM do *primer*, 1,5 mM de MgCl₂ e 2 U de enzima GoTaq® Flexi Dna polimerase (Promega). O DNA utilizado na reação foi padronizado para 25 ng. As condições para a PCR foram: desnaturação inicial à 95°C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos seguidos com uma desnaturação à 94°C por 1 minutos, anelamento à 40°C por 1 minuto e extensão à 78°C por 8 minutos. O último ciclo foi seguido pela etapa final de extensão única à 72°C por 5 min. As reações de PCR foram realizadas no termociclador BioRad-C1000™ Thermal Cycler. Os produtos das PCR foram avaliados utilizando eletroforese em gel de agarose a 1,8%.

Para bactérias Gram-negativas foi utilizado o primer BOXA1R 5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3' de acordo com Versalovic et al. (1994). Para tanto, o mix da PCR continha as seguintes concentrações dos reagentes: tampão de reação de PCR (1X), 0,2 mM de dNTP, 3 mM MgCl₂, 0,4 mM de primer, 1 U de GoTaq® Flexi Dna polimerase (Promega). Foram realizadas reações com volume final de 25µL. O DNA utilizado na reação foi padronizado para 25 ng. As reações de PCR foram realizadas no termociclador BioRad-C1000™ Thermal Cycler. O produto das reações foi submetido às seguintes condições de ciclagem: uma desnaturação inicial

a 95°C por 7 min, seguida por 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 53°C por 1 min, uma extensão a 72 ° C por 1 min, e terminando com uma final extensão a 65°C por 16 min. Os produtos das PCR foram avaliados utilizando eletroforese em gel de agarose 1,8%.

Para interpretação dos resultados, foi construída uma matriz para os fragmentos amplificados codificados no sistema binário, sendo atribuído aos fragmentos um valor de (1) para a presença e (0) para a ausência de bandas nos géis virtuais. A partir dessa matriz, foi gerado um dendrograma utilizando o programa estatístico PaSt (HAMMER, HARPER E RYAN, 2001), utilizando o método de agrupamento Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA) e o coeficiente do índice Jaccard. As análises de dados foram realizadas usando o software Past v. 3.11, adotando um grau de similaridade de 80% conforme utilizado por Lagha et al. (2021).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Staphylococcus aureus, um colonizador da mucosa nasal e pele, é um patógeno importante relacionado às infecções cutâneas leves, a bacteremia e endocardite fatais (DING et al., 2008) e está relacionado ao desenvolvimento de multirresistência aos antibióticos. A pesquisa de genes de resistência antimicrobiana associados ao sistemas de efluxo entre os 38 isolados de *Staphylococcus aureus*, sendo 27 de origem humana e 11 de origem canina, revelou que o gene mais prevalente foi o *norC*, encontrado em 100% das cepas, seguido dos genes *tet38*, *ImrS* e *norB* com 97,4% e gene *norA* (94,74%), conforme ilustrado na tabela 3.

Em decorrência de poucas publicações científicas em UBS, foram utilizados estudos envolvendo hospitais e Unidades de Terapias Intensivas (UTIs) em nossa discussão.

A prevalência encontrada de genes de sistema de efluxo *norA*, *norB* e *norC* em *S. aureus* oriundos de animais e humanos (profissionais e usuários) frequentadores das UBS foi considerável. Hassanzadeh et al (2017) encontraram uma frequência bem inferior, de 41,7% de *norA*, *norB* e *norC* em isolados clínicos em três hospitais afiliados à Universidade de Ciências Médicas de Teerã, Irã.

Tabela 3. Distribuição de genes de sistemas de efluxo multidrogas em isolados de *Staphylococcus aureus* provenientes de cães, usuários e profissionais da saúde de Unidades Básicas de Saúde (W, Y e Z) de Viçosa – MG, 2019.

Genes	Origem		Frequência
	Humano (n=27)	Animal (n=11)	n (%)
<i>norA</i>	26	10	36 (94,74)
<i>norB</i>	26	11	37 (97,4)
<i>norC</i>	27	11	38 (100)
<i>msrA</i>	3	1	4 (10,53)
<i>tet38</i>	26	11	37 (97,4)
<i>lmrS</i>	27	10	37 (97,4)

n = valor de isolados por categoria

A ocorrência do gene *norA* se destaca por ser comumente presente em cepas geograficamente diversas (HASSANZADEH et al., 2020). Costa et al. (2018) evidenciam que este gene faz parte do genoma central de *S. aureus*. Isso pode justificar a alta ocorrência em nosso estudo e ressalta para o papel deste na eliminação de elementos tóxicos prejudiciais à bactéria.

A alta taxa encontrada de *norC* coincide com a pesquisa realizada por Jead e Mohammed (2020), em que verificaram uma prevalência de 100% em isolados provenientes de diferentes infecções em pacientes que deram entrada em hospitais de Bagdá. Porém, difere da encontrada por Shamkhi, Saadedin e Jassim (2019), que ao avaliarem *S. aureus* de pacientes atendidos em diferentes hospitais de Bagdá e Wassit City, detectaram a presença de *norC* em apenas 17 (17,81%) do total de isolados

As proteínas Nor são membros da família MFS e possuem um amplo espectro de substratos que podem ser expelidos por elas (FOSTER, et al., 2017). Tanto *norC* quanto seu homólogo *norB*, protegem *S. aureus* contra fluoroquinolonas, que são antimicrobianos de amplo espectro utilizados no tratamento de infecções ocasionadas por bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (LI et al., 2018; KUMAR et al., 2021). Além disso, as proteínas Nor também podem extrudar outros compostos químicos, como brometo de etídio e cetrimida (DING et al., 2008).

Outros genes que foram detectáveis em alta percentagem (97,4%) nesta pesquisa foram o *lmrS* que também confere resistência a múltiplas drogas (FLOYD et

al., 2010) e o *tet38*, que reduz a eficácia da tetraciclina contra isolados de *S. aureus* (CHEN; HOOPER, 2018). Em percentual bem reduzido, detectou-se o gene *msrA* em quatro isolados, três de origem humana e um de animal. Este gene está associado à resistência à eritromicina (REYNOLDS, ROSS, COVE, 2003). No entanto, em nosso estudo, os 21 isolados de *S. aureus* resistentes à eritromicina não apresentaram o gene *msrA*, demonstrando que outros mecanismos podem estar associados ao perfil de resistência detectado.

Todos os genes de SEM pesquisados em *S. aureus* são codificados por cromossomos, exceto *msrA*, que é codificado por plasmídeo. Sabe-se que a conjugação é o principal processo responsável pela transferência de plasmídeos e com consequente disseminação de genes de resistência antimicrobiana (LERMINIAUX; CAMERON, 2019). Esse mecanismo de transferência possibilita a persistência e disseminação de genes importantes entre diferentes comunidades bacterianas.

Entre os Gram-negativos, detectou-se *K. pneumoniae*, considerado um patógeno oportunista e agente etiológico de diversas infecções hospitalares tais como pneumonias, cistite e septicemia, e infecções adquiridas em comunidade (CANEIRAS et al., 2019), além de representar um patógeno com potencial de resistência aos antimicrobianos (NAVON-VENEZIA, KONDRATYEVA, CARATTOLI, 2017). A presença dos genes *acrA* e *acrB* em 100%(4) dos isolados, proveniente de animal e humano, é importante, considerando que o sistema de efluxo *acrAB* faz parte da família RND, um dos principais sistemas de efluxo multidrogas encontradas no grupo das gram-negativas (LEUS et al., 2018). Este sistema desempenha um papel importante na resistência de bactérias Gram-negativas, pois através deste, tais agentes conseguem expelir antimicrobianos apesar da peculiaridade de sua estrutura de membrana.

Estudo realizado por Lagha et al. (2021) detectaram o gene *acrAB* que codifica o SEM em 93,33% dos isolados de *K. pneumoniae* recuperados de pacientes no hospital King Abdulaziz Specialist, Taif, Arábia Saudita. Pakzad et al. (2013) comprovaram a relação entre sistema de efluxo *acrAB* e a resistência à ciprofloxacina em *K. pneumoniae* isolados de pacientes com queimaduras oriundos do hospital Shahid Motahari. Foi possível verificar em nossa pesquisa que um isolado que continha *acrA* e *acrB* além de apresentar multirresistência (dados descritos no capítulo I) à quatro classes (macrolídeos, betalactâmicos, nitrofurantoínas, sulfonamidas),

apresentou também atividade de efluxo demonstrando possível relação entre genotípico e fenótipo.

Além desses genes, foi possível detectar a presença do gene *oqxA* em dois (50%) dos isolados de *K. pneumoniae*, porém o gene *oqxB* não ocorreu em nenhuma dos isolados testados. O sistema *oqxAB* está abrigado em plasmídeos e quando expressos, conferem resistência a algumas quinolonas como ciprofloxacina, norfloxacina ou levofloxacina (HERNANDO-AMADO et al., 2016), nitrofurantoína, cloranfenicol, detergentes e desinfetantes (LI et al., 2019). Os plasmídeos são responsáveis pela transferência e disseminação global de muitos genes de resistência aos antibióticos (ARGs) e funcionam em uma vasta gama de ambientes, ou seja, essa transferência de ARGs ocorrerá pelos mesmos mecanismos independentemente do ambiente, seja clínico ou natural (LERMINIAUX; CAMERON, 2019).

Estudo elaborado por Jomehzadeh, Ahmadi e Bahmanshiri (2022) evidenciaram em *K. pneumoniae* provenientes de amostras clínicas de pacientes internados em hospitais afiliados à Universidade de Ciências Médicas de Abadan, através da determinação da MIC, 15 cepas resistentes e cinco intermediária à ciprofloxacina, onde detectou-se o gene *oqxA* e *oqxB* em oito e sete isolados, respectivamente, relacionando, portanto, à presença desses genes com o perfil de resistência apresentada.

Em nossa pesquisa, verificou-se que os isolados (origem animal) que detinham o gene *oqxA*, um foi multirresistente (dados descritos no capítulo I) a quatro classes (macrolídeos, betalactâmicos, nitrofurantoínas e sulfonamidas) e o outro, além da resistência a duas classes de antibióticos, apresentou perfil intermediário para três classes de antibióticos (cefalosporinas, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas), ainda detectou atividade da bomba no teste fenotípico de quantificação com Nile Red, demonstrando a possível relação entre a presença desses genes com o fenótipo observado. Assim, é notável a possibilidade de disseminação desses genes entre comunidades bacterianas e destaca-se o papel dos animais, no caso, os cães, como veículos de disseminação desse patógeno

A superexpressão tanto de *acrAB* como *oqxAB* contribui em *K. pneumoniae* para a resistência à tigeciclina (JUAN et al., 2016), antibiótico considerado como medicamento de escolha para combater membros da família *Enterobacteriaceae* multirresistentes (POURNARAS et al., 2016).

Em nossa pesquisa, houve presença simultânea dos genes *acrA* e *acrB* em cinco (62,5%) isolados de *Enterobacter* spp. Esses agentes pertencentes à família das *Enterobacteriaceae*, são associados principalmente a infecções relacionadas à assistência à saúde, apesar de nem todas as espécies serem causadoras de doenças em humanos (RAMIREZ; GIRON, 2022).

Grazziotin et al. (2016) verificaram em *Enterobacter aerogenes* multirresistentes oriundos de pacientes hospitalizados no Brasil a presença da bomba de efluxo *acrAB-Tol-C*. Bornet et al (2003) demonstraram que a resistência de *E. aerogenes* ao imipenem foi atribuída a expressão da bomba *acrA*. O surgimento de cepas de *Enterobacter cloacae* resistentes aos carbapenêmicos como meropenem, imipenem e ertapenem, levou a um aumento de estudos envolvendo estes microrganismos (ANNAVAJHALA; GOMEZ-SIMMONDSE; UHLEMANM, 2019). Entre os isolados de nossa pesquisa que se detectou *acrA* e/ou *acrB*, um isolado, de origem canina, apresentou multirresistência (dados descritos no capítulo I) a três classes de antibióticos distintos (macrolídeos, betalactâmicos, nitrofurantoínas e sulfonamidas) inclusive, houve atividade de efluxo.

No que se refere à detecção do gene *acrA* e *acrB* em *Pantoea* spp., de origem animal e humana, foi diferente ao relatado por Abdulmir, Al-baaj e Al-Ramahy (2020), em que não registraram presença de *acrAB* em *Pantoea* spp isoladas em ambientes hospitalares como instrumentos médicos, leitos, paredes, equipamentos piso de hospitais da cidade de Al-Diwaniyah, Iraque. No nosso estudo, apenas dois isolados que detinham simultaneamente os genes *acrA* e *acrB* apresentaram resistência a duas classes de antibióticos, betalactâmicos e sulfonamidas.

Apesar de *Pantoea stewartii* estar principalmente associada a doenças em plantações de milho e gramíneas forrageiras (MARTINS e NORONHA, 2018), não descartamos seu papel como disseminador de genes de resistência no ambiente das UBS. Giacón, Siqueira e Motta (2021) detectaram a presença de *Pantoea ananatis* multirresistente em hospitais veterinários e alerta para o risco à saúde pública, uma vez que este patógeno pode desempenhar um papel importante na manutenção e disseminação de genes de resistência aos antibióticos, como, por exemplo, à vancomicina. Diante disso, reforçamos sobre a importância da execução de estudos envolvendo abordagens *One Health* para determinar a correlação entre uso de antimicrobiano e resistência no contexto humano-animal-ambiente (ZAHEER et al., 2020).

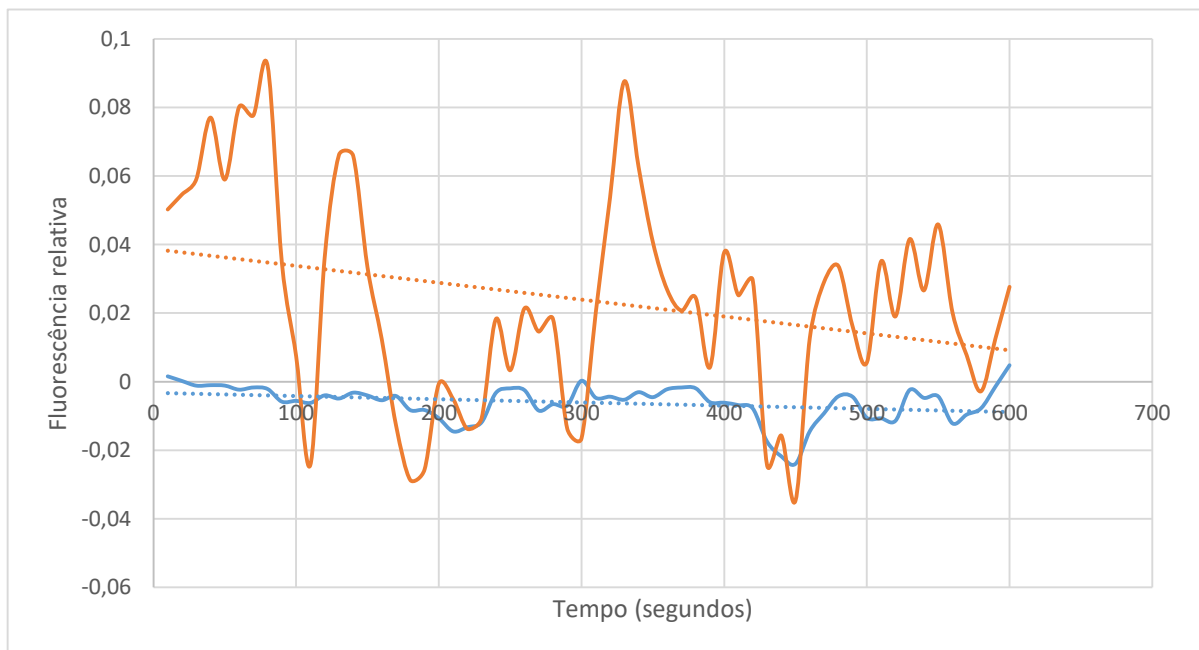
Embora *Acinetobacter baumannii* seja a espécie mais comumente isolada em infecções, *Acinetobacter pittii* estão sendo frequentemente isolados como causadores de infecções relacionadas à assistência à saúde, além disso, apresentam resistência a vários antibióticos (SUNG et al., 2015). Esta espécie foi a mais prevalente identificada em infecções de animais, tais como infecções do trato urinário, otite, piodermatite, e algumas apresentaram perfis de multirresistentes (HOLMSTROM et al., 2022). Em nossa pesquisa, *Acinetobacter pittii*, originado de um usuário da UBS, apresentou genes *adeA* e *adeB*, mas não detectou o gene *adeC* e foi resistente (dados descritos no capítulo I) a duas classes de antibióticos: β -lactâmicos e nitrofurantoínas. Estudo demonstrou que a detecção de *adeC* em cepas de *A. baumannii* tem maior probabilidade de resultar em multirresistência (VIECZOREK, et al, 2013), o que pode justificar a ausência deste perfil em nosso isolado.

Li et al (2019) obtiveram positividade de *adeABC* em 76,23% dos 74 isolados de *Acinetobacter* spp resistentes a carbapenem de amostras de infecção clínicas e amostras de origem fecal no sul da China. *AdeABC* são sistemas de efluxo multidrogas da família RND presentes em bactérias do gênero *Acinetobacter* spp. (LEUS et al., 2018) e pode expelir uma gama de substratos, incluindo β -lactâmicos, fluoroquinolonas, tetraciclina, macrolídeo (linamidas) e cloranfenicol (XU; BILYA; XU, 2019).

Mesmo que existam outros mecanismos envolvidos com a resistência aos antimicrobianos, como mudanças nos alvos das drogas, modificações estruturais ou degradação das drogas, diminuição da permeabilidade das proteínas da membrana externa (LERMINIAUX; CAMERON, 2019; HUANG et al., 2022), as bombas ou sistemas de efluxo podem estar associadas à resistência a multidrogas (MDR), sendo de relevância clínica pois podem tornar uma infecção bacteriana intratável (PIDDOCK, 2006). Apesar do baixo perfil MDR apresentado pelos isolados, não descartamos a importância de sua detecção, pois o sistema de efluxo está relacionado a outros processos biológicos inerente à bactéria, como formação de biofilme, adesão bacteriana em células hospedeiras, detecção do *Quorum Sensing* e capacidade de invasão, que determinam a gravidade do processo infeccioso (HUANG et al., 2022). Além disso, a presença dos genes de SEM detectada em nosso estudo indica a possibilidade de disseminação de genes para outras bactérias, favorecendo o surgimento de potenciais patógenos resistentes à antibióticos dentro das UBS.

Para verificação fenotípica da presença de sistema de efluxo multidrogas, comparando os valores de MICs na presença e ausência de CCCP e PA β N, em *S. aureus* e gram-negativas, respectivamente, não houve reduções nos valores das MIC. Sugerindo que o sistema de efluxo não está ativo, embora sabe-se que esta metodologia não é tão refinada, ela faz um *screening* da situação, uma vez que, com a utilização de brometo de etídio (EtBr), outro teste usado para verificar a atividade de efluxo, todos os 33 *S. aureus* testados demonstraram atividade de sistema de efluxo, conforme representado na Figura 1.

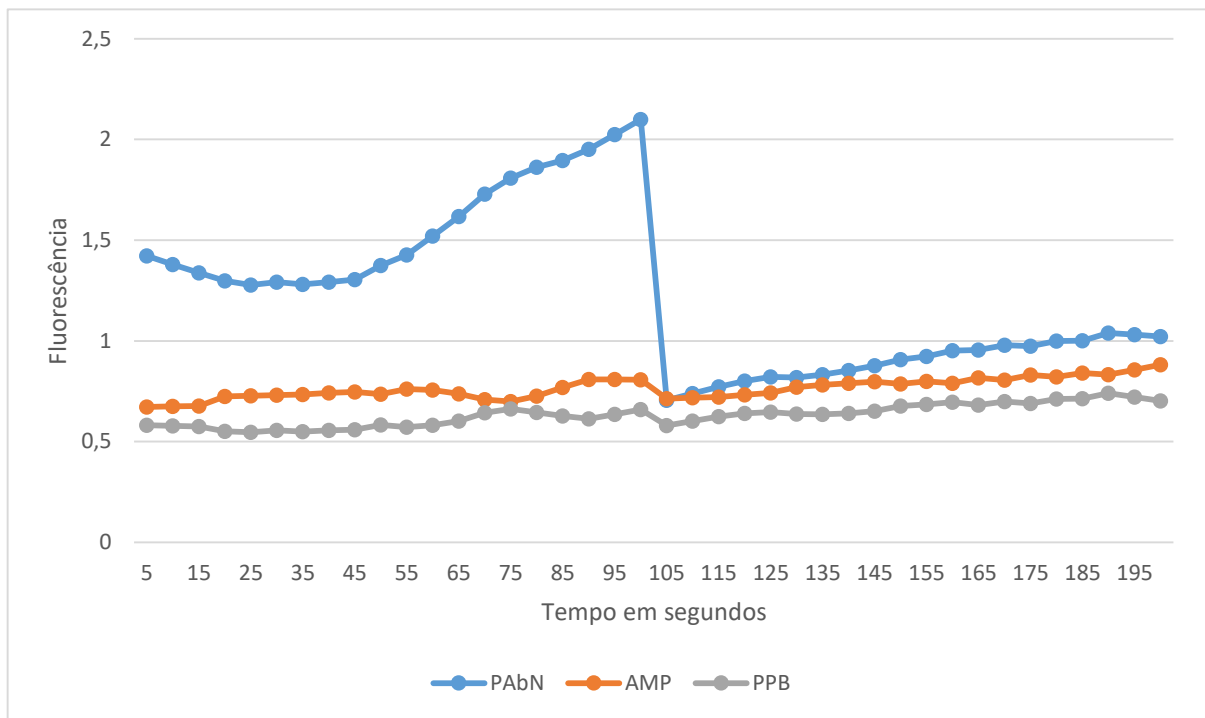
Figura 1. Curvas representativas da atividade de efluxo de brometo de etídio frente aos 33 isolados de *Staphylococcus aureus* isolados de usuários, profissionais de saúde e de cães nas UBS. A linha de cor laranja, apresenta os valores de fluorescência captada na presença de carbonil cianida m-clorofenilhidrazona demonstrando atividade de Sistema de Efluxo Multidrogas. A linha azul demonstra o efeito do tampão fosfato-salino – PBS.



Fonte: Autora, 2023.

No entanto, por meio da quantificação do efluxo de vermelho do Nilo verificou-se que dois isolados, um *Klebsiella pneumoniae* e outro *Enterobacter* spp demonstraram atividade de efluxo ativa, conforme ilustrado na figura 2.

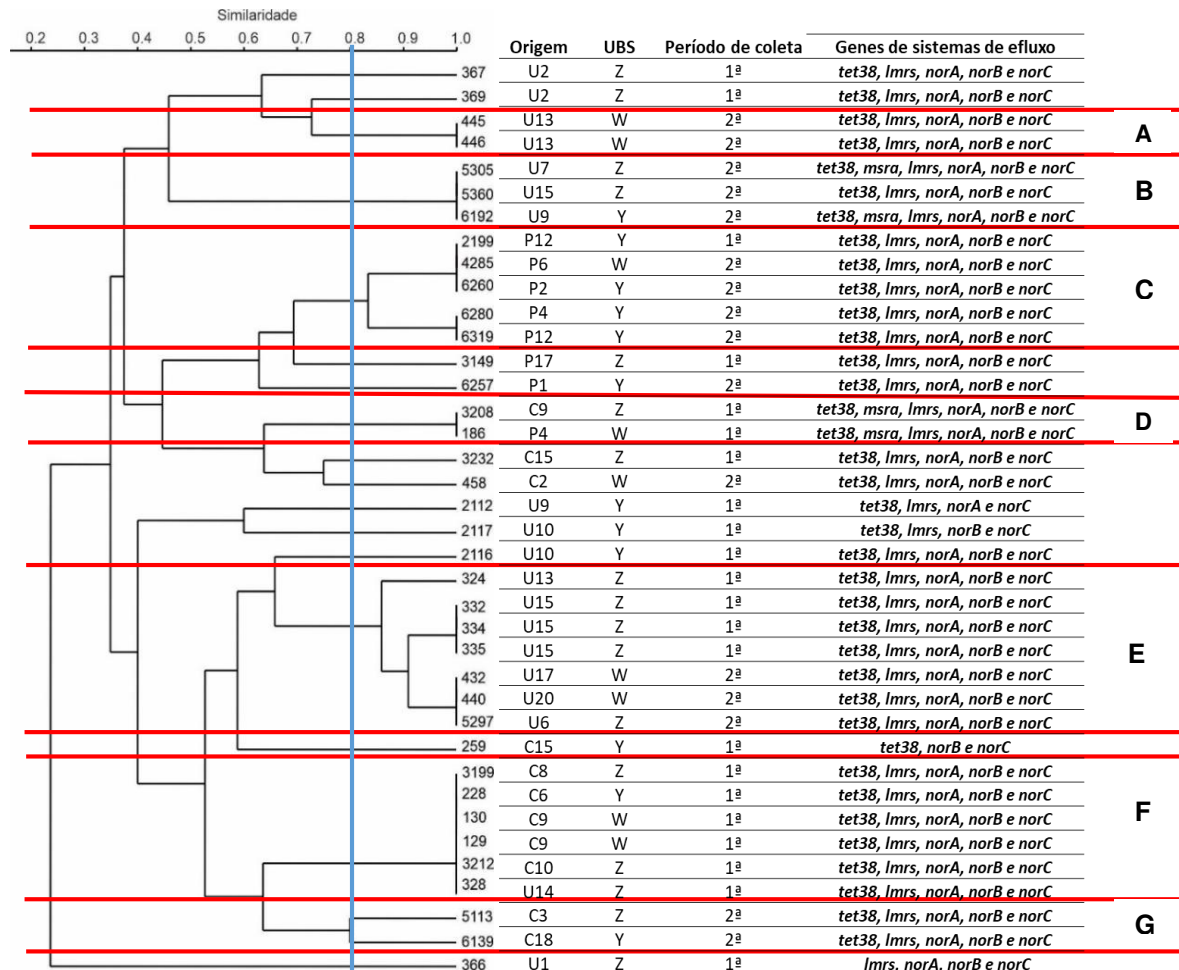
Figura 2. Curvas representativas da atividade de efluxo do reagente Nile Red por isolados Gram-negativos. Depois do pré-carregamento com Nile Red (5 μ M) as células foram energizadas aos 100 segundos com glicose (50 mM). A linha azul observa-se rápida diminuição de fluorescência após adição de glicose, evidenciando atividade do Sistema de Efluxo Multidrogas. As linhas de cor laranja e cinza, correspondem a ampicilina (AMP) e ao controle (tampão fosfato de potássio acrescido de MgCl₂ 1mM – PPB).



Fonte: Autora, 2023.

Os dados acima revelam agentes detentores de genes de SEM, dessa forma, faz-se necessário adotar ferramentas para rastrear a disseminação desses agentes em humanos e animais. A impressão digital (GTG) 5-PCR é uma ferramenta eficiente para delineamento taxonômico e identificação da maioria dos *Staphylococcus* spp. (SVEC et al., 2010). Agrupamentos gerados por rep-PCR podem ser iguais aos obtidos por PFGE (SPIGAGLIA; MASTRANTONIO, 2003). Babazadeh e Ranjbar (2021) consideram (GTG)5-PCR uma técnica possível, econômica e fácil para tipagem molecular de isolados bacterianos. Dessa forma, os isolados de *S. aureus* foram caracterizados utilizando a técnica de PCR *fingerprinting* a partir do primer (GTG)5 e o perfil de polimorfismo genético obtido. Os isolados foram agrupados em sete clusters designados por letras de A a G (Figura 3).

Figura 3. Dendrograma de 38 isolados de *Staphylococcus aureus* provenientes de cães e humanos (usuários e profissionais de saúde) em três Unidades Básicas de Saúde (W, T e Z) baseado na análise de agrupamento dos perfis de impressão digital (GTG)₅-PCR associado com os genes de Sistemas de Efluxos Multidrogas, Viçosa-MG, 2019.



U: usuários; C: cão; P: profissional de saúde; 1 e 2ª se referem ao período de coleta das amostras (inverno e verão). A linha vermelha representa a delimitação dos clusters.

Fonte: Autora, 2023.

O cluster A agrupou dois isolados com 100% compartilhamento de bandas polimórficas (Figura S1), originadas do mesmo usuário, no entanto é importante mencionarmos que os mesmos apresentaram perfis de resistência diferentes à sulfonamidas, além de carregarem cinco importantes genes de SEM.

Enquanto os clusters B e E evidenciam a disseminação de isolados com alta identidade, entre usuários que frequentam diferentes UBS (Y e Z), além de carregarem importantes genes de SEM. Resultado semelhante observado no cluster C, agora para os profissionais de saúde, demonstrando a circulação de isolados com alto grau de

identidade de polimorfismos genético, entre esses profissionais de UBS distintas (W e Y). Foi possível notar que além disso, isolados do grupo C permaneceram em ambos os períodos, chuvoso e seco, o que indica a elevada capacidade de adaptação de *S. aureus* aos mais diversos ambientes. Para Bierowiec, Płoneczka-janeczko e Rypuła, (2016) devido à capacidade de *S. aureus* ser transferido e se adaptar a novos hospedeiros, se deve aplicar uma abordagem de saúde única a fim de inibir a disseminação do microrganismo e aquisição adicional de genes de resistência aos antibióticos.

Os clusters B, C e E revelam, portanto, o possível papel dos usuários e profissionais de saúde como disseminadores de bactérias que pode ocorrer pelo contato através das mãos, bem como pelo fato de ter evidenciado que alguns profissionais trabalham em duas UBS distintas.

O cluster D, os dois isolados com 100% de identidade no perfil de polimorfismo genético com distintas origens, cão e profissional de saúde, pertencentes a UBS diferentes, revela-nos a circulação de *S. aureus* entre homem-animal o que é agravado, pela constatação de que ambos carregam todos os genes de SEM avaliados na pesquisa. Esta interação entre homem-animal é visualizado melhor pelo agrupamento de isolados no cluster F, no qual agrupou um grande número de isolados com 100% de identidade no perfil de polimorfismo genético e reforçou a existência de circulação destas bactérias entre usuários de distintas UBS e cães que frequentam ambientes próximos as mesmas. Todas detêm à maioria dos genes de SEM pesquisados. Bruce et al. (2022) afirma que gatos e cães são portadores frequentes de clones de *S. aureus* contendo um repertório distinto de genes de resistência, considerando, portanto, esses animais como um reservatório de genes clinicamente relevantes e clones de alto risco que podem ser transmitidos aos humanos.

Quanto ao cluster E, este foi o maior com oito isolados e foi possível observar uma disseminação de *S. aureus* entre usuários das UBS W e Z. Informações obtidas pelo cluster G destaca dois isolados com alta identidade no perfil de polimorfismo genético, oriundos de cães de UBS diferentes, significando que os animais podem auxiliar na propagação desta cepa para diferentes locais. Onze isolados não agruparam conforme o valor estabelecido de similaridade.

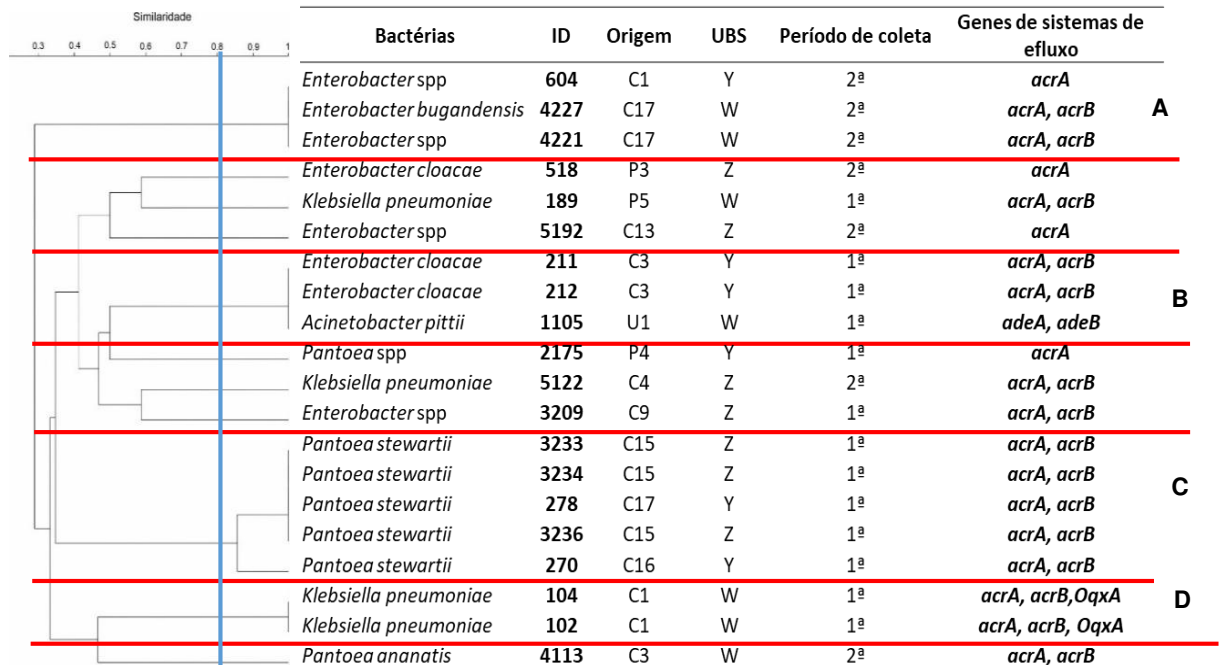
Ressalta-se que, todos os isolados de *S. aureus* além de serem portadores de genes de sistemas de efluxo multidrogas, todos possuem atividade de efluxo, mostrando a sua capacidade de expelir antibióticos, gerando ineficácia dos

antibióticos com conseqüentes complicações para os pacientes, podendo leva-los ao óbito.

Lozano-Villegas, Rodríguez-Hernández e Rondón-Barragán (2019) afirmam que BOXA1R revelou que pode ser útil para desenvolvimento de estudos epidemiológicos em isolados de *Salmonella* spp, bactéria Gram-negativa. Assim, o BOX-PCR foi a técnica adotada para verificar a disseminação dos genes de SEM entre os isolados Gram-negativos, que gerou bandas polimórficas (Figura S2). A dinâmica de disseminação dos isolados e de seus genes do SEM, pode ser observada na figura 4, constituído por quatro clusters designados por letras de A a D.

No cluster A é possível observar que três isolados de *Enterobacter* spp. apresentaram 100% de identidade no perfil de polimorfismo e foram provenientes de animais encontrados próximos as duas diferentes UBS (W e Y). Esses isolados continham os genes *acrA* e *acrB*, e um isolado mostrou atividade de efluxo. Esses resultados nos alertam para medidas de controle desses animais semidomiciliados nestes locais, uma vez que, os cães funcionam como disseminadores desses agentes entre os cães e entre as pessoas, podendo essa propagação ocorrer também, pelas proximidades entre as UBS.

Figura 4. Dendrograma dos isolados Gram-negativos provenientes de cães, profissionais de saúde e usuários das UBS (W, Y, Z) (2019) baseado na análise de agrupamento dos perfis de impressão digital BOX-PCR associado com os genes de Sistemas de Efluxos Multidrogas.



C: cão; P: profissional de saúde; U: usuário; 1 e 2ª se referem ao período de coleta das amostras (inverno e verão). A linha vermelha representa a delimitação dos clusters.

Fonte: Autora, 2023.

No cluster B, dois isolados de *Enterobacter cloacae* demonstraram 100% de identidade no perfil de polimorfismo genético, sendo provenientes do mesmo cão, demonstrando que podem ser semelhantes, apesar de apresentarem perfis de resistência diferentes para duas classes de antimicrobianos, além de carregarem dois importantes genes de SEM, *acrA* e *acrB*.

O cluster C foi o maior e agrupou cinco isolados de *Pantoea stewartii* em que quatro delas exibiram 100% de identidade no perfil polimorfismo. É possível observar que os isolados foram oriundos de cães diferentes, e que no momento da coleta estavam próximos às diferentes UBS. Colocando assim, o cão como colonizador desse agente que detém genes importantes de SEM, apesar de não ter sido verificado atividade de efluxo para estes isolados. Contudo, nota-se, que em um profissional de saúde (Figura 4, P4) foi detectado colonizado por *Pantoea* spp, o que indica possível contato deste com os cães que vivem próximos a UBS arremetendo à interação entre humano-cão-ambiente. Devido à escassez de trabalhos envolvendo este grupo de

microrganismo, novas pesquisas abrangendo o conceito de *One Health* devem ser realizadas para entender a participação desse patógeno na disseminação da resistência bacteriana.

No cluster D, dois isolados de *Klebsiella pneumoniae* apresentaram 100% de similaridade provenientes do mesmo animal, com perfis diferentes de resistência à três classes de antimicrobianos, indicando a permanência destes isolados em cães. De acordo com o grau de similaridade estabelecido de 80% sete isolados não agruparam.

A ocorrência de isolados portadores de genes de resistência antimicrobiana, provenientes de profissionais de saúde e de pacientes que frequentam as UBS, bem como de animais semidomiciliados, sugerem a contribuição de cada um desses componentes para a disseminação desses patógenos entre as UBS, reforçando a necessidade de medidas preventivas e de informação à comunidade e aos profissionais de saúde quantos aos processos de higienização das mãos.

4 CONCLUSÕES

Staphylococcus aureus e bactérias Gram-negativas isolados de cães e de humanos (usuários e profissionais) provenientes das UBS, atenção primária a saúde, carregam diversos genes de sistemas de efluxo multidrogas, um importante mecanismo de resistência aos antimicrobianos, os quais circulam entre os nichos humano e animal demonstrando a relevância de trabalhos realizados com a abordagem saúde única nestes locais de assistência à saúde.

REFERENCIAS

- ABAZADEH, D.; RANJAR, R. (GTG)5-PCR Mediated Molecular Typing of Zoonotic Bacteria. **World Veterinary Journal**, v. 11, n. 2, p. 279 - 283, 2021.
- ABD El-Baky, R. M. *et al.* A novel mechanism of action of ketoconazole: inhibition of the *NorA* efflux pump system and biofilm formation in multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. **Infection and Drug Resistance**, v.12, p.1703-1718, 2019.
- ABDULAMIR, A.; AL-BAAJ, A.; AL-RAMAHY, S. K. Determination some virulence genes (*avrXacE2*, *avrXacE1*, *hrpG*, *acrAB*) in *Pantoea* spp. isolated from hospitals of Al-Diwaniyah city, Iraq. **Journal of physics: conference series**, v.1664, p. 1-10, 2020.
- ANNAVAJHALA, M. K. *et al.* Multidrug-resistant *Enterobacter cloacae* Complex emerging as a global, diversifying threat. **Frontiers in Microbiology**, v.10, p.1-8, 2019.
- BABAZADEH, D.; RANJBA, R. (GTG) 5-PCR Mediated Molecular Typing of Zoonotic Bacteria. **World Veterinary Journal**, v.11, n. 2, p. 279-283, 2021.
- BIEROWIEC, K.; PŁONECZKA-JANECZKO, K.; RYPUŁA, K. Is the Colonisation of *Staphylococcus aureus* in Pets Associated with Their Close Contact with Owners?. **PLoS One**, v. 11, n. 5, p.1-14, 2016.
- BOHNERT, J. A.; KARAMIAN, B.; NIKAIDO, H. Optimized Nile Red efflux assay of AcrAB-TolC multidrug efflux system shows competition between substrates. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.54, n.9, p.3770-3775, 2010.
- BORNET, C. *et al.* Imipenem and expression of multidrug efflux pump in *Enterobacter aerogenes*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.301, n. 4, p. 985-990, 2003.
- BRUCE, S. A. *et al.* Shared antibiotic resistance and virulence genes in *Staphylococcus aureus* from diverse animal hosts. **Scientific Reports**, v.12, p.1-11, 2022.
- CANEIRAS, C. *et al.* Community- and Hospital-Acquired *Klebsiella pneumoniae* Urinary Tract Infections in Portugal: Virulence and Antibiotic Resistance. **Microorganisms**, v.7, n. 5, p.1-14, 2019.
- CHEN, C.; HOOPER, D.C. Effect of *Staphylococcus aureus* Tet38 native efflux pump on in vivo response to tetracycline in a murine subcutaneous abscess model. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n.3, p.720-723, 2018.
- COSTA, S. S. *et al.* Genetic Diversity of *norA*, Coding for a Main Efflux Pump of *Staphylococcus aureus*. **Frontiers Genetics**, v.9, p.1-11, 2018.

DING, Y. *et al.* *NorB*, an efflux pump in *Staphylococcus aureus* strain MW2, contributes to bacterial fitness in abscesses. **Journal Bacteriology**, v. 190, n.21, p.7123-7129, 2008.

FLOYD, J. L. *et al.* *LmrS* is a multidrug efflux pump of the major facilitator superfamily from *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 54, n.12, p. 5406-5412, 2010.

FOSTER, T.J. Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. Current status and future prospects. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 41, n.3, p. 430-449, 2017.

GIACON, M. M.; SIQUEIRA, F. M., & DA MOTTA, A. de S. Microbial Contamination and Antimicrobial Resistance Profiles Indicate Potential Risks of Infection at the Veterinary Medical Teaching Hospital - UFRGS, Porto Alegre, Brazil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 49, p.1-7, 2021.

GRAZZIOTIN, A. L. *et al.* Genome Sequencing of Four Multidrug-Resistant *Enterobacter aerogenes* Isolates from Hospitalized Patients in Brazil, **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1-7, 2016.

HASSAN, K. A. *et al.* Pacing across the membrane: the novel PACE family of efflux pumps is widespread in Gram-negative pathogens, **Research in Microbiology**, v. 169, Issues 7-8, p. 450-454, 2018.

HASSANZADEH, S. *et al.* Epidemiology of efflux pumps genes mediating resistance among *Staphylococcus aureus*; A systematic review. **Microbial Pathogenesis**, v.139, p.1-8, 2020.

HASSANZADEH, S. *et al.* Frequency of efflux pump genes mediating ciprofloxacin and antiseptic resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. **Microbial Pathogenesis**, v.111, p. 71-74, 2017.

HENDERSON, P. J. F. *et al.* Physiological Functions of Bacterial “Multidrug” Efflux Pumps, **Chemical Reviews**, v. 121, n. 9, p. 5417-5478, 2021.

HERNANDO-AMADO, S. *et al.* Multidrug efflux pumps as main players in intrinsic and acquired resistance to antimicrobials. **Drug Resist Updat**, v. 28, p. 13-27, 2016.

HOLMSTRÖM, T. C. H. *et al.* *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex in animals: identification and antimicrobial resistance profile. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.42, p. 1-7, 2022.

HUANG, L. *et al.* Bacterial Multidrug Efflux Pumps at the Frontline of Antimicrobial Resistance: An Overview. **Antibiotics (Basel)**, v.11, n.4, p.1-18, 2022.

JANG, S. Multidrug efflux pumps in *Staphylococcus aureus* and their clinical implications. **Journal of Microbiology**, v. 54, n. 1, p.1-8, 2016.

JEAD, M. R.; MOHAMMED, R. K. Detection of *ImrS*, *mepA*, *norC* genes among *Staphylococcus aureus* Isolates. **International Journal of Pharmaceutical Research**, v.12, n.1, Jan - Mar 2020.

JOMEHZADEH, N.; AHMADI, K.; BAHMANSHIRI, M. A. Investigation of plasmid-mediated quinolone resistance genes among clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* in southwest Iran. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 36, n. 7, p.1-6, 2022.

JUAN, C. H. *et al.* Risk Factors, Outcomes, and Mechanisms of Tigecycline-Nonsusceptible *Klebsiella pneumoniae* Bacteremia. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 12, p. 7357-7363, 2016.

KAATZ, G. W. *et al.* Evidence for the existence of a multidrug efflux transporter distinct from *NorA* in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 5, p.1404-1406, 2000.

KUMAR, S. *et al.* Structural basis of inhibition of a transporter from *Staphylococcus aureus*, *NorC*, through a single-domain camelid antibody. **Communications Biology**, v.4, p. 1-11, 2021.

LAGHA, R. *et al.* Molecular characterization of multidrug resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates recovered from King Abdulaziz Specialist Hospital at Taif City, Saudi Arabia. **Journal of Infection and Public Health**, v.14, n.1, p.143-151, 2021.

LERMINIAUX, N. A.; CAMERON, A. D. S. Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in clinical environments. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 65, n.1, p.34-44, 2019.

LEUS, I.V.; WEEKS, J. W.; BONIFAY, V.; SMITH, L.; RICHARDSON, S.; ZGURSKAYA, H. I. Substrate Specificities and Efflux Efficiencies of RND Efflux Pumps of *Acinetobacter baumannii*. **Journal of Bacteriology**, v. 200, n. 13, p.1-18, 2018.

LI, B. *et al.* Characterisation of fluoroquinolone resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* of human and pig origin. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 12, p. 77-78, 2018.

LI, J. *et al.* The nature and epidemiology of OqxAB, a multidrug efflux pump. **Antimicrob Resist Infect Control**, v.8, n.44, p.1-13, 2019.

LI, S. *et al.* Molecular characteristics of carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. from clinical infection samples and fecal survey samples in Southern China. **BMC Infectious Diseases**, v.19, n.1, p.1-12, 2019.

LIECKFELDT, E.; MEYER, W.; BORNER, T. Rapid identification and differentiation of yeast by DNA and PCR fingerprinting. **Journal of Basic Microbiology**. v.33, n.6, p.413-425, 1993.

LIU, G.; QIN, M. Analysis of the Distribution and Antibiotic Resistance of Pathogens Causing Infections in Hospitals from 2017 to 2019. **Evidence Based Complementary Alternative Medicine**, v. 2022, p.1-17, 2022.

LOZANO-VILLEGAS, K.; RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ, R.; RONDÓN-BARRAGÁN, I. Effectiveness of six molecular typing methods as epidemiological tools for the study of *Salmonella* isolates in two Colombian regions. **Veterinary World**, v.12, n.12, p.1998-2006, 2019.

MARTINEAU, F. *et al.* Correlation between the Resistance Genotype Determined by Multiplex PCR Assays and the Antibiotic Susceptibility Patterns of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 2, p. 231–238, 2000.

NAVON-VENEZIA, S. *et al.* *Klebsiella pneumoniae*: uma importante fonte mundial e transporte para resistência a antibióticos. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 41, Edição 3, p. 252–275, 2017.

NISHINO, K.; YAMASAKI, S.; NAKASHIMA, R. *et al.* Function and Inhibitory Mechanisms of Multidrug Efflux Pumps. **Frontiers Microbiology**, v.12, p. 1-13, 2021.

PAKZAD, I. *et al.* Contribution of *AcrAB* efflux pump to ciprofloxacin resistance in *Klebsiella pneumoniae* isolated from burn patients. **GMS Hygiene and Infection Control**, v.8, n. 2, p. 1-6, 2013.

PIDDOCK, L. J. V. The 2019 Garrod Lecture: MDR efflux in Gram-negative bacteria—how understanding resistance led to a new tool for drug discovery, **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 74, Issue 11, p. 3128-3134, 2019.

PIDDOCK, L. Multidrug-resistance efflux pumps not just for resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, p. 629–636, 2006.

POOLE, K. Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms. **Annals of Medicine**, v. 39, n. 3, p.162-176, 2007.

POURMAND, M. R.; *et al.* Evaluation of expression of NorA efflux pump in ciprofloxacin resistant *Staphylococcus aureus* against hexahydroquinoline derivative by real-time PCR. **Acta Medica Iranica**. v. 52, n. 6, p. 424-429, 2014.

POURNARAS, S. *et al.* Current perspectives on tigecycline resistance in *Enterobacteriaceae*: susceptibility testing issues and mechanisms of resistance. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v. 48, n.1, p.11-18, 2016.

RAMIREZ, D.; GIRON, M. **Infecções por Enterobacter**. [Atualizado em 27 de junho de 2022]. In: StatPearls [Internet]. Ilha do Tesouro (FL): Publicação StatPearls; 2022 janeiro-. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559296/>

REYNOLDS, E.; ROSS, J. I.; COVE, J. H. Msr(A) and related macrolide/streptogramin resistance determinants: incomplete transporters?. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 22, n.3, p. 228-236, 2003.

SUNG, J. Y. *et al.* Emergence of *Acinetobacter pittii* harboring New Delhi metallo-beta-lactamase genes in Daejeon, Korea. **Annals of Laboratory Medicine**, v. 35, n. 5, p. 531-534, 2015.

SVEC, P. *et al.* Identification of *Staphylococcus* spp. using (GTG)₅-PCR *fingerprinting*. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 33, n. 8, p. 451-456, 2010.

SHAMKHI, G. J.; SAADEDIN, S. M. K.; JASSIM, K. A. Detection the Prevalence of Some Chromosomal Efflux Pump Genes in Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* Isolated from Iraqi Patients, **Iraqi Journal of Biotechnology**, v. 18, n. 3, p.33-42, 2019.

SPIGAGLIA, P.; MASTRANTONIO, P. Evaluation of repetitive element sequence-based PCR as a molecular typing method for *Clostridium difficile*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 6, p. 2454-2457, 2003.

TRUONG-BOLDUC, Q. C.; STRAHILEVITZ, J.; HOOPER, D. C. NorC, a new efflux pump regulated by MgrA of *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n.3, p. 1104-1107, 2006.

VAN BAMBEKE, F. *et al.* Antibiotic efflux pumps in prokaryotic cells: occurrence, impact on resistance and strategies for the future of antimicrobial therapy. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, n. 5, p. 1055-1065, 2003.

VARGIU, A. V. *et al.* Editoria: bad drugs in the XXIst Century: resistance mediated by multi-drug efflux pumps in Gram-negative bacterias. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1-3, 2016.

VERSALOVIC, J. *et al.* Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods in Molecular and Cellular Biology**, v. 5, n.1, p. 25-40, 1994.

XU, C.; BILYA, S. R.; XU, W. *adeABC* efflux gene in *Acinetobacter baumannii*. **New Microbes and New Infections**, v. 30, p.1 - 6, 2019.

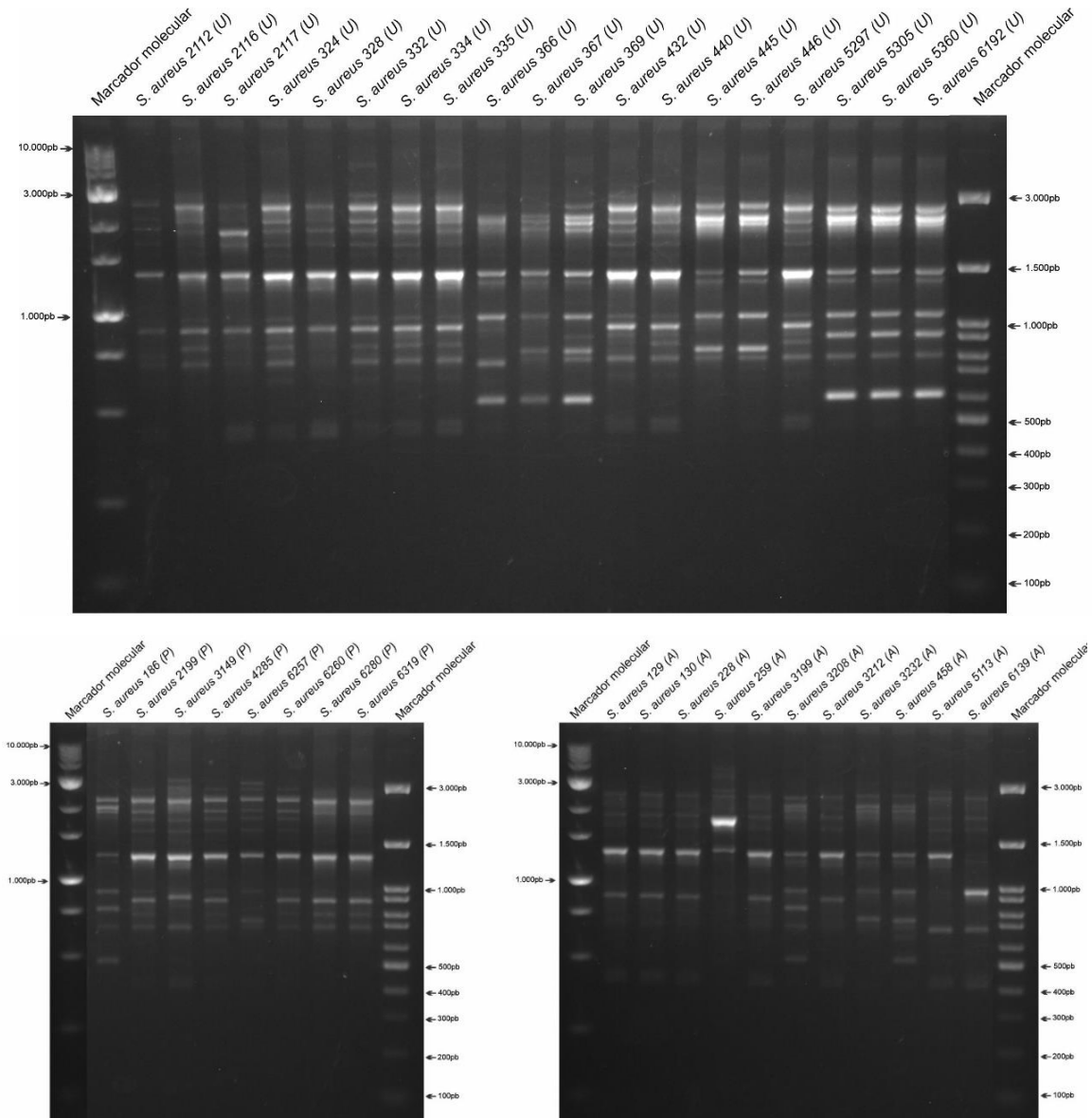
ZAHEER, R. *et al.* Surveillance of *Enterococcus* spp. reveals distinct species and antimicrobial resistance diversity across a One-Health continuum. **Scientific Reports**, v.10, p. 1-16, 2020.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados deste estudo evidenciam que as UBS correspondem à ambientes favoráveis a circulação de bactérias portadoras de genes de sistemas de efluxos multidrogas demonstrando a necessidade de mais estudos envolvendo o tema de saúde única com intuito de determinar o perfil genético e fenotípico de resistência em patógenos de importância para saúde humana e animal e a sua disseminação entre animal, humano e ambiente.

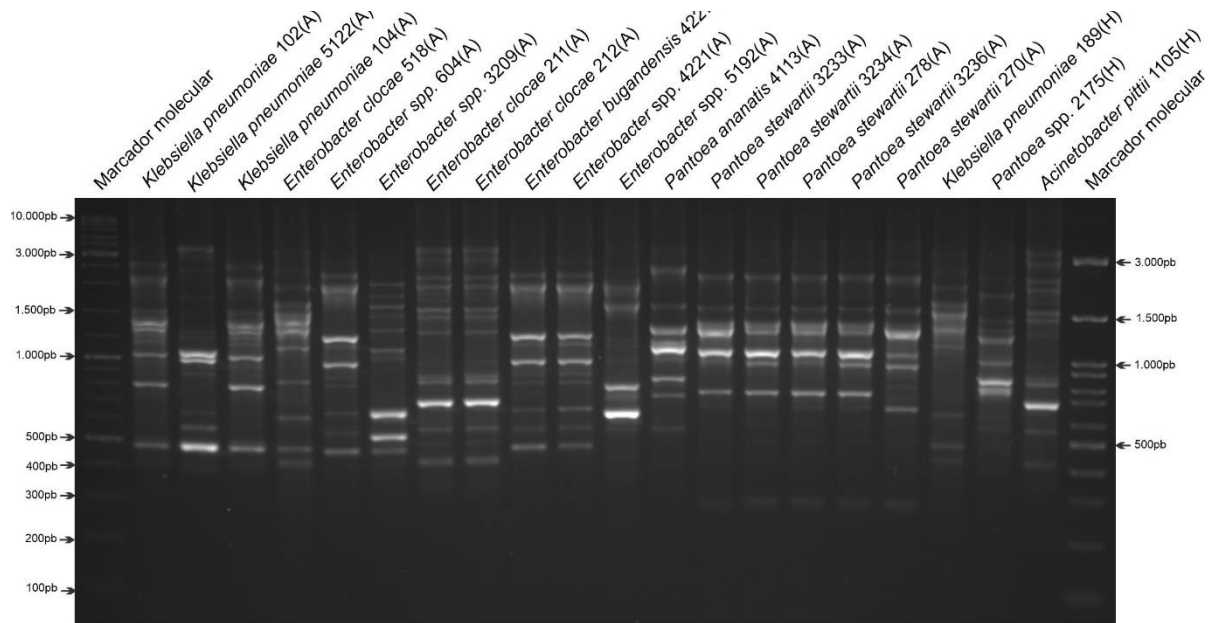
MATERIAL SUPLEMENTAR

Figura S1. Perfil de impressão digital por GTG)5-PCR de cepas de *Staphylococcus aureus* de cães e de humanos que frequentam as UBS de Viçosa-MG (2019).



U: usuário; A: animal; P: profissional;

Figura S2. Perfil de impressão digital por BOX-PCR de isolados Gram-negativos provenientes de cães e humanos que frequentam as UBS de Viçosa-MG, 2019.



A: animal; H: humano;

Quadro S1. Perfil de resistência de *Staphylococcus aureus* isolados de humanos e cães semidomiciliados em UBS de Viçosa-MG (2019) frente aos antimicrobianos testados.

ORI.	ID	ANTIBIÓTICOS												
		PEN	CLO	ERI	TRI	DOX	TET	GEN	NOR	SUL	NIT	SUT	CIP	LNZ
P	2199	R	S	R	S	S	S	R	S	I	S	S	S	S
U	2112	S	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S
U	2117	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
U	2116	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
U	367	R	S	S	S	I	R	S	S	S	S	S	S	S
U	366	R	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	I	S
P	3149	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
U	332	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
U	324	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
U	328	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
U	369	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
U	334	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
P	4285	R	S	R	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S
U	446	S	S	R	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S
U	445	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
U	335	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
U	5297	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
U	440	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
U	432	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
U	5305	R	S	I	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S
P	6280	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
P	6257	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S
U	5360	R	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S
P	186	S	S	I	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S
P	6319	R	S	R	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S
U	6192	R	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
P	6260	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
C	259	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S
C	3199	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
C	3208	R	S	I	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S
C	228	R	S	R	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S
C	3232	R	S	I	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S
C	3212	R	S	R	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S
C	458	S	S	S	S	R	R	S	S	I	S	S	S	S
C	5113	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
C	129	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
C	6139	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S
C	130	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

O: origem; U: usuário; P: profissional; C: cão; S: sensível; R: resistente; I: intermediário. PEN: penicilina; CLO: cloranfenicol; ERI: eritromicina; TRI: trimetoprim; DOX: doxiciclina; TET: tetraciclina; GEN: gentamicina; NOR: norfloxacina; SUL: sulfonamida; NIT: nitrofurantoína; SUT: sulfazotrim; CIP: ciprofloxacina; LNZ: linezolida.

Quadro S2. Perfil de resistência de isolados Gram-negativos provenientes de humanos e cães semidomiciliados de UBS de Viçosa-MG (2019) frente aos antimicrobianos

ORI	ID	ANTIBIÓTICOS														
		CPM	AZI	AMP	NIT	EST	TRI	SUL	TET	GEN	NOR	SUT	CLO	DOX	CIP	AMO
C	102	I	S	R	R	I	S	S	S	S	S	S	S	S	I	R
	189	S	S	I	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	I
C	5122	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S
C	104	S	R	R	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	I	R
C	518	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
C	5192	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R
C	604	S	R	R	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R
C	3209	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
C	211	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	R
C	212	S	S	R	I	S	S	I	S	S	S	S	S	S	I	R
C	4221	S	S	I	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	I	I
C	4227	I	S	I	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	I	R
C	1105	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
C	3234	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
C	3236	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
C	278	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
h	2175	S	S	R	S	I	S	R	S	S	S	S	S	S	I	R
C	270	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
C	3233	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
C	4113	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R

ORI: origem; U: usuário; P: profissional; C: cão; S: sensível; R: resistente; I: intermediário; CPM: cefepime; AZI: azitromicina; AMP: ampicilina; NIT: nitrofurantoina; EST: estreptomicina; TRI: trimetoprim; SUL: sulfonamidas; TET: tetraciclina; GEN: gentamicina; NOR: norfloxacin; SUT: sulfazotrim; CLO: cloranfenicol; DOX: doxicilina; CIP: ciprofloxacina; AMO: amoxicilina;

APÊNDICE A- QUESTIONÁRIO – USUÁRIO DA ESF

PROJETO					
Entrevistador:		Data:		Nº da amostra:	
1. Nome					
2. Data de nascimento					
3. Sexo		<input type="checkbox"/> Feminino <input type="checkbox"/> Masculino <input type="checkbox"/> Outro			
4. Escolaridade		<input type="checkbox"/> Fundamental <input type="checkbox"/> Médio <input type="checkbox"/> Superior <input type="checkbox"/> analfabeto <input type="checkbox"/> completo <input type="checkbox"/> incompleto			
5. Formação profissional					
6. Endereço residencial					
7. Tipo de residência		<input type="checkbox"/> casa <input type="checkbox"/> apartamento <input type="checkbox"/> sítio/chácara <input type="checkbox"/> outro:			
8. Mora com quem		<input type="checkbox"/> sozinho <input type="checkbox"/> pais___ <input type="checkbox"/> cônjuge <input type="checkbox"/> filhos/as___ <input type="checkbox"/> amigos/as___			
9. Animal de estimação		<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não	9.1. Quais/quantos:		
			9.2. Acesso à rua:		<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não
10. Local de trabalho					
11. Cargo / função					
12. Tempo que trabalha neste cargo / função?					
13. Principais atividades desenvolvidas					
14. Fez algum treinamento de higienização das mãos?			<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não		
Se sim,	14.1. Qual?				
	14.2. Quando?				
	14.3. Onde?				
15. Com relação a lavagem das mãos,	15.1. Frequência / diária?				
	15.2. Local?				
	15.3. Procedimento?				
	15.4. Produto utilizado?				
	15.5. Há quanto tempo lavou as mãos?				
16. Serviços de Saúde da ESF	16.1. Motivo da procura?				
	16.2. Frequência que vem a UBS?				
	16.3. Visita de ACS?		<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não		16.3.1. Frequência:
	16.4. Visita de Veterinário - UFV			<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não	16.4.1. Motivo:

17. Observações

APÊNDICE B - QUESTIONÁRIO – PROFISSIONAL DA ESF

PROJETO					
Entrevistador:		Data:		Nº da amostra:	
1. Nome					
2. Data de nascimento					
3. Sexo	<input type="checkbox"/> Feminino <input type="checkbox"/> Masculino <input type="checkbox"/> Outro				
4. Escolaridade	<input type="checkbox"/> Fundamental <input type="checkbox"/> Médio <input type="checkbox"/> Superior <input type="checkbox"/> analfabeto <input type="checkbox"/> completo <input type="checkbox"/> incompleto				
5. Formação profissional					
6. Endereço residencial					
7. Tipo de residência	<input type="checkbox"/> casa <input type="checkbox"/> apartamento <input type="checkbox"/> sítio/chácara <input type="checkbox"/> outro:				
8. Mora com quem	<input type="checkbox"/> sozinho <input type="checkbox"/> pais___ <input type="checkbox"/> cônjuge <input type="checkbox"/> filhos/as___ <input type="checkbox"/> amigos/as___				
9. Animal de estimação	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não	9.1. Quais/quantos:			
		9.2. Acesso à rua:	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não		
10. Local de trabalho					
11. Cargo / função					
12. Tempo que trabalha neste cargo / função?					
13. Principais atividades desenvolvidas					
14. Fez algum treinamento de higienização das mãos?				<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não	
Se sim,	14.1. Qual?				
	14.2. Quando?				
	14.3. Onde?				
15. Com relação a lavagem das mãos,	15.1. Frequência / diária?				
	15.2. Local?				
	15.3. Procedimento?				
	15.4. Produto utilizado?				
	15.5. Há quanto tempo lavou as mãos?				
16. Costuma lavar as mãos no decorrer de suas atividades laborais?	<input type="checkbox"/> sim	16.1. Por quê?			
	<input type="checkbox"/> não				
	<input type="checkbox"/> sim	17.1. Tipo de luva?			

17. Utiliza luvas durante algum procedimento?	<input type="checkbox"/> não	17.2. Em qual procedimento?	
18. Observações			

APÊNDICE C – ROTEIRO OBSERVACIONAL AMBIENTE

PROJETO					
Observador:		Data:		Nº da amostra:	
Local de coleta da amostra do ambiente					

ITENS A SEREM OBSERVADOS	SIM	NÃO	NÃO FOI POSSÍVEL OBSERVAR	OBSERVAÇÕES
Instalações sanitárias	Separado por sexos			
	Com vasos sanitários e mictórios e lavatórios			
	Em funcionamento			
	Limpos			
	Pisos e azulejos em bom estado			
	Iluminação e ventilação			
Lixo do estabelecimento	Recipiente com tampa e pedal			
	Livre de roedores e insetos			
	Armazenados para coleta			
Higiene das mãos	Lixeira acionada por pedal			
	Torneira acionada sem contato manual			
	Lavatórios exclusivos para higienização das mãos			
	Papel toalha			
	Sabão líquido			
	Desinfetante para as mãos			
Controle de pragas e vetores	Presença de insetos			
	Presença de roedores			
	Presença de cães			
	Nas vias públicas			
Higiene do ambiente	Pessoa específica para a função			
	Limpo e organizado			
	Uso de desinfetante			

APÊNDICE D- FICHA CÃO

PROJETO				
Pesquisador:		Data:		Nº da amostra:
1. Local onde foi encontrado				
2. Cor				
3. Pelagem	<input type="checkbox"/> curto <input type="checkbox"/> médio <input type="checkbox"/> longo			
4. Sexo	<input type="checkbox"/> Fêmea <input type="checkbox"/> Macho <input type="checkbox"/> Outro <input type="checkbox"/> inteiro <input type="checkbox"/> castrado <input type="checkbox"/> não observado			
5. Escore corporal	<input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5			
6. Peso (aproximado - quilos)	<input type="checkbox"/> até 5 <input type="checkbox"/> 5 a 15 <input type="checkbox"/> 15 a 25 <input type="checkbox"/> 25 a 45 <input type="checkbox"/> mais que 45 Kg			
7. Porte	<input type="checkbox"/> mini <input type="checkbox"/> pequeno <input type="checkbox"/> médio <input type="checkbox"/> grande <input type="checkbox"/> gigante			
8. Idade (aproximada – anos)	<input type="checkbox"/> até 0,5 <input type="checkbox"/> de 0,5 a 1,5 <input type="checkbox"/> de 1,5 a 5 <input type="checkbox"/> maior que 5 anos			
9. Presença de	<input type="checkbox"/> feridas <input type="checkbox"/> miíases <input type="checkbox"/> secreção ocular <input type="checkbox"/> ectoparasitas			
10. Estado geral de saúde				
11. Temperamento	<input type="checkbox"/> dócil <input type="checkbox"/> arreadio <input type="checkbox"/> agressivo			
10. Observações				

ANEXOS**A - CERTIFICADO CEUA/UFV****CERTIFICADO**

A Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UFV certifica que o processo nº 79/2018, intitulado "**Sistemas de efluxo multidrogas: detecção e disseminação da resistência antimicrobianos em bactérias modelos isolados das três esferas da Saúde Unificada (One Health)**", coordenado pela professora Maria A. Scatamburlo Moreira do Departamento de Veterinária, está de acordo com a Legislação vigente (Lei Nº 11.794, de 08 de outubro de 2008), as Resoluções Normativas editadas pelo CONCEA/MCTI, a DBCA (Diretriz Brasileira de Prática para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos) e as Diretrizes da Prática de Eutanásia preconizadas pelo CONCEA/MCTI, portanto sendo aprovado por esta Comissão em 17/12/2018, com validade de 12 meses.

CERTIFICATE

The Ethic Committee in Animal Use/UFV certify that the process number 79/2018, named "**Multidrug efflux systems: detection and dissemination of antimicrobial resistance in isolated bacterial models of the three spheres of Unified Health (One Health)**", is in agreement with the a actual Brazilian legislation (Lei Nº 11.794, 2008), Normative Resolutions edited by CONCEA/MCTI, the DBCA (Brazilian Practice Guideline for the Care and Use of Animals for Scientific Purposes and Teaching) and the Guidelines of Practice the Euthanasia recommended by CONCEA/MCTI therefore being approved by the Committee on December 17, 2018 valid for 12 months.



Prof.ª Átima Clemente Alves Zuanon

Presidente

Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UFV

B- PARECER DO CEP/UFV**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Sistemas de Efluxo Multidrogas: detecção e disseminação da resistência antimicrobianos em bactérias modelos isoladas das três esferas da Saúde Unificada (One Health)

Pesquisador: Maria Aparecida Scatamburlo Moreira

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 01443018.1.0000.5153

Instituição Proponente: Departamento de Veterinária

Patrocinador Principal: CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTIFICO E TECNOLÓGICO-CNPQ

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.014.634

Apresentação do Projeto:

O presente protocolo foi enquadrado como pertencente à Área Temática: Grande Área 4. Ciências da Saúde.

Conforme resumo apresentado no formulário online da Plataforma: A emergência no reconhecimento de que a propagação da resistência aos antimicrobianos tem sido um problema grave de saúde pública. Nessa pesquisa, pretendemos detectar e elucidar o papel dos Sistemas de Efluxo Multidrogas no desenvolvimento e na disseminação da resistência a antimicrobianos em bactérias modelos, isoladas nas três esferas do One Health (animal, humano e ambiente) e democratizar os resultados com a perspectiva de que agentes