



UNISUL

UNIVERSIDADE DO SUL DE SANTA CATARINA

FLÁVIA DA SILVA WAGNER

**PERFIL ANTIMICROBIANO DE CEPAS DE *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e
Pseudomonas aeruginosa ISOLADAS DO RIO TUBARÃO/SC**

Tubarão

2018

FLÁVIA DA SILVA WAGNER

**PERFIL ANTIMICROBIANO DE CEPAS DE *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e
Pseudomonas aeruginosa ISOLADAS DO RIO TUBARÃO/SC**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Ciências Biológicas da Universidade do Sul de Santa Catarina como requisito parcial ao grau de Licenciada em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Vinícius José Maschio, Dr.

Tubarão

2018

FLÁVIA DA SILVA WAGNER

**PERFIL ANTIMICROBIANO DE CEPAS DE *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e
Pseudomonas aeruginosa ISOLADAS DO RIO TUBARÃO/SC**

Esta Monografia foi julgada adequada à obtenção do grau de Licenciada em Ciências Biológicas e aprovada em sua forma final pelo Curso de Ciências Biológicas da Universidade do Sul de Santa Catarina.

Tubarão, 26 de novembro de 2018.

Professor e orientador Vinícius José Maschio, Dr.
Universidade do Sul de Santa Catarina

Prof. Renê Darela Blazius, Dr.
Universidade do Sul de Santa Catarina

Prof. Jairo Nunes Balsini, Msc.
Universidade do Sul de Santa Catarina

Dedico este trabalho aos meus pais, por acreditarem e investirem na minha trajetória acadêmica. Tenho uma admiração e um orgulho imenso de vocês.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por tudo que conquistei até agora e por me dar sabedoria para enfrentar as dificuldades que são impostas ao longo do meu caminho.

Agradeço a universidade e ao curso de Ciências Biológicas por me ter proporcionado novos conhecimentos e ensinamentos para além da vida profissional.

Ao professor Dr. Vinicius José Maschio pela orientação e apoio na elaboração deste trabalho. Obrigada por dividir seus conhecimentos e por fazer da minha monografia uma experiência positiva.

Aos meus pais, Marcelo e Lorena e minha irmã Maria Eduarda, que são a minha base, sou grata pelo amor, pelo incentivo e pelo suporte necessário para a conclusão do curso. Sem vocês a realização desse sonho não seria possível.

Ao meu namorado Alex Júnior, aos meus amigos Felipe e Aline, e aos demais, que de uma forma ou de outra, me apoiaram e estiveram comigo quando eu precisei. Vocês são pessoas especiais e foram fundamentais para que eu concluísse mais uma etapa da minha vida.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota” (Madre Teresa de Calcutá).

RESUMO

A água doce existente em rios é fundamental para o desenvolvimento das cidades, entretanto ao mesmo tempo ela se apresenta como um importante veiculador de microrganismos de importância médica, como a *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. e *Pseudomonas aeruginosa*. A presença dessas bactérias no ambiente, juntamente com a liberação de resíduos orgânicos de diversas origens, contribui para a manutenção e multiplicação destas bactérias no ambiente e consequentemente otimiza a aquisição e a dispersão de patogenicidade e resistência. Apesar de ser um mecanismo natural, a atividade antropogênica tem influenciado em muito nesses processos e a resistência bacteriana frente a antimicrobianos atualmente é considerada um dos maiores problemas à saúde pública, dado que muitas dessas bactérias se tornaram resistentes a fármacos que comumente eram susceptíveis. Assim sendo, o presente estudo teve como objetivo principal traçar o perfil de resistência a antimicrobianos de cepas de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* isoladas do perímetro urbano do rio Tubarão, na cidade de Tubarão/SC. Foram analisadas 5 amostras de água superficial, sendo utilizada a técnica de membrana filtrante para isolamento bacteriano, além de 5 diferentes meios de cultura. Para complementar a identificação bacteriana foi realizada a técnica de coloração de Gram e para a verificação da sensibilidade das bactérias frente aos antimicrobianos foi feito o TSA, de acordo com o método de difusão em disco de Kirby-Bauer. Foi observado o crescimento bacteriano em todos os meios de culturas e em todos os pontos de coleta, sendo observado também em todos esses pontos, o crescimento característico de *E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*. O TSA foi feito para essas bactérias, porém, somente do ponto 1, 3 e 4, sendo assim, o ponto de coleta que obteve mais resistência foi o P3 (73,3%), seguido do P1 (53,3%) e por último, P4 (44,4%), onde *P. aeruginosa* (77,7%) demonstrou ser a espécie mais resistente aos antimicrobianos testados, seguida pela *K. pneumoniae* (59,9%) e *E. coli* (33,3%). Contudo, a partir dos resultados obtidos podemos identificar a presença de microrganismos potencialmente patogênicos que são resistentes a vários antimicrobianos, sendo que o isolamento destes, no perímetro é de suma importância para o bem-estar da população.

Palavras-chave: Bactérias. Resistência a antibióticos. TSA. Água.

ABSTRACT

Freshwater in rivers is fundamental for the development of cities, but at the same time it presents itself as an important carrier of microorganisms of medical importance, such as *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. and *Pseudomonas aeruginosa*. The presence of these bacteria in the environment, together with the release of organic residues from diverse origins, contributes to the maintenance and multiplication of these bacteria in the environment and consequently optimizes the acquisition and dispersion of pathogenicity and resistance. Despite being a natural mechanism, anthropogenic activity has greatly influenced these processes and bacterial resistance to antibiotics is currently considered one of the major public health problems since many of these bacteria have become resistant to drugs that were commonly susceptible. Thus, the main objective of the present study was to trace the antibiotic resistance profile of strains of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from the urban perimeter of the Tubarao River, in the Tubarao city / SC. Five superficial water samples were analyzed, using a filter membrane technique for bacterial isolation, in addition to 5 different culture media. To complement the bacterial identification was performed the Gram staining technique and to verify the sensitivity of the bacteria against the antibiotics was done AST, according to the Kirby-Bauer disk diffusion method. Bacterial growth was observed in all culture media and at all collection sites and the characteristic growth of *E. coli*, *K. pneumoniae* and *P. aeruginosa* was also observed at all of these points. The AST was made for these bacteria, P3 (73.3%), followed by P1 (53.3%), and finally P4 (44.4%). *P. aeruginosa* (77,7%), *K. pneumoniae* (59.9%) and *E. coli* (33.3%) were found to be the most resistant species to the antibiotics tested. However, from the obtained results we can identify the presence of potentially pathogenic microorganisms that are resistant to several antibiotics, and the isolation of these in the perimeter is of paramount importance for the well-being of the population.

Keywords: Bacteria. Resistance. AST.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

| | |
|------------------------|---|
| µm | Micrômetro |
| µg | Micrograma |
| ≤ | Menor que |
| ≥ | Maior que |
| * | Presença de colônias |
| ^ | Presença de dois halos |
| # | Amostra com erro |
| % | Porcento |
| ° | Graus |
| ± | Mais ou menos |
| B | Beta |
| A1 | Amostra 1 |
| A2 | Amostra 2 |
| A3 | Amostra 3 |
| AMC | Amoxicilina + Ácido clavunânico |
| AMI | Amicacina |
| AMP | Ampicilina |
| ATM | Aztreonam |
| <i>BlaIMP</i> | Gene |
| <i>BlaKPC</i> | Gene |
| <i>BlaLEN-1</i> | Gene |
| <i>BlaVIM</i> | Gene |
| <i>BlaSHV-1</i> | Gene |
| CatA | Tipo de gene bacteriano |
| CAZ | Ceftazidima |
| CFO | Cefoxitina |
| CFZ | Cefazolina |
| CIP | Ciprofloxacina |
| CLO | Cloranfenicol |
| CLSI | Instituto de Normas Clínicas e Laboratórios |
| CRO | Ceftriaxona |
| CPM | Cefepime |
| DHPS | Enzima digidropteroato sintase |
| DME | Diagnóstico Microbiológico Especializado |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| ENT | Enterobactérias |
| ESBL | Beta-lactamase de espectro estendido |
| GEN | Gentamicina |
| Km | Quilometro |
| MBL | Metallo-beta-lactamases |
| ml | Mililitro |
| mm | Milímetro |
| MPM | Meropenem |
| OmpA | Tipo de canal de porina em bactérias |
| OmpC | Tipo de canal de porina em bactérias |
| OmpF | Tipo de canal de porina em bactérias |
| P1 | Ponto 1 |

| | |
|--------------|---|
| P2 | Ponto 2 |
| P3 | Ponto 3 |
| P4 | Ponto 4 |
| P5 | Ponto 5 |
| Pse | Pseudomonas |
| PR | Paraná |
| RAM | Resistência aos antimicrobianos Múltiplos |
| RmtD | Enzima |
| RNA | Ácido ribonucleico |
| rRna | RNA receptor |
| SC | Santa Catarina |
| SHV-1 | Enzima |
| SUT | Sulfazotrim |
| TEM-1 | Enzima |
| TET | Tetraciclina |
| TSA | Teste de susceptibilidade antimicrobiana |

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Mecanismo de ação dos antimicrobianos. | 24 |
| Figura 2- Mecanismos de resistência..... | 27 |
| Figura 3 - Rio Tubarão no perímetro urbano da cidade de Tubarão, (SC)..... | 30 |
| Figura 4 - Pontos de coleta ao longo do perímetro urbano do Rio Tubarão na cidade de Tubarão..... | 31 |
| Figura 5 - Meios de culturas utilizados para o crescimento bacteriano. a) Agar pseudomonas, b) Agar sangue, c) Agar cromogênico Geral, d) Agar cromocultbac e e) Agar TSA. | 32 |
| Figura 6 - Ilustração do processo de coloração de Gram. | 33 |
| Figura 7 - Retirada de colônia após o crescimento bacteriano. | 34 |
| Figura 8 - Polisenidisc DME com os 15 antimicrobianos antes e depois na placa de petri com Agar Muller Hinton. | 35 |
| Figura 9 - Demonstração das cores das colônias, E. coli (roxa) e K. pneumoniae (rosa). | 37 |
| Figura 10 - Visualização do microscópio com aumento de 1000x. Bactéria E. coli, após a coloração de Gram..... | 38 |
| Figura 11 - Agar pseudomonas com crescimento na coloração rosa (no centro) característica de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 38 |
| Figura 12 - Repicção de <i>P. aeruginosa</i> da amostra 2 (P3). | 41 |
| Figura 13 - Resultado dos halos em uma amostra e a demonstração da medida feita com régua. | 41 |
| Figura 14 - Antibiograma das amostras coletadas do Rio Tubarão..... | 48 |

LISTA DE QUADRO

Quadro 1 - Microrganismo de veiculação hídrica com suas respectivas doenças e sintomas.20

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 – Zonas de inibição conforme o agente antimicrobiano..... | 36 |
| Tabela 2 – Resultado do Teste de Susceptibilidade a Antimicrobianos das bactérias <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Escherichia coli</i> e <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 44 |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 15 |
| 1.1 FORMULAÇÃO DO PROBLEMA | 16 |
| 1.2 OBJETIVOS | 16 |
| 1.2.1 Geral | 16 |
| 1.2.2 Específicos..... | 17 |
| 1.3 ESTRUTURA DOS CAPÍTULOS | 17 |
| 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA..... | 18 |
| 2.1 ÁGUA | 18 |
| 2.2 DOENÇAS VEICULADAS PELA ÁGUA..... | 19 |
| 2.3 <i>Escherichia coli</i> | 21 |
| 2.4 <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 22 |
| 2.5 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 23 |
| 2.6 RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS..... | 24 |
| 2.6.1 Inibição da síntese da parede bacteriana | 24 |
| 2.6.2 Inibidores da síntese proteica nos ribossomos..... | 25 |
| 2.6.3 Inibidores da síntese de ácidos nucleicos | 25 |
| 2.6.4 Inibidores da síntese de metabolitos essenciais | 25 |
| 2.6.5 Alteração da permeabilidade da membrana celular..... | 26 |
| 2.6.6 Destruição ou inativação da droga | 28 |
| 2.6.7 Modificação ou proteção do alvo macromolecular | 28 |
| 2.6.8 Bomba de efluxo | 28 |
| 2.6.9 Alteração da permeabilidade da membrana celular..... | 28 |
| 3 METODOLOGIA..... | 30 |
| 3.1 NATUREZA E TIPO DE PESQUISA | 30 |
| 3.2 LOCALIZAÇÃO DOS PONTOS DE COLETA | 30 |
| 3.3 LOCAL DE REALIZAÇÃO DA PESQUISA | 31 |
| 3.4 COLETA E PROCESSAMENTO DE AMOSTRA..... | 31 |
| 3.5 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS | 32 |
| 3.5.1 Ágar Cromogênico | 32 |
| 3.5.2 Ágar Pseudomonas..... | 33 |
| 3.5.3 Ágar TSA | 33 |
| 3.5.4 Ágar Sangue..... | 33 |

| | |
|--|-----------|
| 3.5.5 Coloração de Gram | 33 |
| 3.6 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS..... | 34 |
| 3.7 PROCEDIMENTO DE ANÁLISE DOS DADOS | 36 |
| 4 APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS DADOS | 37 |
| 4.1 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS..... | 37 |
| 4.2 TESTE DE SUCEPTIBILIDADES AOS ANTIMICROBIANOS..... | 40 |
| 6. CONCLUSÃO | 49 |
| REFERÊNCIAS | 51 |
| ANEXOS | 59 |
| ANEXO A – MEIO DE CULTURA ÁGAR CROMOGÊNICO GERAL | 60 |
| ANEXO B – MEIO DE CULTURA CROMOCULTBAC | 61 |
| ANEXO C – AGAR PSEUDOMONAS | 62 |

1 INTRODUÇÃO

A água é um recurso natural indispensável para a existência de vida na Terra e para a manutenção do ecossistema. (BRAGA et al., 2015; DIAS, 2016; BORTOLI et al., 2018). Dos 3% de água doce do planeta, somente um quarto é proveniente de rios, lagos e fonte subterrânea, sendo fundamentais para o desenvolvimento das cidades e na qualidade de vida das pessoas (BAHLIS, 2012; DIAS, 2016). Porém, ao mesmo tempo, a água é afetada pelo aumento populacional, por meio do descarte do esgoto doméstico, industrial e agrícola sem tratamento nos recursos hídricos e do lixo nas margens dos rios (BAHLIS, 2012; DIAS, 2016; BORTOLI et al., 2018).

Mesmo que aparentemente limpa e clara, a água pode conter bactérias advindas de animais, vegetais, solo superficial e do despejo de resíduos, como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella* spp., entre outras (CAUMO et al., 2010; OLIVEIRA, 2011). *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* dificilmente estão relacionados em causar doenças pela ingestão de água. Apenas *E.coli* quando transmitida através da via fecal-oral, em águas recreacionais ou potável, pode causar doenças diarreicas e colites hemorrágicas (PERES, 2011; DRUMOND, 2016). Entretanto, normalmente essas três bactérias são relacionadas a infecções do trato urinário, respiratório, corrente sanguínea e sítio cirúrgico em ambiente hospitalar (ARAÚJO, 2016).

Além desses microrganismos, resíduos como detergentes, desinfetantes, metais pesados e agentes antimicrobianos do esgoto doméstico ou veterinário também podem ir para os recursos hídricos e contaminá-los (CAUMO et al., 2010; PORTUGAL, 2015; OLIVEIRA, 2016). Desta maneira, além do risco à saúde causadas por essas bactérias, esses resíduos contribuem para a aquisição e a dispersão de resistência aos antimicrobianos (OLIVEIRA, 2016; LOUREIRO et al., 2016). Essa resistência aos antimicrobianos pode acontecer quando bactérias e fármacos estão presentes no mesmo local, fazendo com que esses microrganismos criem mecanismos de defesa (BAHLIS, 2012; MIRANDA, 2016). Como também pode ocorrer entre bactérias, pertencentes a diferentes espécies e gêneros. E, desta forma, podem transmitir, receber ou trocar genes de resistência por meio da transmissão horizontal de elementos genéticos móveis como plasmídeos, transposons e integrons (BAHLIS, 2012; LOUREIRO et al., 2016; MIRANDA, 2016).

Apesar da resistência ser um mecanismo natural e de pressão seletiva, atualmente é considerado um dos maiores problemas à saúde pública, dado que muitas dessas bactérias se

transformaram-se em fármacos resistentes que comumente eram susceptíveis. Essas formas de resistências estão sendo disseminadas mais rapidamente que a capacidade de produzir novos antimicrobianos (BAHLIS, 2012; ARAÚJO; ALVES; BECHTLUFFT, 2009; ADZITEY; NAFISH; HARUNA, 2015; LOUREIRO et al., 2016). Isso pode gerar consequências clínicas e econômicas, porque os tratamentos convencionais e os protocolos utilizados não são mais eficazes, aumentando os gastos na saúde ou, até mesmo, podendo ocasionar mortes (FRANÇA, 2013; MIRANDA, 2016; LYIMO et al., 2016).

Diante da grande preocupação da resistência aos antimicrobianos em hospitais e suas causas, é importante verificar a susceptibilidade das bactérias em outros locais, em razão de que muitos destes fármacos são produzidos a partir de microrganismos ambientais. Logo, há possibilidade que os genes resistentes sejam originários de ambientes não-clínicos (CAUMO et al., 2010). Sendo assim, a presente pesquisa visa traçar o perfil de susceptibilidade de *E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* isoladas do perímetro urbano do rio Tubarão, na cidade de Tubarão/SC.

Isso posto, por ser considerado o principal rio da cidade, onde corta o município com largura de aproximadamente 115 metros e com profundidade entre 2 a 10 metros, por ser considerado um dos rios mais poluídos do estado de Santa Catarina e ainda por servir como fonte de abastecimento público, industrial, irrigação e recreação na cidade (LIMA et al., 2001; TUBARÃO, 2015; MEDEIROS, 2017). Bem como pelo aumento populacional da cidade de Tubarão sem o planejamento urbano adequado e pela destinação do esgoto cloacal sem tratamento na rede pluvial (RUFINO, 2002; VASCONCELOS et al., 2010; TUBARÃO, 2015; SKORONSKI et al., 2014; TUBARÃO SANEAMENTO, 2018).

1.1 FORMULAÇÃO DO PROBLEMA

Escherichia coli, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* isoladas no perímetro urbano do Rio Tubarão apresentam resistência a antimicrobianos?

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Geral

Traçar o perfil de susceptibilidade de cepas de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* isoladas do Rio Tubarão.

1.2.2 Específicos

Verificar se há presença de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* no material coletado.

Analisar a existência de isolados de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* com multirresistência aos antimicrobianos.

Caracterizar os isolados quanto à susceptibilidade a diferentes classes de antimicrobianos.

1.3 ESTRUTURA DOS CAPÍTULOS

O presente trabalho se divide em cinco capítulos. No primeiro capítulo, consta a introdução juntamente com a justificativa e os objetivos, apresenta-se o tema da pesquisa bem como os objetivos a serem alcançados. O segundo capítulo trata da fundamentação teórica, subdividida em vários subtítulos, assuntos específicos do tema da pesquisa. No terceiro capítulo, apresenta-se a metodologia utilizada na pesquisa, nessa parte é explicado o passo a passo de como o objeto de estudo foi coletado, preparado e analisado. No quarto capítulo, são feitas a descrição e discussão dos resultados, com base em outros trabalhos já feitos. E, por último, no quinto capítulo, está a conclusão, na qual está depositada a experiência desta pesquisadora e as considerações concluídas ao longo da pesquisa.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Neste capítulo é apresentado o referencial teórico que norteou esta pesquisa, subdividido em seis seções. A primeira seção trata da água, onde encontramos, seu uso e também suas características. A segunda seção discorre sobre as doenças veiculadas pela água, ou seja, a quantidade de doenças que podem ser transmitidas ao ser humano quando ingerem a água contaminada por alguns microrganismos parasitas. As três seções seguintes, tratam, especialmente, dos microrganismos *E.coli*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*, suas características, habitat, seu poder de causar doenças e a facilidade de transferir resistência a antimicrobianos. E, na última seção, é tratado do assunto sobre a resistência a antimicrobianos, começando a explicar o que é o antimicrobiano, sua função e seus mecanismos de ação, também o que é a resistência e como ela se dá, os mecanismos adotados pelas bactérias resistentes e a importância na saúde pública.

2.1 ÁGUA

A água é um elemento comum na natureza, é classificado como um solvente universal e pode ser encontrada no estado sólido, líquido e gasoso (LEÃO; OLIVEIRA; PINO, 2014). É um recurso natural que garante a vida de qualquer tipo de ser vivo no planeta, portanto, deve ser de qualidade e ter quantidade suficiente para todos (GOMES, 2015; DIAS, 2016; BORTOLI et al., 2018).

Dos 3% de água doce do planeta, somente 0,3% está disponível para que o ser humano a utilize, onde é proveniente de rios, lagos e fonte subterrânea. A outra grande parte da água doce está localizada em forma de gelo na Antártida e na Groelândia (HAHN, 2013). Quanto a disponibilidade de água doce nos países, o Brasil possui 12%, possuindo 6.220Km³/ano, sendo o primeiro lugar na lista e o maior fluxo interno de recursos hídricos do mundo (OLIVEIRA, 2011). Apesar de ter um volume alto de água nos recursos hídricos no Brasil, esse volume se distribui de forma desigual ao longo do país, 80% dessa água encontra-se na Amazônia, local onde vive 5% da população total. E apesar disso, o desperdício de água correspondem a 30% e 60% nas regiões do Sul e Sudeste e Nordeste, respectivamente (VOLKMER, 2017).

Para atender uma população é necessário que a qualidade da água esteja dentro dos parâmetros físicos, químicos e biológicos, afim de manter o bem estar e a qualidade de

vida das pessoas, pois a água é responsável em várias funções do dia-a-dia, como a alimentação, consumo, higiene e também para o lazer (FRANÇA, 2013; BORTOLI et al., 2018). Além da participação em vários fatores que acontece na natureza, como as mudanças climáticas, fenômenos meteorológicos, fotossíntese e produção de energia (BRAGA et al., 2015). Considera-se então que a água é um recurso controlador de distribuição de espécies na terra (OLIVEIRA, 2011).

Porém, esse recurso natural é finito e está sendo afetado pelo aumento populacional, pois ao mesmo tempo que é fornecida à população, sejam para residências, para agricultura ou para indústrias, essa água volta para seu ambiente poluída, principalmente quando não há saneamento básico, deixando os recursos hídricos ficarem expostos a produtos poluidores e aos lixos, o que acaba contaminando (BAHLIS, 2012; LEÃO; OLIVEIRA; PINO, 2014; DIAS, 2016; BORTOLI et al, 2018). Contudo, a contaminação acaba alterando as condições dos rios ou mananciais, ocasionando na veiculação de grande número de microrganismos causadores de doenças e ser um local ideal para a aquisição e a transferência de resistência á antimicrobianos (FRANÇA; MELLONI, 2014; GOMES, 2015; CHEN et al., 2017).

2.2 DOENÇAS VEICULADAS PELA ÁGUA

A água e a saúde possuem correlação para o desenvolvimento de qualquer população, pois a água pode veicular microrganismos nocivos à saúde, estes, advindos de animais e transmitidas aos seres humanos e vice-versa (OLIVEIRA, 2011; YAMAGUCHI, 2013; FRANÇA; MELLONI, 2014). O risco de ingestão de água contaminada é maior para as pessoas que fazem atividades recreativas ou que tem o contato direto com a mesma (CRUZ; CRUZ, A.M; RESENDE, 2009). Essas doenças são consideradas graves e muito comum no Brasil e no mundo, as doenças diarreicas causam morte em mais ou menos 2 bilhões de crianças por ano e é a segunda maior causa de morte de crianças com menos de cinco anos de idade (CRUZ; CRUZ, A.M.; RESENDE, 2009; NASCIMENTO et al, 2013).

A partir do começo do século XX que se teve a preocupação com fiscalização da água para averiguar sua potabilidade, através de análises microbiológicas e físico-químicas, e não somente analisar sua cor, seu gosto e seu odor (CRUZ; CRUZ A.M.; RESENDE, 2009; BORTOLI et al., 2018). Os microrganismos patogênicos que podem estar presentes na água são bactérias como *Vibrio cholerae*, *Shigella dysinteriae*, *Clostridium perfringens* e *Salmonella typhi*, alguns vírus como Vírus da hepatite A e Vírus da pólio, protozoários como

Cryptosporidium spp. e *Entamoeba histolytica* e vermes como *Schistosoma* spp. e *Ancyllostoma* spp. que causam diversas doenças e sintomas que estão citados na Quadro 1 (MAGALHÃES, 2009).

Quadro 1 – Microrganismo de veiculação hídrica com suas respectivas doenças e sintomas.

| Agente infeccioso | Doença | Sintomas |
|--------------------------------|---------------------|--|
| <i>Vibrio cholerae</i> | Cólera | Diarreia severa, vômitos e perda de líquido |
| <i>Shigella dysenteriae</i> | Disenteria | Infecção do cólon, causando diarreia, perda de sangue e dores abdominais |
| <i>Clostridium perfringens</i> | Enterite | Inflamação do intestino, perda de apetite, diarreia e dores abdominais |
| <i>Salmonella typhi</i> | Febre tifoide | Dor de cabeça, perda de energia, febre, hemorragia dos intestinos e mancha na pele |
| Vírus da hepatite A | Hepatite infecciosa | Inflamação do fígado, vômitos, febre, náuseas e perda de apetite |
| Vírus da pólio | Poliomielite | Febre, diarreia, dor muscular, paralisia e atrofia muscular |
| <i>Cryptosporidium</i> spp. | Criptosporidiose | Diarreia e dores que podem durar mais de vinte dias |
| <i>Entamoeba histolytica</i> | Disenteria amebiana | Infecção no cólon, diarreia, perda de sangue e dores abdominais |
| <i>Schistosoma</i> spp. | Esquistossomose | Ataca o fígado, diarreia, fraqueza e dores abdominais |
| <i>Ancyllostoma</i> spp. | Ancilostomíase | Anemias e sintomas de bronquite |

Fonte: Adaptação de Magalhães (2009).

Outros microrganismos presentes em água que podem ser isolados de água e merecem destaque são as bactérias dos gêneros *Escherichia*, *Klebsiella* e *Pseudomonas*, pois são importantes para a saúde pública (PERES, 2011; BURGOS et al., 2014; FREIRE, 2015; BEZERRA, 2017).

2.3 *Escherichia coli*

E. coli é uma espécie de bactérias heterotrófica Gram-negativa pertencente à família Enterobacteriaceae (OLIVEIRA, 2016). Sua célula tem forma de bacilo ou cocobacilo com 2,0 µm de comprimento e 0,25 a 1,0 µm de diâmetro. Possui flagelos peritricos que auxiliam na sua motilidade, pode ser anaeróbio e aeróbios facultativo, além de não ter a capacidade de formar esporos (MARINHO, 2013; ROMERO, 2016). A bactéria pode suportar temperaturas entre 5° a 45°C, mas para o seu crescimento eficiente a temperatura ideal é em torno de 37°C, conseguindo sobreviver em locais onde o pH varia na faixa de 4,4 a 6,0 (PASTORE, 2014).

A *E. coli* faz parte do grupo dos coliformes fecais, pois grande parte dessa espécie realiza comensalismo no trato gastrointestinal de animais homeotérmicos, com função de fazer a síntese de vitaminas, principalmente vitamina K, e de consumir oxigênio para ajudar na manutenção do ambiente anaeróbio (ALMEIDA; LEONÍDIO; ANDRADE, 2016; PASTORE, 2014; MADIGAN et al., 2016). Porém, também é possível que a *E. coli* viva e se reproduza livremente em outros ambientes, nos quais possuem diferentes temperaturas e quantidade de nutrientes, até formar biofilme, pois são capazes de produzir uma substância polimérica extracelular, por meio de adesinas no pili e fímbrias (ALMEIDA, 2013; BARROS et al., 2014; MARTINS, A., 2012). Sendo assim, quando isoladas de água ou qualquer outro ambiente, indica-se a contaminação fecal do mesmo (CANAL, 2010).

Estudos recentes comprovam que essa espécie de bactéria tenha sofrido mutações, aderido genes de virulência, novas estirpes e sistemas de resistência pelo processo evolutivo e por isso, algumas cepas adquiriram a capacidade de promover enfermidades, como doenças diarreicas (ALMEIDA, 2013; DRUMOND, 2016). As *E. coli* patogênicas apresentam um ou mais genes de virulência e diferentes características patológicas, classificadas como patogênicas intestinais ou extraintestinais (ALMEIDA, 2013; PASTORE, 2014). Existem patotipos de *E. coli* enteropatogênica (EPEC), enterotoxigênica (ETEC), enteroinvasora (EIEC), enterohemorrágica (EHEC), entre outras, e essas são compostas por estruturas antigênicas distintas, como o capsular K, somático O, fimbrial F e flagelares H, no qual são identificados pela diferenciação sorológica (ALMEIDA, 2013; ALMEIDA; LEONÍDIO; ANDRADE, 2016).

Portanto, a *E. coli* é considerada muito importante a nível hospitalar, tanto pelas doenças que pode causar, quanto pela resistência à antimicrobianos que apresenta, pois a exposição prévia do medicamento com a microbiota em um ambiente aquático, tais como rios,

esgoto e subterrâneos, pode gerar um reservatório de genes de resistência (CANAL, 2010; COSTA et al., 2016; MARTINS, T., 2012; OLIVEIRA, 2016). É comum a resistência dessa bactéria a mais de uma classe de antimicrobianos, o que é muito prejudicial à saúde pública, pois ao contrair a doença e sem o sucesso do fármaco, o indivíduo pode chegar ao óbito (MARTINS, T., 2012; CANAL, 2010).

2.4 *Klebsiella pneumoniae*

A bactéria *K. pneumoniae* é um bastonete gram-negativo pertencente à família Enterobacteriaceae (MOREIRA; FREIRE, 2011). Dentre todas as bactérias do gênero *Klebsiella*, a *K. pneumoniae* é a mais comum, seu tamanho que varia de 0,3 a 1 μm de diâmetro e 0,6 a 6 μm de comprimento, é imóvel, não esporulada e apesar de ser considerada aeróbio facultativo, cresce melhor em condições aeróbias (SANTOS, 2007).

K. pneumoniae pode habitar tanto nichos ambientes como água, solo, plantas e esgoto e através do contato com diversas fontes ambientais. O ser humano pode contrair essa bactéria e a mesma pode colonizar o ser humano de forma assintomática, assim pode ser isolada da orofaringe, da pele, no trato gastrointestinal de humanos e outros mamíferos e nas fezes de pessoas sadias (MOREIRA; FREIRA, 2011; TZOUVELEKIS et al., 2012; HOLT et al., 2015). Porém, essa bactéria também pode causar infecções em pessoas com o sistema imunológico baixo. A mais comum e antiga é a pneumonia, mas hoje já se relaciona a infecções no trato urinário e de feridas, abscesso hepático piogênico, bacteremia e meningite (MOREIRA; CARVALHO, 2006; TZOUVELEKIS et al., 2012; HOLT et al., 2015). Estas doenças são contraídas no ambiente comunitário, mas geralmente em ambiente hospitalar, principalmente em unidades de terapia intensiva (UTI) ou em espaços cirúrgicos (SANTOS, 2007; GONZÁLEZ et al., 2013).

O aumento dos casos de doenças, comumente causados em ambiente hospitalar se dá pela resistência aos antimicrobianos que essa bactéria possui, ela é capaz de produzir enzimas penicilinasas cromossômicas e é um bom colecionador de plasmídeos de resistências (TZOUVELEKIS et al., 2012). Por esse motivo, é classificado entre os patógenos causadores de surto, onde necessitam que os pacientes fiquem hospitalizados por mais tempo, administrando fármacos mais potentes, mais tóxicos e mais caros, acarretando na falência clínica e até mesmo na mortalidade dos mesmos (SANTOS, 2007).

2.5 *Pseudomonas aeruginosa*

A bactéria *P. aeruginosa* é um bacilo Gram negativo pertencente à família Pseudomonadacea (PERES, 2011). Seu tamanho varia entre 0,5-1,0 μm de diâmetro por 1,5-4,0 μm de comprimento, é aeróbica, não esporulante, podendo ser encontrada aos pares ou isoladas, além de se mover por flagelos polares (MATA; ABEGG, 2007; JÁCOME, 2011; SILVA, K. 2016). É considerada um microrganismo ubíquo e de vida livre, por conseguir sobreviver em vários tipos de ambientes como solo, vegetais, em ambientes aquáticos, em ambientes hospitalares e associado ao ser humano (JÁCOME, 2011; ANDUEZA, 2015; LIMA et al, 2016).

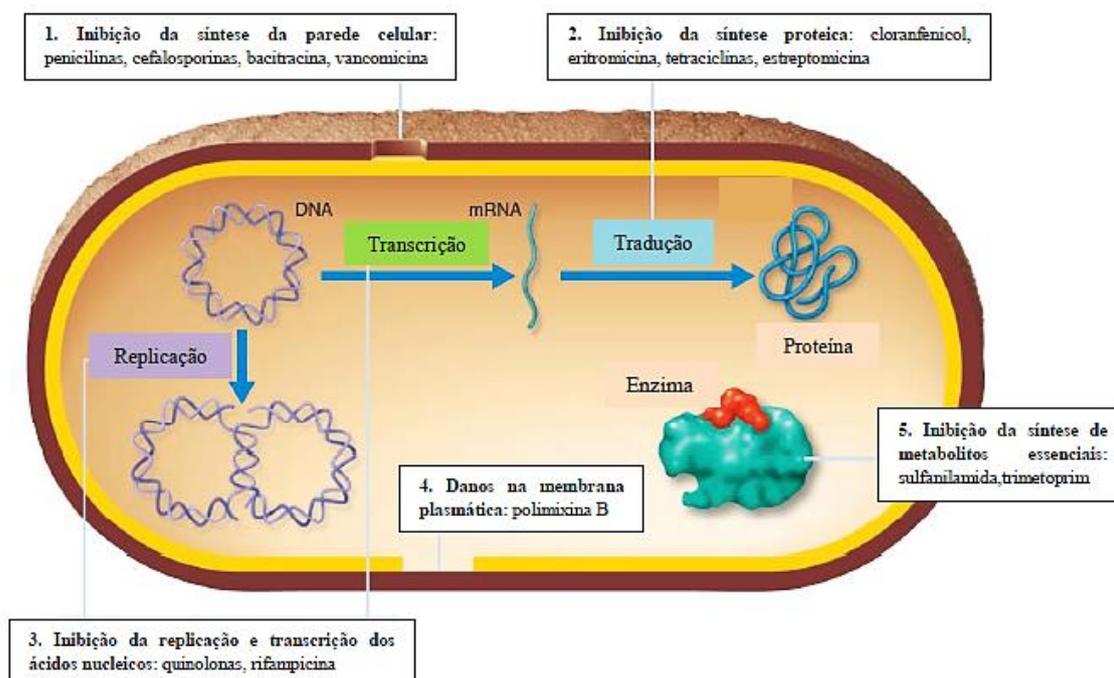
O ser humano pode contrair *P. aeruginosa* de locais onde há um alto teor de umidade, como reservatórios relacionados com a água de piscinas, banheiras, soluções para lente de contato, como também podem estar ligados aos ambientes hospitalares, estes mais comuns, como traqueóstomo, cateter de demora, feridas com pus e queimaduras (JÁCOME, 2011; ANDUEZA et al., 2015). Em indivíduos sadios dificilmente causa infecções, porém é considerado um patógeno oportunista, onde atinge principalmente pessoas imunocomprometidas que estão hospitalizadas, causando infecções urinárias, infecções na pele, mucosas, infecções respiratórias, sepse, entre outros (MATA; ABEGG, 2007; LIMA, 2016).

Apesar de ser uma bactéria descoberta e estudada a muito tempo, ela possui uma importância clínica muito grande devido a infecções nosocomiais e a resistência a vários antimicrobianos que tem tido atualmente (ANDUESA et al., 2015). A infecção está intimamente relacionada com a expressão da resistência aos antimicrobianos na prática clínica, seja ela natural ou adquirida (NEVES et al., 2011). As características de resistência natural são a baixa permeabilidade da membrana, a capacidade de formar biofilme, de possuir plasmídeos e genes de resistência. Já as características de resistência adquirida se dão a hiperexpressão de bombas de efluxo, a produção de β -lactamases, e também a perda e/ou expressão reduzida de proteínas da membrana externa (PESSOA, 2013). Isso acaba tornando o tratamento da infecção muito difícil e até mesmo inevitável, aumentando assim os índices de morbidade e mortalidade (NEVES et al., 2011).

2.6 RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS

Os antimicrobianos são substâncias produzidas por microrganismos, por síntese química ou por modificações químicas de componentes naturais, chamados então naturais, sintéticos ou semissintéticos respectivamente, com função de impedir o crescimento microbiano, chamados bacteriostáticos, ou destruir o micróbio diretamente, chamados bactericidas (OLIVEIRA, 2011; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012; PORTUGAL, 2015). Os principais mecanismos de ação dos agentes antimicrobianos são: inibição da síntese da parede bacteriana, inibição da síntese proteica por ação nos ribossomos, alteração da síntese dos ácidos nucleicos, inibição da síntese de metabolitos essenciais e alteração da permeabilidade da membrana celular (Figura 1) (MARTINS, T., 2012; PASTORE, 2014).

Figura 1 - Mecanismo de ação dos antimicrobianos.



Fonte: Marinho (2013).

2.6.1 Inibição da síntese da parede bacteriana

A parede celular da bactéria possui a função de dar forma, proteger e manter a pressão osmótica no seu interior (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). Quem possui esse mecanismo de inibição da síntese da parede bacteriana são os antimicrobianos B-lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas, carbapenemes e monobactams), que atuam na síntese do

peptidoglicano, quando a bactéria está em fase ativa de crescimento, inibindo a enzima transpeptidase para não transformar o polímero linear em cruzado e por consequência não formar a parede celular (PORTUGAL, 2015).

2.6.2 Inibidores da síntese proteica nos ribossomos

Os ribossomos são as unidades capacitadas para sintetizar proteína, ou seja, se não há ribossomo, não há proteína e a célula morre, então os antimicrobianos atuam nas subunidades 30s e 50s dos ribossomos, na qual são específicas das bactérias, sem causar dano as células humanas. Os fármacos que tem essa ação são os aminoglicosídeos, anfenicóis, tetraciclina, lincosamida, oxazolidinonas e macrólidos (PORTUGAL, 2015).

2.6.3 Inibidores da síntese de ácidos nucleicos

Essa ação pode ser feita em várias fases da síntese dos ácidos nucleicos (RNA ou DNA), as fluoroquinolonas ligam-se as topoisomeras II e IV e inibem a replicação e transcrição do DNA bacteriano, as rifamicinas impedem a transcrição do RNA por se ligarem à subunidade beta da polimerase bacteriana e o metronidazol forma radicais livres tóxicos por aceitar elétrons, que quando em contato com o DNA bacteriano desestabiliza-o causando sua morte (PORTUGAL, 2015).

2.6.4 Inibidores da síntese de metabolitos essenciais

As bactérias precisam sintetizar suas próprias vitaminas (B9) pois não conseguem obter do ambiente que se encontram, e um cofator essencial para a síntese de metabolitos é o ácido fólico, um exemplo é síntese das bases purinas e pirimidinas que participam do processo biológico de transcrição do DNA. Os antimicrobianos bacteriostáticos do grupo do sulfonamidas, como o sulfametoxazol e o trimetoprim agem na enzima dihidropteroato para quebrar a cadeia metabólica e não formar o ácido dihidropteroato, que com sua ausência, não faz a síntese do ácido fólico e a bactérias morre por não ter mais seus metabolitos essenciais (MARINHO, 2013).

2.6.5 Alteração da permeabilidade da membrana celular

Os antimicrobianos, principalmente os polipeptídicos, são capazes de alterar a permeabilidade da célula bacteriana, com a finalidade da mesma perder seus metabolitos e de não-garantir sua sobrevivência. Nas bactérias Gram-negativas, os antimicrobianos da classe das polimaxinas, ligam-se aos fosfolipídeos na membrana externa e bagunçam sua estrutura, alterando sua permeabilidade, fazendo com que suas partes intracelulares saiam, quebrando a célula pela mudança osmótica e por fim, a célula morre (MARINHO, 2013).

Na década de 1940, os antimicrobianos foram muito utilizados e muito bem-sucedidos contra doenças infecciosas, o que fez sucesso no tratamento contra bactérias patogênicas e assim, foi considerado o fim desse problema para a população (CANAL, 2010). Porém, a partir de então, o crescimento de bactérias resistentes a esses fármacos foi muito rápido e hoje é considerado um perigo à população global (ADZITEY; NAFISAH; HARUNA, 2015). Atualmente, existem várias classes diferentes de antimicrobianos, e já existem pelo menos um (ou mais) mecanismo de defesa para cada classe, o que torna os tratamentos difíceis, podendo acarretar até a morte dos pacientes (HAHN, 2013).

O progresso rápido de resistência pode estar envolvido com a maneira que fármacos estão sendo utilizados na área doméstica, hospitalar e na pecuária, de forma habitual sem finalidade correta de cura (COSTA; SILVA JUNIOR, 2017). Além disso, 25 a 75% dos antimicrobianos não são totalmente metabolizados pelo organismo e descarregado pelo sistema de esgoto, onde entram em contato com o meio aquático e com as bactérias existentes no local, beneficiando a aquisição de mecanismos de resistência e a seleção de patógenos resistentes (PORTUGAL, 2015; OLIVEIRA, 2016). Muitos estudos já relataram a existência de bactérias resistentes em esgoto, mananciais, rios e estações de tratamento de efluentes (OLIVEIRA, 2011).

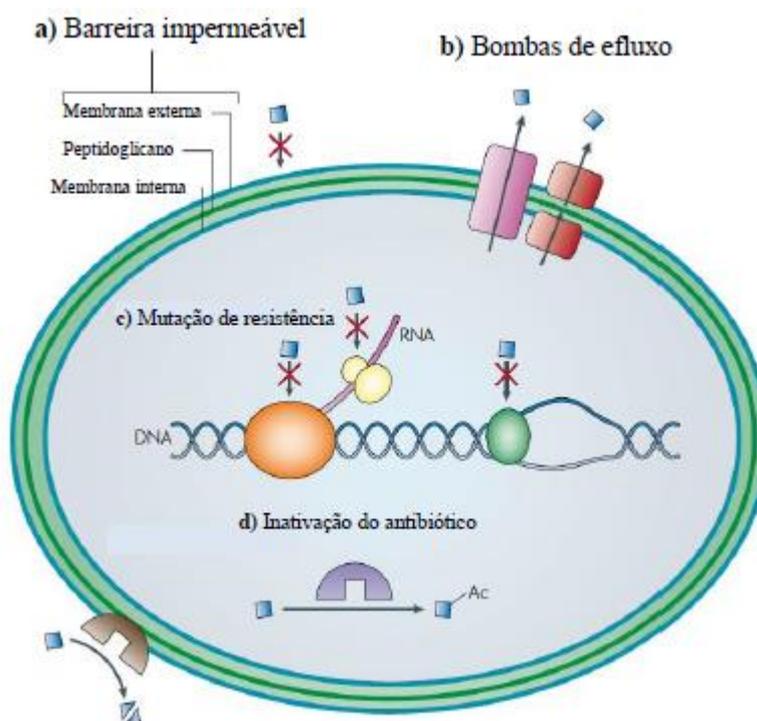
A resistência pode acontecer de forma intrínseca ou adquirida, a primeira acontece de forma natural dentro de uma espécie ou gênero bacteriano, associado com a penetração reduzida do antimicrobiano na célula (FRANÇA; MELLONI, 2014). E a segunda ocorre pela transferência de genes de resistência entre o próprio DNA cromossômico ou extracromossômico por processos de conjugação, transformação, transdução e transposição (OLIVEIRA, 2011). O processo denominado conjugação acontece quando uma bactéria doadora passa para uma bactéria receptora através de um pili conjugativo a transferência DNA plasmidial resistente, transposons e integrons. A transformação se dá quando bactérias obtêm fragmentos de DNA livre do meio e inserem em seu genoma. O processo de transdução

ocorre quando os genes são transferidos por bacteriófagos nos microrganismos. E o processo de transposição sucede na transferência de transposons de um plasmídeo para o cromossomo bacteriano ou vice-versa, e de um cromossomo bacteriano para um bacteriófago (SILVA et al, 2016).

Os elementos móveis como os plasmídeos, transposons e integrons são importantes no processo de resistência porque possuem funções de replicação do genoma, bem como a facilidade de dispersão de genes de resistência (FRANÇA; MELLONI, 2014). Outro fator que faz do plasmídeo ser bastante significativo, é sua capacidade e possibilidade da troca de material genético entre várias bactérias, levando a resistência em diferentes gêneros de bactérias (OLIVEIRA, 2011; SILA, 2016). Assim quando os genes transferidos são resistentes, o microrganismo pode codificar diferentes mecanismos bioquímicos afim de impedir o mecanismo de ação do antimicrobiano (OLIVEIRA, 2011; CORREIA, 2014; MIRANDA, 2016).

Os principais mecanismos de resistência são compostos por destruição ou inativação da droga (exemplo: ação da β -lactamase), modificação ou proteção do alvo macromolecular, bomba de efluxo, e alteração da permeabilidade da membrana celular (Figura 2) (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012; HAHN, 2013; MARINHO, 2013).

Figura 2- Mecanismos de resistência.



Fonte: Marinho (2013).

2.6.6 Destruição ou inativação da droga

Esse mecanismo é o principal para bactérias Gram-negativas, as enzimas produzidas pelas bactérias degradam ou modificam o fármaco afim de que sua função seja ineficiente, ou seja, enzimas principalmente β -lactamases quebram a ligação dos anéis dos antimicrobianos β -lactâmicos impedindo sua ativação. No antimicrobiano cloranfenicol, a célula bacteriana codifica pelo gene *catA* as enzimas cloranfenicol acetiltransferases, estas impedem a ligação da molécula do antimicrobiano com os ribossomos da bactéria, inativando a função do medicamento (MARINHO, 2013).

2.6.7 Modificação ou proteção do alvo macromolecular

A bactéria muda geneticamente o receptor da droga ou o alvo no seu interior, impedindo que a proteína rejeita a ligação e a função do antimicrobiano, algumas bactérias criaram essa resistência por antimicrobianos como macrólidos, lincosamidas, estreptograminas, rifampicina e sulfamidas. Um exemplo da classe das sulfamidas, é que as enzimas digidropteroato sintase (DHPS) é modificada por mutação dos genes e assim, o alvo molecular do antimicrobiano é mudado automaticamente (MARINHO, 2013).

2.6.8 Bomba de efluxo

As proteínas transmembranas desenvolvem um meio de transporte ativo onde o fármaco é ejetado para fora da célula antes que se torne efetivo, ou seja, que as concentrações terapêuticas não sejam eficientes no citoplasma das células bacterianas para matá-las (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). Esse mecanismo é muito eficiente e é utilizado em antimicrobianos como os macrólidos, β -lactâmicos, quinolonas e boa parte do grupo das tetraciclina (MARINHO, 2013).

2.6.9 Alteração da permeabilidade da membrana celular

Para alterar a permeabilidade da membrana celular, as bactérias perdem canais de porina (OmpA, OmpC, OmpF), esse método de resistência é muito utilizado pelas bactérias Gram-negativas e em especial, pela *E. coli* que a partir de então, não permite mais a entrada de pequenas moléculas, e assim pode levar a mutações espontâneas pela pressão seletiva ao longo do uso do fármaco. Quando as porinas do tipo OmpF diminuem sua expressão,

geralmente relacionam-se com o aumento da resistência de antimicrobianos de classes quinolonas, β -lactâmicos, tetraciclina e ao cloranfenicol (MARINHO, 2013).

As bactérias da família Enterobacteriaceae são as mais exponenciais e estudadas devido seu aumento dos níveis de resistências aos antimicrobianos atualmente, devido as boas condições de dispersar de genes de resistência nos processos de mutação, transdução e transformação, mas principalmente no processo de transposição (FERREIRA, 2015; SILVA et al., 2016). Dessa família, a *E. coli* é uma das bactérias mais relevantes para a importância clínica e para o problema de resistência, pois é conhecida por aceitar e transmitir esses genes e formar estirpes multirresistentes (MARINHO, 2013; FERREIRA, 2015).

E assim concluo o segundo capítulo, trazendo a teorização do objeto de estudo e deixando claro os principais temas do meu estudo. Como se trata de um tema bem complexo e é uma das primeiras pesquisas feitas nessa região, sobre a água do rio e a resistência aos antimicrobianos, a metodologia foi utilizada de maneira mais simples, sendo assim, é preciso de mais experimentos para que se tenha um resultado mais preciso e seguro.

3 METODOLOGIA

3.1 NATUREZA E TIPO DE PESQUISA

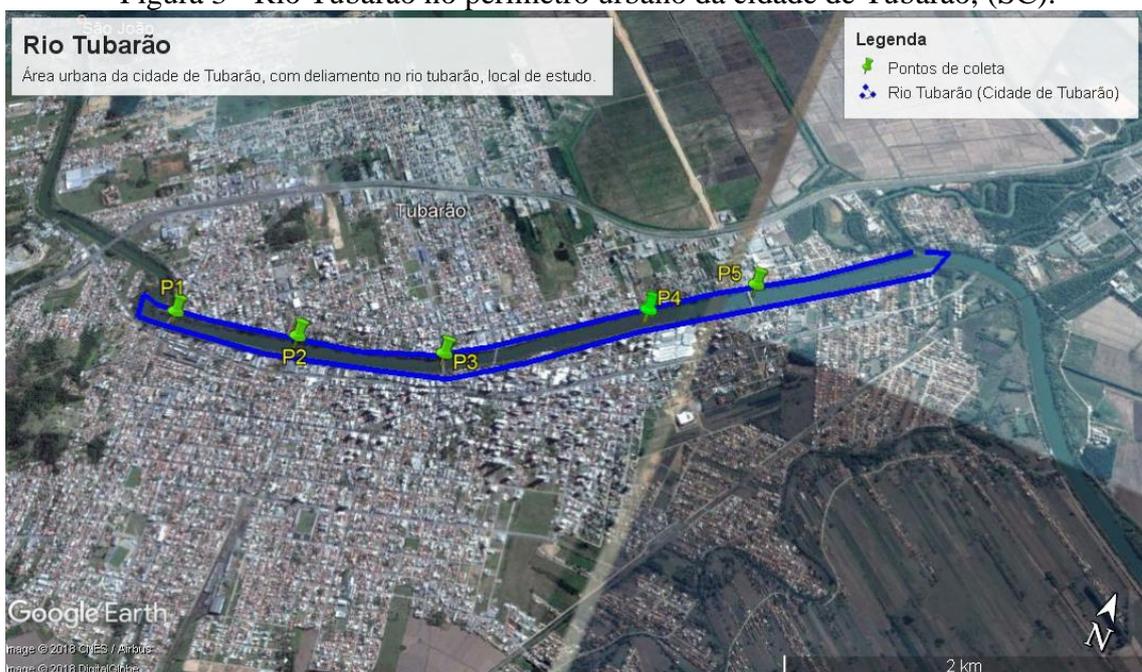
Esta pesquisa, em relação ao aprofundamento, pode ser caracterizada como exploratória e descritiva. Quanto à abordagem, classifica-se como quantitativa.

3.2 LOCALIZAÇÃO DOS PONTOS DE COLETA

O Rio Tubarão está localizado na região Sul do Estado de Santa Catarina, e é assim denominado após a confluência dos Rios Bonito e Rocinha onde tem origem na encosta da Serra Geral no município de Lauro Muller, percorre uma distância de 130 km atingindo vários municípios, para então desembocar no Lago de Santo Antônio dos Anjos no município de Laguna (LIMA et al, 2001; SKORONSKI et al., 2014). Na cidade de Tubarão, este rio é considerado o principal e corta a cidade com largura de aproximadamente 115 metros, possuindo uma profundidade que varia entre 2 a 10 metros e a vazão de 5,2 metros cúbicos por segundo (TUBARÃO, 2015).

Foram realizadas coletas em 5 pontos ao longo do perímetro urbano do rio, conforme demonstrado na figura 3 e 4.

Figura 3 - Rio Tubarão no perímetro urbano da cidade de Tubarão, (SC).



Fonte: Google Earth (2018).

A água foi coletada na beira do rio, sendo assim os pontos de coleta foram pré-estabelecidos por serem acessos mais fáceis. Portanto, os pontos foram: o ponto 1 (P1) na Ponte Manoel Alves dos Santos, o ponto 2 (P2) um pouco antes da ponte pênsil, o ponto 3 (P3) na ponte Nereu Ramos, o ponto 4 (P4) entre a rua Vidal Ramos e a rua Natal, e o último ponto (P5) na ponte Orlando Francalaci (Figura 4).

Figura 4 - Pontos de coleta ao longo do perímetro urbano do Rio Tubarão na cidade de Tubarão



Fonte: Arquivo pessoal da autora (2018).

3.3 LOCAL DE REALIZAÇÃO DA PESQUISA

Os experimentos da pesquisa foram desenvolvidos no Laboratório de Microbiologia e Microscopia, ambos situados no bloco da saúde (bloco C) da Universidade do Sul de Santa Catarina, campus de Tubarão - SC.

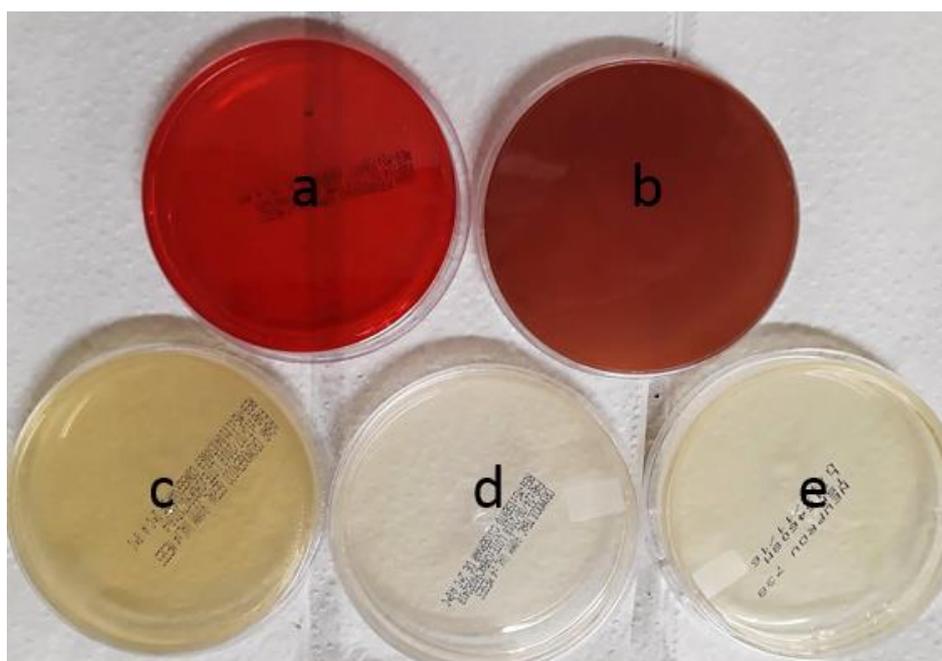
3.4 COLETA E PROCESSAMENTO DE AMOSTRA

A coletas foram feitas no dia 22 de outubro, das 8h00 às 9h15min. Em cada ponto foi coletado uma amostra de 2 litros de água superficial em frascos plásticos estéreis, totalizando em 5 amostras, essas foram armazenadas em caixa de isopor, onde foram imediatamente transportados para o laboratório para o processamento da amostra. A amostra foi homogeneizada e alíquotas de 100 ml de cada amostra foram filtradas em membrana de acetato de celulose com porosidade de $0,45 \mu\text{m} \times 47 \text{mm}$ (APHA, 2012). Cada membrana foi colocada na superfície do meio de cultura. As placas foram identificadas e incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por até 48 horas (MARINHO, 2013).

3.5 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS

A identificação das bactérias de *E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* foram realizadas pela visualização do crescimento característico das espécies nos meios que foram utilizados e também pela coloração de Gram, onde foi possível visualizar a morfologia bacteriana. Os meios de cultura utilizados na pesquisa foram: o Agar Cromogênico Geral que é um meio não seletivo e diferencial, o Agar Cromocultbac é um meio seletivo e diferencial, o Ágar Pseudomonas que é seletivo (Anexos A, B e C.), Ágar Sangue que é um meio enriquecido, não seletivo e diferencial e Ágar TSA não-seletivo (figura 5). Os procedimentos e interpretação dos resultados seguiram as orientações do fabricante.

Figura 5 - Meios de culturas utilizados para o crescimento bacteriano. a) Agar pseudomonas, b) Agar sangue, c) Agar cromogênico Geral, d) Agar cromocultbac e e) Agar TSA.



Fonte: Arquivo pessoal da autora (2018).

3.5.1 Ágar Cromogênico

O meio de cultura Agar Cromogênico Geral, viabiliza o crescimento de *E. coli* onde o aparecimento de colônias da cor típica rosa a avermelhado caracteriza a espécie e *K. pneumoniae* será caracterizado pelas colônias na cor azul escuro. Já o meio Agar Cromocultbac colônias de *E. coli* podem variar de coloração azul a violeta, e colônias de *K. pneumoniae* apresentam coloração de salmão a vermelho.

3.5.2 Ágar Pseudomonas

O meio de cultura Agar Pseudomonas indica o crescimento seletivo de *P. aeruginosa* onde o aparecimento de colônias com a cor rosa caracteriza a espécie.

3.5.3 Ágar TSA

O meio de cultura Agar Triptona de Soja (TSA) é um meio utilizado para o cultivo de vários microrganismos, dentre elas *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *P. aeruginosa* e *Streptococcus pyogenes*.

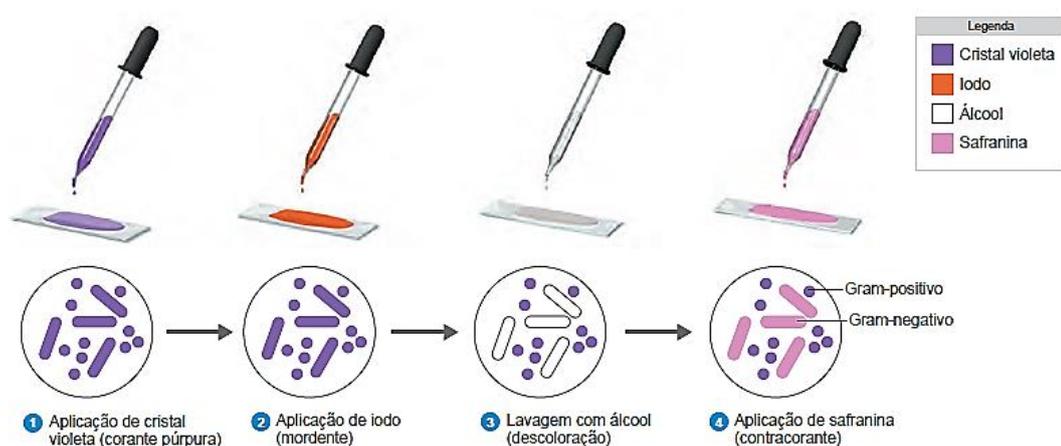
3.5.4 Ágar Sangue

O meio de cultura Agar Sangue é utilizado para a detecção de microrganismos, clínicos e não clínicos, por meio da atividade hemolítica dos mesmos. Sendo assim, é possível o crescimento de bactérias como *E. faecalis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, entre outros.

3.5.5 Coloração de Gram

A coloração de Gram possibilita verificar a pureza da cultura, a morfologia e arranjo das células bacterianas. A coloração de Gram é um procedimento dividido em etapas conforme ilustrado na figura 6.

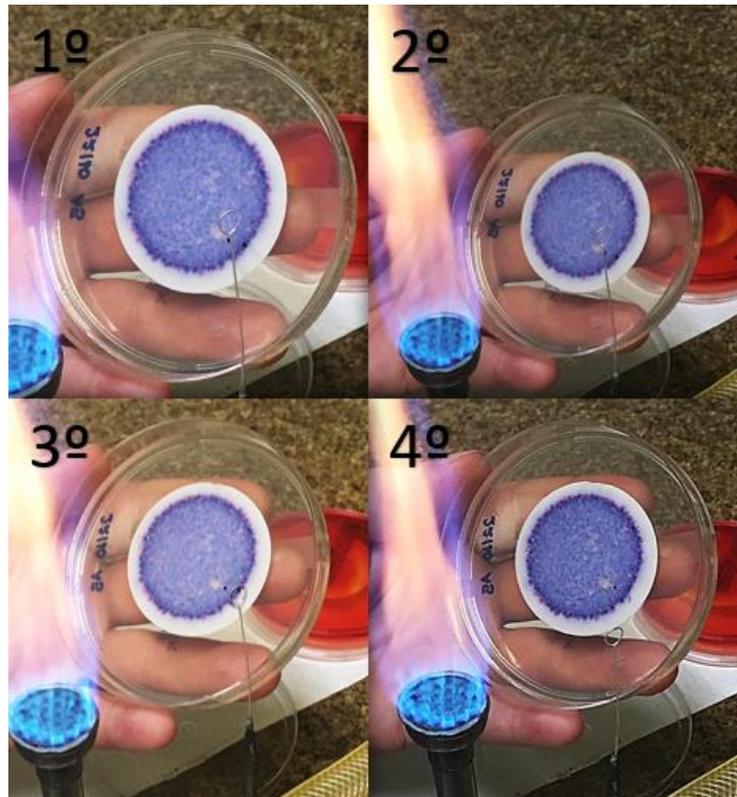
Figura 6 - Ilustração do processo de coloração de Gram.



Fonte: Tortora, Funke e Case (2012).

Após a visualização do crescimento bacteriano nas placas, uma colônia foi retirada da mesma com o auxílio de uma alça de platina (Figura 7) e fixada com um esfregão em uma lâmina para posterior coloração de Gram.

Figura 7 - Retirada de colônia após o crescimento bacteriano.



Fonte: Arquivo pessoal da autora (2018).

3.6 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS

Os testes de resistência aos antimicrobianos foram realizados seguindo as normas preconizadas utilizando o método de difusão em disco de Kirby-Bauer (CLSI, 2015). O TSA foi feito com as três bactérias coletadas (*E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*) nas amostras dos pontos 1, 2 e 3. Para a preparação da suspensão bacteriana de cada isolado, foram retiradas colônias isoladas de placas contendo TSA que foram suspensas em solução salina 0,9% até que atingissem a turbidez correspondente 0,5 da Escala de MacFarland. Após o preparo do inóculo, os isolados foram semeados com suabes estéreis em toda a placa de petri de 150 mm contendo Ágar Muller Hinton e posteriormente foram acrescentados os discos de antimicrobianos (Figura 8). Finalizando o procedimento, as placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C sendo a leitura realizada 18 horas depois.

Figura 8 - Polissensidisc DME com os 15 antimicrobianos antes e depois na placa de petri com Agar Muller Hinton.



Fonte: Arquivo pessoal da autora (2018).

Depois do período de incubação, os halos foram analisados e medidos, sendo que o diâmetro do crescimento ou inibição ao redor de cada disco foram interpretados conforme as zonas de inibição (mm) de acordo com a tabela 1, e assim as bactérias foram identificadas como resistente (R), intermediário (I) e sensível (S) (PORTUGAL, 2015). Os antimicrobianos que foram utilizados foram: TET- tetraciclina (30 μ g), AMP- ampicilina (10 μ g), AMC- amoxicilina + ácido clavulânico (20 μ g), ATM - aztreonam (30 μ g), CAZ - ceftazidima (30 μ g), GEN- gentamicina (10 μ g), CPM- cefepime (30 μ g), SUT - sulfazotrim (25 μ g), MPM - Meropenem (10 μ g), CFO - cefoxitina (30 μ g), AMI- amicacina (30 μ g) e CLO- cloranfenicol (30 μ g), CIP – ciprofloxacina (5 μ g), CFZ – cefazolina (30 μ g), CRO – ceftriaxona (30 μ g) (Figura).

Abaixo apresenta-se a tabela 1, que trata das zonas de inibição conforme o agente antimicrobiano.

Tabela 1 – Zonas de inibição conforme o agente antimicrobiano.

| Classe e Antimicrobiano | Conteúdo do disco | Diâmetros da zona de inibição | | |
|---------------------------------|-------------------|-------------------------------|-------|-----|
| | | R | I | S |
| Anfenicóis | | | | |
| <i>Cloranfenicol</i> | 30µg | ≤12 | 13-17 | ≥18 |
| Aminoglicosídeos | | | | |
| <i>Amicacina</i> | 30µg | ≤14 | 15-16 | ≥17 |
| <i>Gentamicina</i> | 10µg | ≤12 | 13-14 | ≥15 |
| Carbapenênicos | | | | |
| <i>Meropenem (ent)</i> | 10µg | ≤19 | 20-22 | ≥23 |
| <i>Meropenem (pse)</i> | 10µg | ≤15 | 19-18 | ≥19 |
| Cefalosporina 1ª geração | | | | |
| <i>Cefazolina</i> | 30µg | ≤19 | 20-22 | ≥23 |
| Cefalosporina 2ª geração | | | | |
| <i>Cefoxitina</i> | 30µg | ≤14 | 15-17 | ≥18 |
| Cefalosporina 3ª geração | | | | |
| <i>Ceftazidima</i> | 30µg | ≤17 | 18-20 | ≥21 |
| <i>Ceftriaxona</i> | 30µg | ≤19 | 20-22 | ≥23 |
| Cefalosporina 4ª geração | | | | |
| <i>Cefepime</i> | 30µg | ≤18 | - | ≥25 |
| Monobactâmicos | | | | |
| <i>Aztreonam</i> | 30µg | ≤17 | 18-20 | ≥21 |
| Penicilina | | | | |
| <i>Amoxicilina + A.C.</i> | 20µg | ≤13 | 14-17 | ≥18 |
| <i>Ampicilina</i> | 10µg | ≤13 | 14-16 | ≥17 |
| Quinolonas | | | | |
| <i>Ciprofloxacina</i> | 5µg | ≤15 | 16-20 | ≥21 |
| Sulfonamidas | | | | |
| <i>Sulfazotrim</i> | 25µg | ≤10 | 11-15 | ≥16 |
| Tetraciclina | | | | |
| <i>Tetraciclina</i> | 30µg | ≤11 | 12-14 | ≥15 |

Fonte: Adaptação de Portugal (2015), CLSI (2015) e DME (2015).

3.7 PROCEDIMENTO DE ANÁLISE DOS DADOS

Os dados foram tabulados no programa Excel e analisados conforme resultado apresentado. O índice de Resistência aos Antimicrobianos Múltiplos (RAM) vai ser calculado e interpretado de acordo com Adzitey (2015) utilizando a fórmula: a/b , onde a seria o número de antimicrobianos aos quais um determinado isolado foi resistente e b , seria o número total de antimicrobianos testados.

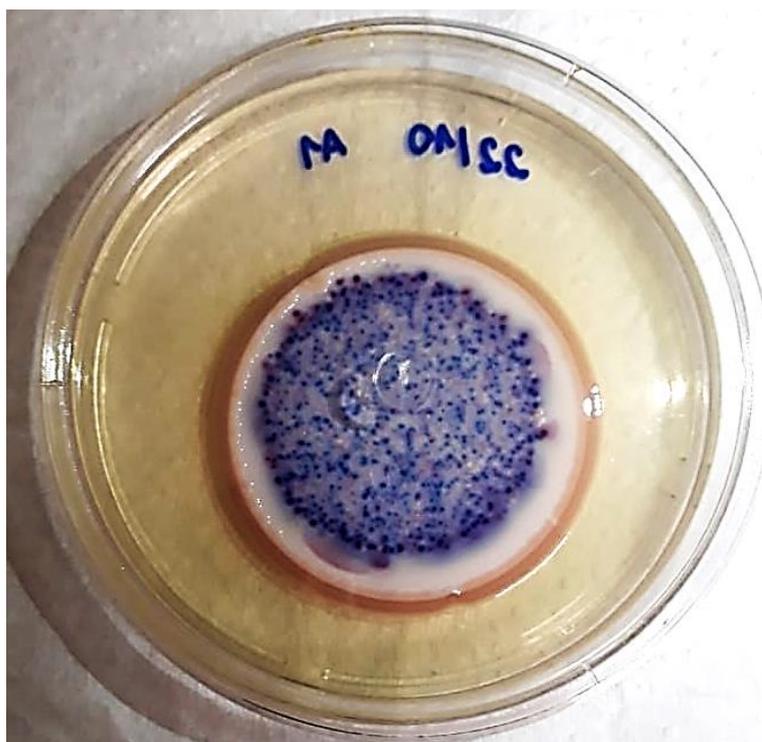
4 APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS DADOS

4.1 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS

Neste estudo, após o procedimento de incubação num período de ± 40 horas, as placas com 5 meios de culturas diferentes foram observadas e analisadas afim de ver o crescimento da população microbiana. Nestas, foi possível a visualização de 100% de crescimento de colônias de bactérias em todas as amostras independente do meio de cultura.

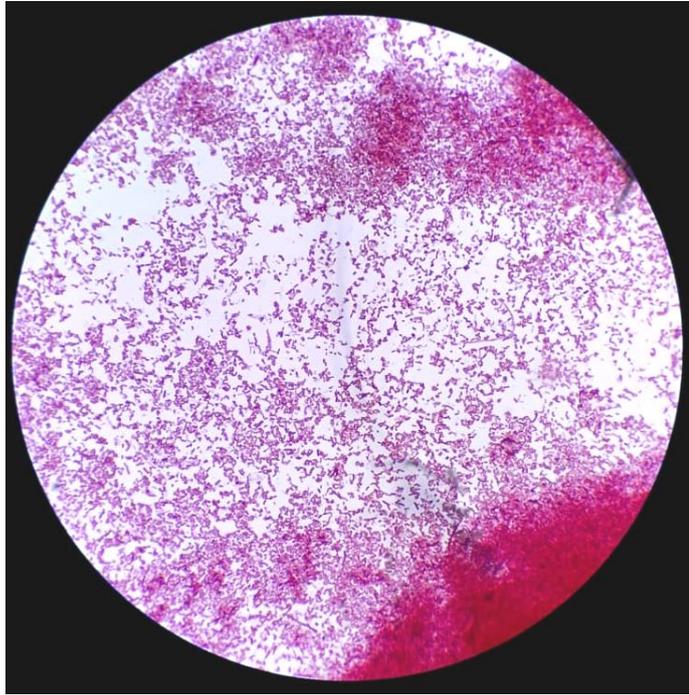
Depois do isolamento e da coloração de Gram para constatar a pureza das colônias (figura 9 e 10), foram identificadas colônias de bactérias Gram-negativas como *P. aeruginosa* no Agar Pseudomonas (figura 11), *K. pneumoniae* e *E.coli* no Agar Cromocultbac, entre outras várias bactérias no Ágar TSA e no Sangue, além de crescer fungo em na amostra 4 do meio de cultura Agar sangue. A presença de bactérias Gram-positivas, foi verificado só colônias de *Enterococcus faecalis* no Ágar Cromogênico Geral. As amostras do Ágar Cromogênico Geral, do Ágar TSA e do Ágar Sangue não foram utilizadas nos demais procedimentos da pesquisa, como o antibiograma. Os dois últimos ágares foram utilizados somente como uma garantia, caso não encontrasse as bactérias desejadas da pesquisa.

Figura 9 - Demonstração das cores das colônias, *E. coli* (roxa) e *K. pneumoniae* (rosa).



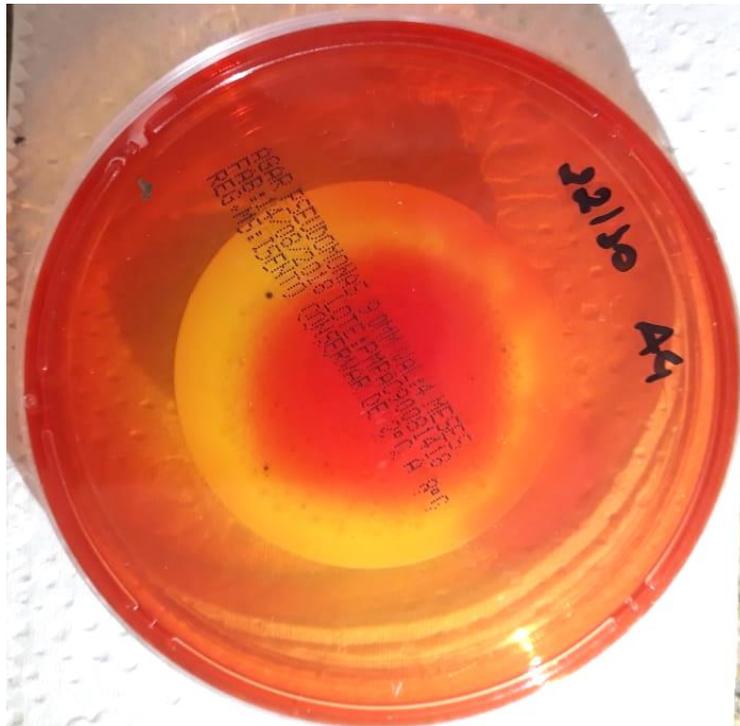
Fonte: Arquivo pessoal da autora (2018).

Figura 10 - Visualização do microscópio com aumento de 1000x. Bactéria *E. coli*, após a coloração de Gram.



Fonte: Arquivo pessoal da autora (2018).

Figura 11 - Agar pseudomonas com crescimento na coloração rosa (no centro) característica de *Pseudomonas aeruginosa*.



Fonte: Arquivo pessoal da autora (2018).

A presença de colônias de *E. coli* no perímetro urbano do rio Tubarão é similar a pesquisa feita por Oliveira & Pinto (2017) onde também foi identificada a presença de *E. coli* em 100% das amostras no perímetro urbano de um rio, sendo que as características do seu entorno possuem relação com a do presente trabalho, onde há despejo de esgoto, a presença de um grande fluxo de pessoas em seu entorno e moradores de rua residindo embaixo de ponte. Em uma outra pesquisa feita por Schneider, Nadvorny & Schmidt (2009) foram encontrados 205 isolados de *E. coli* em 77 amostras de água superficial do rio Lajeado e 49 amostras de água subterrânea (poços artesianos).

Além disso, *E. coli* também já foi amostrada por Schuroff e tal. (2014) em um lago no perímetro urbano da cidade de Londrina - PR, onde em todos os pontos de coletas foram isoladas bactérias dessa espécie. E Adzitey, Nafisah & Haruna (2015) também coletaram 66 isolados de *E. coli* em água de chuva, água de poço, de barragem, de torneira e de cochos de animais numa cidade de Gana, um país da África Ocidental.

Madigan et al (2016) descrevem que essa bactéria pode ser encontrada em vários locais, sendo eles perto ou não, devido sua característica universal, onde habita o trato gastrointestinal de animais de sangue quente e também por não possuir exigências tão grandes para seu crescimento. Desta maneira, ambientes que possuem variedades entre fontes de carbono e energia, como açúcares, aminoácidos, ácidos orgânicos e entre outros, são suficientes para a sobrevivência desse microrganismo.

K. pneumoniae por ser da família Enterobacteriaceae juntamente com *E. coli*, pode ser isolado de vários locais. Abreu et al. (2010) identificaram as espécies de *K. pneumoniae* e *E. coli* em amostragem de efluentes de hospitais. Moreira & Carvalho (2006) fizeram um estudo em 5 diferentes amostras de água e constataram a presença de *K. pneumoniae* somente na água do banho de recém-nascidos, ou seja, em 20% das amostras. Freire (2015) em um estudo em várias fontes de água, isolou *K. pneumoniae* em 1 amostra de poço, isso corresponde a 5% das amostras totais de poço e 2,4% de todas as amostras. Porém, demonstrou também isolados de outras bactérias do gênero *Klebsiella*.

Freire (2015) diz que *K. pneumoniae* pode ser isolada de vários isolados clínicos humanos e isolados ambientais como água, solo e esgoto, porque como é um coliforme total, está presente no intestino de animais de sangue quente, e assim podem ser eliminadas nas fezes. Porém, este microrganismo possui um valor sanitário limitado quando destinado à população. Moreira & Freire (2011), Tzouvelekis et al. (2012) e Holt et al. (2015) ainda ressaltam que partir de 1970 essa espécie tem sido isolada drasticamente em ambientes

hospitalares, na qual vivem colonizando o trato gastrointestinal, a pele e a nasofaringe de humanos, e também de outros mamíferos.

P. aeruginosa também já foi isolada em rio por Fuentefria et al. (2008) em 83,3% das amostras e por Silva Junior et al. (2014) em 80% dos isolados em rios, tanto na área montante como jusante em relação ao descarte de esgoto hospitalar, além de isolarem do próprio efluente hospitalar. Medeiros, Vasconcelos & Calazans (2007) isolaram *P. aeruginosa* em diversas fontes de água como água de poço, de consumo, residuária e mineral, assim como Vivian (2015), que também isolou em água de poço.

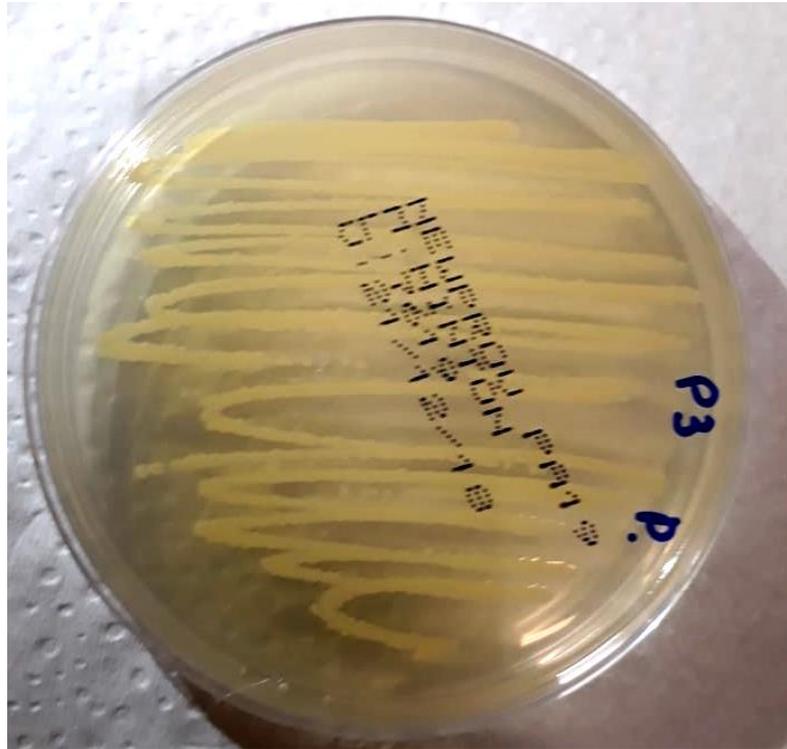
Romling et al (1994) já relatou que embora *P. aeruginosa* poder ser encontrada em água, solo e plantas, é mais comum ser isolada em quantidades maiores em esgoto contaminado por humanos e animais, e assim pode estar presente no rio Tubarão por ainda não ter o tratamento de esgoto na maior parte da cidade. Além disso, Silva, S. (2016) descreveu que essa bactéria tem capacidade de formar biofilmes em superfícies orgânicas ou inorgânicas, por ter um metabolismo versátil onde tolera vários ambientes com diferentes condições físicas e também por não exigir tanto seus recursos nutricionais.

4.2 TESTE DE SUCEPTIBILIDADES AOS ANTIMICROBIANOS

Os antimicrobianos são importantes para impedir as doenças causadas por bactérias, porém a partir do momento que os microrganismos apresentam resistência aos mesmos, gera uma preocupação à população. Assim, após a identificação das bactérias nas amostras de águas superficiais do rio Tubarão, foi analisado a existência de isolados de *E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* com multirresistência aos antimicrobianos e caracterizado os isolados quanto à susceptibilidade a diferentes classes de antimicrobianos.

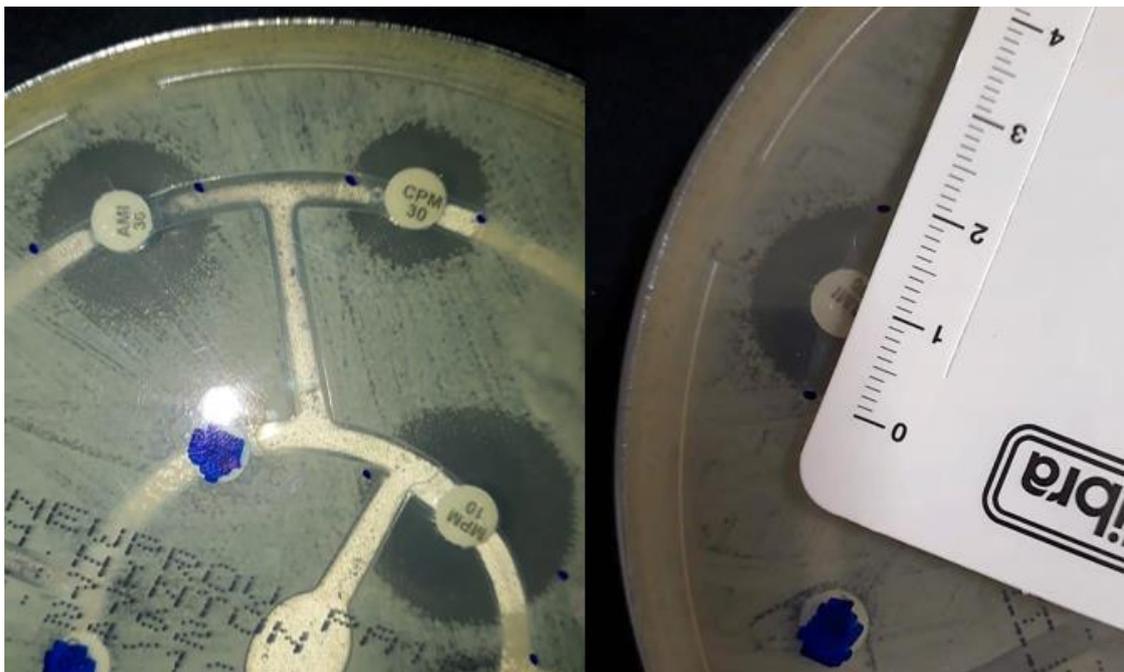
Assim que identificação bacteriana foi feita, as bactérias *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* e *E. coli* isoladas dos pontos 1, 3 e 4 foram selecionadas para o TSA. Sendo assim, as mesmas passaram por repicagem (figura 12) e posteriormente foram preparadas e semeadas nas placas de petri. Após este processo, foi colocado os discos de antimicrobianos em cada placa, identificadas, e posto em estufa bacteriológica. Depois de ± 16 horas as placas de petri foram observadas e os halos foram medidos (figura 13).

Figura 12 - Replicação de *P. aeruginosa* da amostra 2 (P3).



Fonte: Arquivo pessoal da autora (2018).

Figura 13 - Resultado dos halos em uma amostra e a demonstração da medida feita com régua.



Fonte: Arquivo pessoal da autora (2018).

De acordo com os pontos de coleta, a resistência média (soma das porcentagens de resistência dividida pelo número de isolados do ponto) foi maior no ponto 3 (73,33%), seguido do ponto 1 (53,33%) e por último o ponto 4 (44,44%). Em todos os pontos com a presença de ponte (P1, P3, P5) houve a presença de muito lixo, alguns como sapatos, bolsas e roupas, materiais eletrônicos, carrinhos de supermercado, resto de comida, entre outros. O P3 era bem no centro da cidade, onde há liberação de esgoto, e muitas pessoas e animais circulando. No P1 era perceptível que pessoas frequentavam/moravam no local e o P4 foi o local mais “preservado” e de difícil acesso, pois o mesmo tinha mais árvores na beira do rio. Apesar disso, o local foi escolhido somente por ser uma região próxima ao um dos hospitais da cidade.

Em consideração a cada bactéria, a que apresentou o maior percentual de fenótipo resistente foi *P. aeruginosa*, que demonstrou resistência a mais de 10 antimicrobianos nos três pontos de coleta, com resistência a 77,7% dos antimicrobianos. A segunda bactéria que apresentou mais resistência aos antimicrobianos foi a *K. pneumoniae*, onde apresentou resistência de 6 a 11, ou seja, 59,9% dos antimicrobianos nos três pontos de coleta. E em terceiro, *E. coli* que apresentou resistência de 1 a 12 antimicrobianos, assim 33,3% dos isolados foram resistentes (Tabela 2).

Essa incidência baixa de *E. coli* resistente pode ter sido ocorrido por não haver tanto crescimento de *E. coli* depois do processo de repicagem, principalmente na amostra 3 (P4). Também houve presença de colônias de bactérias dentro de alguns halos ou até mesmo a expansão de dois halos ao redor dos discos de antimicrobianos, isso pode ter acontecido pela amostra não ser muito pura.

Conforme pode ser visto na Tabela 4, que segue abaixo.

Tabela 2 – Resultado do Teste de Suceptibilidade a Antimicrobianos das bactérias *Pseudomonas aeruginosa*, *E.coli* e *K. pneumoniae*.

| Antimi- Crobiano | Espécie de Bactéria / Amostra | | | | | | | | |
|----------------------------|-------------------------------|--------------|--------------|-------------------|------------|-------------|----------------------|--------------|------------|
| | <i>P. aeruginosa</i> | | | <i>E. coli</i> | | | <i>K. pneumoniae</i> | | |
| | A1 | A3 | A4 | A1 | A3 | A4# | A1 | A3 | A4 |
| Cefepime | I | R | R | S | I | S | I | I* | S |
| Amicacina | S | S | S | S | S | S | S | S | S |
| Tetraciclina | R | R | R | S | I | S | R | I | S |
| Meropenem | S | S^ | S | S | S | S | S | S | S |
| Aztreonam | R | R^ | R | S | R | S | R | R | R |
| Ceftriaxona | S | S^ | R | S | I* | S | S | R | R |
| Cefoxitina | S* | R | R | S | R | S | R | I | R |
| Ampicilina | R | R | R | I | R | S | R | R | R |
| Cloranfenicol | R | R | R | S | R | S | S | I | S |
| Ceftazidima | R | R | R | S | R | S | R | R | R |
| Amoxicilina + Ac. Clav. | I | R | R | S | R | S | R | R | R |
| Sulfazotrim | R | R | R | S | R | S | R | S* | S* |
| Ciprofloxacina | R | R | R | S | S* | S | R | S* | S |
| Cefazolina | I | R | R | R | R | R | R | R | S |
| Gentamicina | R | S^ | R | S | R | S | R | S | S |
| Índice de | 11 | 11 | 13 | 2 | 12 | 1 | 11 | 10 | 6 |
| Resistência | 73,3% | 73,3% | 86,6% | 13,3% | 80% | 6,6% | 73,3% | 66,6% | 40% |
| Múltipla | | | | | | | | | |
| Média de | A1 | | | A3 | | | A4 | | |
| resistência | 24 (53,3%) | | | 33 (73,3%) | | | 20 (44,4%) | | |
| por amostra | | | | | | | | | |

* Presença de colônias ^ Presença de dois halos # Problema na amostra.

Fonte: Autora (2018).

P. aeruginosa se demonstrou 100% resistente a mais de 60% dos antimicrobianos testados, alguns deles como cefazolina, ceftazidima, ampicilina e aztreonam, os únicos antibióticos que a bactéria se apresentou sensível em todas as amostras foram a amicacina e meropenem. Apesar do P4 ser o ponto de coleta com menos resistência, *P. aeruginosa* apresentou mais resistência nesse ponto.

Chaves (2017) também apresentou resultados semelhantes ao da presente pesquisa, onde os maiores percentuais de resistência de *P. aeruginosa* em água superficial não tratada se deram para ampicilina (95,8%) e aztreonam (67%), porém em menor quantidade para ceftazidima (5,3%) e amicacina (2,6%). Medeiros, Vasconcelos e Calazans (2009) relatou resistência para cefalotina (100%) e sensibilidade a meropenem (100%) e amicacina (90%).

De acordo com Silva, K. (2016) a quantidade maior de resistência do que de sensibilidade deve ocorrer porque essa bactéria consegue sobreviver a ação dos mecanismos de ação das drogas, pois possui vários mecanismos de resistência, facilitando então tanto a sua patogenicidade quanto a contaminação em diversos ambientes. Fuentesfria et al (2008) aponta alguns mecanismos de resistência, como hiperexpressão de bombas de efluxo, produção de β -lactamases, perda ou expressão reduzida de proteínas de membranas externa.

No trabalho de Anduesa et al (2015) no Equador, quase metade das estirpes de *P. aeruginosa* obteve resistência a vários antimicrobianos, bem como por Silva, K. (2016) que de 35 cepas, 25 eram multirresistentes. Esses resultados corroboram com a da presente pesquisa onde o Índice de Resistência Múltipla de todas as amostras de *P. aeruginosa* resistentes tiveram acima da metade dos antimicrobianos testados. Figueiredo et al (2007) já tinha uma preocupação com a prevalência de multi-resistência, pois esquemas combinados de antimicrobianos são utilizados para terem mais sucesso no tratamento clínico contra esse microrganismo.

Álvarez-Otero et al. (2017) afirmam que *P. aeruginosa* apresenta resistência intrínseca a maioria das penicilinas, cefalosporinas de primeira, segunda e terceira geração (exceto ceftazidima), tetraciclinas sulfazotrim e rifampina e para as demais como carbapenêmicos, a maioria desenvolve por resistências adquiridas. Então nessa pesquisa provavelmente para ceftazidima há resistência adquirida e para amicacina e meropenem não há. Silva Junior et al (2014) já descreveu que onde o despejo de esgoto industrial e/ou doméstico faz a propagação dessas bactérias e suas enzimas beta-lactamases. Porém para Medeiros et al (2017) os carbapenêmicos são beta-lactâmicos de amplo espectro e utilizados para infecções causados por essa bactéria, assim possuem uma imutabilidade contra as beta-lactamases, como ESBL e MBL. Pessoa (2013) e Figueiredo et al (2007) ainda relatam que a amicacina é um antimicrobiano utilizado a muito tempo e dentre os antimicrobianos de classe dos aminoglicosídeos, é o que melhor exhibe atividade contra *P. aeruginosa*.

Chaves (2017) ainda registra que o fato de *P. aeruginosa* ter um número alto de resistência a aztreonam é perigoso, pois o mesmo é utilizado para doenças infecciosas

ocasionadas por essa bactéria. Pessoa (2013) relatou que além de aztreonam, gentamicina, tobracina, ampicilina, cirprofloxacina, piperacilina, ceftazidima, cefepime, imipenem e meropenem também são utilizados para o tratamento. Se a bactéria apresentar resistência para ceftazidima, ainda há chance de resposta terapêutica com imipenem ou cefepime, mas caso há resistência ao imipenem, não há outra alternativa com sucesso terapêutico.

K. pneumoniae foi 100% resistente para 5 antimicrobianos, alguns deles como aztreonam, ampicilina e ceftazidima. E 100% sensível apenas para amicacina e meropenem. Santana et al (2012) também apresentou alguns índices de resistência para ampicilina (66%), Melo (2013) constatou altos índices de resistência para cefalosporinas de 3ª geração, aztreonam, e sensibilidade para amicacina e meropenem. Almeida (2013) indicou dados semelhantes para resistência de amicacina (18,2%), porém para meropenem 68,2% dos isolados eram resistentes. Passadouro et al (2014) também isolou *K. pneumoniae* resistente por amicacina (4,3%) em seu trabalho.

Nota-se que todos os antimicrobianos 100% sensíveis a *K. pneumoniae* eram β -lactâmicos. Moreira e Freire (2011) acreditam que esse resultado provém de que *K. pneumoniae* é uma das principais produtoras de enzimas β -lactamases e que apresenta a maior riqueza de fenótipos de resistência associados a produção de ESBL, onde podem sofrer mutações fazendo com que o fármaco não possua seu efeito.

Melo (2013) ressalta que as enzimas β -lactamases são produzidas por meio de genes cromossômicos como *bla_{SHV-1}* e o *bla_{LEN-1}* e os mesmos conferem resistência para penicilinas (ampicilina). Como também podem sofrer mutações dos tipos TEM-1 e SHV-1, os quais inativa antimicrobianos mais recentes como cefalosporinas de 3ª geração (ceftazidima) e monobactâmicos (aztreonam).

O antimicrobiano amicacina evidenciou inibição do crescimento de *K. pneumoniae*, e conforme Pereira (2012) diversos resultados estão sendo encontrados, estas sendo produtoras de ESBL ou não.

No estudo de Santos (2007) a bactéria que se demonstrou mais sensível a este antimicrobiano foi em amostras que não haviam produção de enzimas ESBL, tal como Moreira e Freire (2011), que relataram que os isolados de *K. pneumoniae* que produziam ESBL frequentemente apresentavam resistência a aminoglicosídeos e outras classes. Sendo assim, suponhamos que os isolados do presente estudo não produzissem as mesmas.

Rossi et al (2015) ressaltam que antimicrobianos carbapenêmicos, outro β -lactâmico, tem se demonstrados mais sensíveis a *K. pneumoniae* em diferentes pesquisas. Porém, no presente estudo essa bactéria se demonstrou 100% sensível ao mesmo, Abrantes e

Nogueira (2017) dizem que para hidrolisar e reduzir a capacidade de um antimicrobiano desta classe, é preciso da produção de enzimas β -lactamases denominadas carbapenemase.

Seibert et al (2014) descrevem ainda que essa enzima é codificada por grupo de genes como *blaKPC*, *blaIMP*, *blaVIM*, entre outros, e a produção dessas enzimas está sendo considerado um problema em ascensão. Diante da sensibilidade a esse fármaco acredita-se que esses genes ainda não foram alterados geneticamente, sendo uma informação positiva para a saúde pública.

No presente estudo, *K. pneumoniae* foi resistente de 6 a 11 antimicrobianos González et al (2013) ressaltou que a resistência a múltiplos antimicrobianos dessa bactéria é crescente, principalmente aos β -lactâmicos os quais apresentaram mais resistência nessa pesquisa, como cefalosporinas de 2ª e 3ª geração, penicilinas e monobactâmicos.

E isso é preocupante, pois Melo (2013) descreve que esses fármacos são muito utilizados para tratamento de infecções causadas por bactérias Gram-negativas, inclusive *K. pneumoniae*, por causa de sua baixa toxicidade, custo e variedade de compostos disponíveis. Esse autor ainda relata que *K. pneumoniae* multirresistente se tornou comum, por motivos da existência de enzimas β -lactamases, formação de ESBL e ESBLs com MBLs.

E.coli se demonstrou 100% resistente somente a cefazolina, 66,6% a ampicilina e 33% resistente a aztreonam, ceftazidima, e outros. Ciprofloxacina, meropenem e amicacina foram os antimicrobianos que *E. coli* se demonstrou sensível em todas as amostras.

Pastore (2014) obteve resultados altos para ampicilina (96%), mas resultados baixos para ceftazidima (0%), aztreonam (0%) e amicacina (4%). Chen et al (2017) constatou resultados de resistência mais altos para ampicilina (29%) e sensíveis para cefazolina (89%), aztreonam (94%), ceftazidima (98%), amicacina (99%) e meropenem (100%).

Resultado parecido com o que foi apresentado por Bianchi et al (2014) que o maior grau de resistência foi analisado para ampicilina. Faúla, Cerqueira e Magalhães (2017) encontrou *E. coli* em alimentos apresentando sensibilidade a ciprofloxacina (98,2%), a meropenem (97,7%) e amicacina (100%).

Schneider, Nadvorny & Schmidt (2009) obtiveram resultado parecido para resistência a amicacina (0%), ciprofloxacina (1,92%), porém para ampicilina, somente 36,5% eram resistentes.

De acordo com os resultados obtidos a porcentagem de resistência a cefalosporinas não foi tão elevada, mas esteve bastante presente como no estudo de Pastore (2014).

O único antimicrobiano que *E. coli* apresentou resistências nas 3 amostras foi cefazolina, esta é de primeira geração e as demais se distribuem em segunda, terceira e quarta. Preconiza-se assim que esse resultado tenha relação com o tempo de exposição e os mecanismos de resistência já adotado.

Bianchi et al (2014) descrevem que a resistência à ampicilina que esta bactéria possui, tem relação com fontes de poluição advinda de origem humana. E Diniz & Santos (2017) citam que *E. coli* tem aumentado seus níveis de resistência a ciprofloxacina no ambiente comunitário e hospitalar. E apesar de ser um dos antimicrobianos mais prescritos na prática clínica, é recomendado que este antimicrobiano seja utilizado de forma mais restrita.

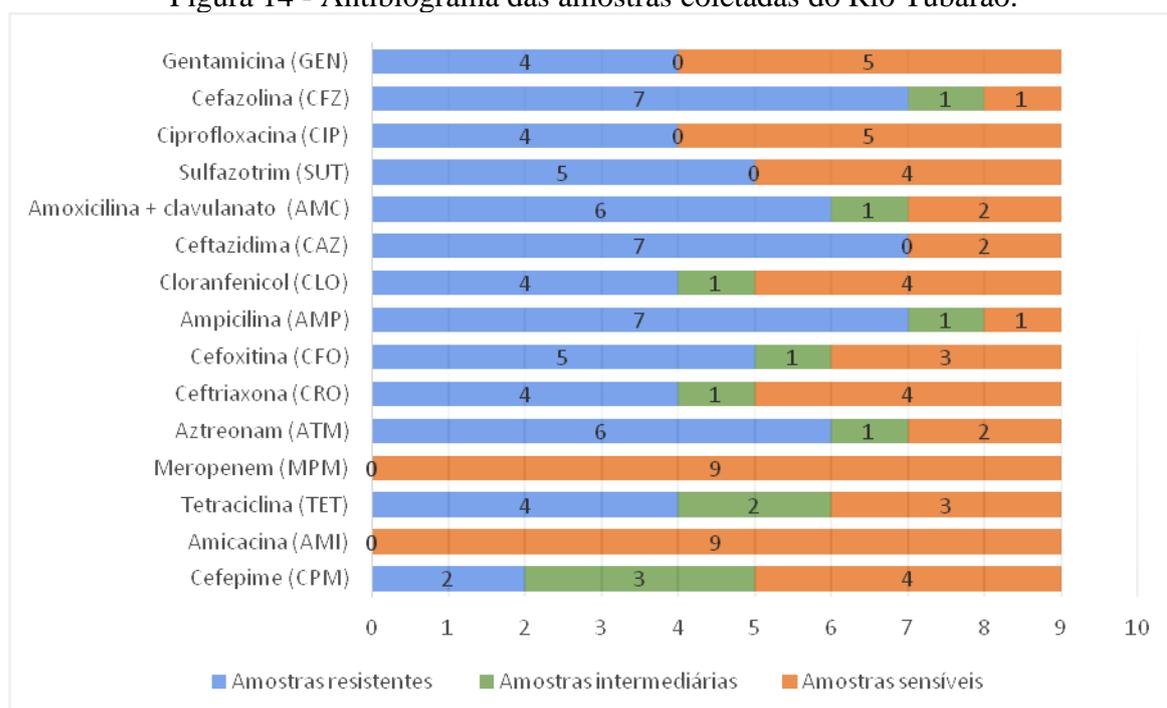
Santana et al (2012) ainda explica que o mesmo é disponibilizado também na rede pública de saúde. E apesar da resistência estar aumentando, esse estudo apresentou boa inibição ao crescimento de *E. coli*, ainda mais quando Silva, Santos & Schimdt (2008) enfatizam que a resistência a esse fármaco acontece de forma intrínseca.

Ainda foi ressaltado por Oliveira (2016) que em ambientes aquáticos há uma variação quanto aos perfis de resistência de *E. coli*. Chen (2017) diz que a influência nesses resultados pode ser pela variação sazonal, onde as bactérias apresentam mais resistências em tempos secos do que em chuvosos.

Esse autor também relatou que a resistência pode variar de acordo com os poluentes. Entrando em conformidade com o presente estudo, que foi feito depois de algumas semanas de chuvas, sendo que a maioria dos poluentes liberados no rio são estáveis durante o ano como o esgoto doméstico, industrial e entre outros.

Dessa maneira, dentre todas as 9 amostras os antimicrobianos com maior resistência foram cefazolina (CFZ) e ampicilina (AMP) em 8 (88,88%) amostras, amoxicilina + A.C. (AMC), ceftazidima (CAZ) e Aztreonam (ATM) em 7 (77,77%) amostras, cefepime (COM), tetraciclina (TET) e cefoxitina (CFO) em 6 (66,66%), cloranfenicol (CLO), sulfazotrim (SUT) em 5 (55,55%), ciprofloxacina, gentamicina, ceftriaxona em 4 (44,44%) (Figura 14).

Figura 14 - Antibiograma das amostras coletadas do Rio Tubarão.



Fonte: Autora (2018).

Sendo assim, esses altos índices de resistência a vários antimicrobianos têm se demonstrado elevados também em outros estudos, já citados ao decorrer da apresentação dos dados. E além disso, muitos autores ficam preocupados devido as patogenicidades que essas bactérias causam. Bortoloti, et al (2018) dizem que a análise de resistência pode ajudar tanto para cuidados clínicos, como também para verificar a qualidade e potabilidade das águas.

6. CONCLUSÃO

O objetivo desta pesquisa foi traçar o perfil de susceptibilidade de cepas de *E.coli*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* isoladas do Rio Tubarão.

Para alcançar este objetivo, foi feita uma pesquisa de campo, com abordagem quantitativa e qualitativa, a partir da coleta de água superficial e do isolamento de bactérias com a metodologia de membrana filtrante, também utilizada por alguns autores como Silva Junior et al. e Anduesa et al. Para posteriormente analisar a existência de isolados de *E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* com multirresistência aos antimicrobianos e caracterizar os isolados quanto à susceptibilidade a diferentes classes de antimicrobianos. O TSA foi feito com 15 antimicrobianos, de acordo com o método de difusão em disco de Kirby-Bauer, aplicado também por Adzitey et al., Beraldo, Anduesa et al., e Chaves.

Os resultados apresentaram crescimento de colônias características de *E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* em todos os pontos de coletas. Para o TSA, foram selecionadas as bactérias que cresceram nos pontos 1, 3 e 4. E de todos os antimicrobianos, pertencentes a 9 classes diferentes, as bactérias em geral obtiveram mais resistência para cefalosporina de 1ª geração (cefazolina) e penicilina (ampicilina), e mais sensibilidade para aminoglicosídeos (amicacina) e carbapenêmicos (meropenem).

Isso posto, retoma-se o problema que norteou esta pesquisa: *E.coli*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* isoladas no perímetro urbano do Rio Tubarão apresentam resistência a antimicrobianos?

Pela análise dos dados, foi possível observar a presença desses microrganismos no perímetro urbano do rio Tubarão e seu resultado à resistência aos antimicrobianos testados. Estima-se que há um risco para a saúde pública da cidade, isso porque aumenta a possibilidade de aquisição de doenças, como também a criação de genes de resistências bacterianas, sendo que essas podem colonizar o intestino de seres humanos, principalmente daqueles que não utilizam água tratada.

Assim, é de suma importância o tratamento da água do rio para posteriormente ser destinado a população, afim de prevenir os surtos de doenças e assim preservar a saúde coletiva.

Desse modo, apesar de conseguir resultados bem importantes, há necessidade de fazer outras pesquisas no local, e até mesmo em ambientes diferentes. Também sugere-se outras pesquisas com mais números de amostras em outros pontos, outras formas de

identificação das espécies de bactérias como provas bioquímicas e a realização de análises em diferentes estações, a fim de obter resultados mais mais precisos.

REFERÊNCIAS

- ABRANTES, Jaime Antonio; NOGUEIRA, Joseli Maria da Rocha. Utilização de testes fenotípicos para a pesquisa de carbapenamases em enterobactérias: uma ferramenta para orientação clínica. **RBAC.**, v.49, n.3, p.240-244, 2017.
- ABREU, Elenice Tavares. Et al. Avaliação da resistência a antimicrobianos de bactérias isoladas de efluente hospitalar. **Acta Scientiarum Technology**, v. 32, n.1, p.1-5, 2010.
- ANDUESA, Félix. Et al. Antimicrobial resistance in strains *Pseudomonas aeruginosa* isolated from waters at Chimborazo, Ecuador. **An real Acad Farm.**, v.81, n.2, p.158-163, 2015.
- ADZITEY, Frederick; NAFISAH, Sumaila; HARUNA, Adamu. Antibiotic Susceptibility of *Escherichia coli* Isolated from some Drinking Water Sources in Tamale Metropolis of Ghana. **Science Alert**, Tamale, v. 8, n. 7, p.34-40, 2015.
- ALMEIDA, Ana Maria de Souza. **Características biológicas e antigênicas de *Escherichia coli* com ênfase aos genes de virulência.** 30 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado em Ciência Animal, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2013.
- ALMEIDA, Ana Maria Souza; LEONÍDIO, Angélica Ribeiro Araújo; ANDRADE, Maria Auxiliadora. Associação dos quadros anatomopatológicos de colibacilose aviária com genes de virulência de *Escherichia coli*. **Veterinário em Foco**, Canoas, v. 13, n. 2, p.113-131, jan./jun. 2016.
- ÁLVAREZ-OTERO, Judith. Et al. Resistencia a carbapenemas en *Pseudomonas aeruginosa* aisladas en urocultivos: prevalencia y factores de riesgo. **Rev. Esp. Quimioter**, v.30, n.3, p.195-200, 2017.
- APHA, American Public Health Association. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. APHA, AWWA, WEF. 22th Edition. 2012.
- ARAÚJO, Bruna Fuga. **Epidemiologia e caracterização molecular de *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* multirresistentes carreando determinantes de resistência às quinolonas mediada por plasmídeos.** Dissertação (Mestrado), Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, 2016.
- ARAÚJO, Juliana Gonçalves de; ALVES, Elaine Maria Guimarães; BECHTLUFFT, Marcelo de Paiva. Perfil de DNA plasmidial em bactérias resistentes a antimicrobianos isolados do Ribeirão Paciência – Pará de Minas – MG. **SynThesis Revista Digital FAPAM**, v.1, n.1, p.282-292, 2009.
- BAHLIS, Mariana Garcia. **Avaliação do perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de bactérias gram-negativas isoladas das águas do Rio dos Sinos, Esteio, RS.** 18 f. TCC (Graduação) - Curso de Ciências Biológicas, Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

- BARROS, André Luiz Raposo et al. Resistência a metais pesados, antimicrobianos e formação de biofilme em cepas de *Escherichia coli* isoladas de praias de São Luis - Maranhão. **Revista de Patologia Tropical**, v. 43, n. 3, p.277-289, 9 out. 2014. Universidade Federal de Goiás. 2014.
- BEZERRA, Renilton Delmundes. **Associações entre consumo de água fora dos padrões de potabilidade e doenças de veiculação hídrica no estado do Tocantins**. 87 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Saúde Coletiva, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2017.
- BIANCHI, Virginia. Et al. Evaluación de *Escherichia coli* resistente a antimicrobianos como especie bioindicadora de contaminación fecal em agua y peces em la cuenca inferior del Río San Juan. **Natura Neotropicalis**, v.45, n.1 y 2, 2014.
- BORTOLI, Jaqueline de et al. Avaliação microbiológica da água em propriedades rurais produtoras de leite localizadas no Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, Porto Alegre, v. 12, n. 1, p.39-53, mar. 2018.
- BORTOLOTTI, Karina da Costa Sassi. Et al. Qualidade microbiológica de águas naturais quanto ao perfil de resistência de bactérias heterotróficas a antimicrobianos. **Eng. Sanit. Ambient.**, v.23, n.4, p.717-725, 2018.
- BRAGA, Benedito et al. **Águas Doces no Brasil: Capital ecológico, uso e conservação**. 4. ed. São Paulo: Escrituras, 729 p. 2015.
- BURGOS, TN. Et al. Água de consumo humano proveniente de poços rasos como fator de risco de doenças de veiculação hídrica. **Rev. Ciênc. Saúde**, São Luís, v.16, n.1, p. 34-38, jan-jun, 2014.
- CANAL, Natália. **Caracterização de Resistência a Antimicrobianos e diversidade genética em escherichia coli isolada de amostras de água da Lagoa Dos Patos, RS**. 98 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010. **Revista Liberato**, v.11, n.16, p.184-190. 2010.
- CAUMO, Karin et al. Resistência bacteriana no meio ambiente e implicações na clínica hospitalar. **Revista Liberato**, v.11, n.6, p.184-190, 2010.
- CHAVES, Magda Antunes de. **Perfil de suscetibilidade em bastonetes gram negativos não fermentadores isolados de amostras de água superficial submetida a tratamento com antimicrobiano**. Dissertação (Mestrado), Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Meio Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2017.
- CHEN, Zhaojun et al. Prevalence of Antibiotic-Resistant *Escherichia coli* in Drinking Water Sources in Hangzhou City. **Frontiers In Microbiology**, Hangzhou, v. 8, n. 11, p.1-11, jun. 2017.
- CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Eighth Edition. USA, 2015.

CORREIA, André Manuel Guimarães Granja. **Presença de Bactérias coliformes e Escherichia coli resistentes aos antimicrobianos Ciprofloxacina e Estreptomicina em água natural.** 92 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado Integrado em Engenharia Química, Universidade do Porto, 2014.

COSTA, Anderson Luiz Pena da; SILVA JUNIOR, Antonio Carlos Souza. Resistência bacteriana aos antimicrobianos e Saúde Pública: uma breve revisão de literatura. **Estação Científica (UNIFAP)**, v.7, n.2, p.45-57, mai-ago. 2017.

COSTA, Wellington Felipe da et al. análise bacteriológica da água e o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos das *Escherichia coli* isoladas. **Journal Health Npeps**, v. 2, n. 1, p.160-177, 2016.

CRUZ, Josilaine Barbosa Fernandes; CRUZ, Azenati Maria da Silva; RESENDE, Anselmo. Análise microbiológica da água consumida em estabelecimentos da educação infantil da rede pública do Gama, DF. **Sabios: Revista de Saúde e Biologia**, Gama, v. 4, n. 1, p.21-23, jun. 2009.

DIAS, Zélia Malena Barreira. **Relação entre o uso e ocupação do solo e a qualidade da água superficial de uma área rural do Distrito Federal-DF.** 57 f. TCC (Graduação) - Curso de Gestão Ambiental, Universidade de Brasília, Planaltina, 2016.

DINIZ, Alena Mileo Monteiro; SANTOS, Rose Mary Correa. *Escherichia coli* resistente a ciprofloxacina em pacientes internados em hospital universitário de Manaus, 2015. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**, v.7, n.1, p.20-24, 2017.

DRUMOND, Scheila Neves. **Avaliação da qualidade da água, do sedimento e identificação molecular dos tipos diarreio gênicos de Escherichia coli na bacia hidrográfica do Rio Copotó na região do Alto Rio Doce, Minas Gerais.** 160 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Engenharia Ambiental- Proamb, Universidade Federal de Ouro Preto - Ufop, Ouro Preto, 2016.

FAÚLA, Leandro Leão; CERQUEIRA, Mônica Maria Oliveira Pinho; MAGALHÃES, Paula Prazeres. Perfil de susceptibilidade antimicrobiana e identificação de patótipos diarreio gênicos entre amostras de *Escherichia coli* isoladas de alimentos. **R. bras. Ci. Vet.**, v.24, n.1, p.108-115, 2017.

FERREIRA, Rute Andreia Pereira. **Resistência de Enterobacteriaceae a Antimicrobianos Beta-Lactâmicos.** Dissertação (Mestrado), Curso de Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2015.

FIGUEIREDO, Eduardo Andrada Pessoa de. et al. *Pseudomonas aeruginosa*: Frequência de Resistência a Múltiplos Fármacos e Resistência Cruzada entre Antimicrobianos de Recife/PE. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v.19, n.4, 2007.

FRANÇA, Paula Thaís Ranzani de. **Avaliação da qualidade de águas de recreação por meio da resistência de bactérias heterotróficas não-coliformes a diferentes antimicrobianos.** 72 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Meio Ambiente e Recursos Hídricos, Universidade Federal de Itajubá, Itajubá, 2013.

FRANÇA, Paula Thaís Ranzani de; MELLONI, Rogério. Avaliação microbiológica de águas de recreação por meio da análise de resistência de bactérias heterotróficas a antimicrobianos. **Revista Brasileira de Recursos Hídricos**, Itajubá, v. 19, n. 7, p.107-113, jun. 2014.

FREIRE, Tânia Andreia Silva. **Águas não tratadas no Norte de Portugal: Qualidade microbiológica e Resistência aos antimicrobianos**. Dissertação (Mestrado), Universidade do Porto. Porto, 2015.

FUENTEFRIA, Daiane Bopp et al. Pseudomonas aeruginosa: disseminação de resistência antimicrobiana em efluente hospitalar e água superficial. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Porto Alegre, v. 5, n. 41, p.470-473, out. 2008.

GOMES, Gabriela Batista. **Multirresistência de Enterococcus sp. isolados do Lago Igapó na cidade de Londrina - PR**. 50 f. TCC (Graduação) - Curso de Engenharia Ambiental, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, 2015.

GONZÁLEZ, Ana C. et al. Caracterización de cepas de *Klebsiella pneumoniae* productora de β -lactamasa de espectro extendido aisladas en dos unidades de cuidados intensivos. **Revista Chilena Infectol.**, v.30, n.4, p.374-380, 2013.

HAHN, Ana Bárbara Barth. **Avaliação do perfil de resistência a antimicrobianos e metais pesados em micro-organismos isolados do Rio dos Sinos/RS**. 76 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

HOLT, Kathryn E. et al. Genomic analysis of diversity, population structure, virulence, and antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae*, an urgent threat to public health. **Revista PNAS**, 2015.

JÁCOME, Paula Regina Luna de Araújo. **Caracterização fenotípica e molecular de isolados de Pseudomonas aeruginosa procedentes de pacientes internados em hospitais de Recife-PE**. Dissertação (Mestrado), Pós-graduação em Medicina Tropical, Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2011.

SILVA JUNIOR, Samuel de Alcântara et al. Perfil de resistência de *Pseudomonas aeruginosa* provenientes de água superficial e efluente hospitalar: teste de sensibilidade a antimicrobianos e detecção de metalo- β -lactamases. **Rev. Bras. Pesq. Saúde**, v.16, n.4, p.91-104, 2014.

LEÃO, Marcelo Franco; OLIVEIRA, Eniz Conceição; PINO, José Claudio Del. Análise de água: Um estudo sobre os métodos e parâmetros que garantem a potabilidade dessa substância fundamental para a vida. **Revista Destaques Acadêmicos**, v.6, n.4, 2014.

LIMA, Maria Carminati et al. Especiação de cobre e chumbo em sedimento do Rio Tubarão (SC) pelo método tessier. **Química Nova**, Tubarão, v. 24, n. 9, p.734-742, maio 2001.

LIMA, Maria Larissa Correia de. et al. *Pseudomonas aeruginosa*. **Mostra Científica em Biomedicina**, Centro Universitário Católica de Quixadá, v.1, n.1, jun 2016.

LOUREIRO, Rui João et al. O uso de antimicrobianos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. **Revista Portuguesa de saúde pública**, v. 34, n. 1, p.77-84, 2016.

LYIMO, Beatus et al. Comparison of antibiotic resistant *Escherichia coli* obtained from drinking water sources in northern Tanzania: a cross-sectional study. **Bmc Microbiology**, v. 16, n. 1, p.1-10, 3 nov. 2016.

MADIGAN, Michael T. et al. **Microbiologia de Brock**. 14. ed. Porto Alegre: Artmed, 1006 p. 2016.

MAGALHÃES, Sandra Célia Muniz. **A expansão urbana de Montes Claros e suas implicações na ocorrência de doenças de veiculação hídrica**. Dissertação (Mestrado), Pontifícia Universidade Católica de São Paulo. São Paulo, 2009.

MARINHO, Catarina Andreia Moreira. **Resistência a antimicrobianos em *Enterococcus spp.* e *Escherichia coli* de equinodermes: um problema ambiental e de saúde pública**. 109 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado em Genética Molecular Comparativa e Tecnológica, Universidade de Trás-os-montes e Alto Douro, Vila Real, 2013.

MARTINS, Ana Filipa Macedo Magalhães. **Prevalência de resistência a antimicrobianos em isolados ambientais de *Escherichia coli* e enterococos**. 129 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestre em Tecnologia Bioquímica em Saúde, Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto, Instituto Politécnico do Porto, Portugal, 2012.

MARTINS, Tânia Maria Correia. **Caracterização da virulência e dos perfis de resistência de populações microbianas patogênicas presentes no efluente final de ETAR**. 113 f. Tese (Doutorado) - Curso de Mestrado Integrado em Engenharia Biomédica, Universidade do Minho, Braga, 2012.

MATA, Patricia Terron Ghezzi da; ABEGG, Maxwel Adriano. Descrição de caso de resistência a antimicrobianos por *Pseudomonas aeruginosa*. **Arq Mudi**, v.11, n.2, p.20-25, 2007.

MEDEIROS, Diego dos Santos de. **A mobilização de elementos perigosos, depois de uma precipitação intensa, na Bacia Hidrográfica do Rio Tubarão, estado de Santa Catarina**. 55 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado em Avaliação de Impactos Ambientais, Universidade La Salle, Canoas, 2017.

MEDEIROS, Lilian Vieira de; VASCONCELOS, Ulrich; CALAZANS, Glícia Maria Torres. Ocorrência de linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* cloro resistentes em águas de diferentes origens. **Acta Sci, Biol. Sci.**, v.29, n.3, p.309-313, 2007.

MELO, Rita de Cássia Andrade. **Isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* produtores e não produtores de KPC: relação com a presença dos genes de virulência *fimH*, *mrkD* e *irp2***. Dissertação (Mestrado), Pós-graduação em Medicina Tropical, Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2013.

MIRANDA, Andreza Costa. **Degradação de microcontaminantes emergentes e inativação de cepa de *E.coli* resistentes a antimicrobianos por Processos Oxidativos Avançados**. 149

f. Tese (Doutorado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2016.

MOREIRA, Ana Cristina Azevedo; CARVALHO, José Luiz Moreira de. Ocorrência de *Klebsiella pneumoniae* e outros coliformes em sabão neutro líquido utilizado em um berçário de hospital. **Revista Ci. Méd. Biol.**, v.5, n.3, p.245-252, 2006.

MOREIRA, Vanessa Carvalho; FREIRE, Daniel. ***Klebsiella pneumoniae* e sua resistência a antimicrobianos.** 2011.

NASCIMENTO, Viviane Silva Félix et al. Epidemiologia de doenças diarreicas de veiculação hídrica em uma região semiárida brasileira. **Conscientiae Saúde**, Natal, v. 12, n. 3, p.353-361, 2013.

NEVES, Patricia R. et al. *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente: um problema endêmico no Brasil. **Bras Patol Med Lab.**, v.47, n.4, p.409-420, 2011.

OLIVEIRA, Daniele Vargas de. **Avaliação do perfil de resistência a antimicrobianos de bactérias gram-negativas isoladas nas águas do Arroio Dilúvio.** 84 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

OLIVEIRA, Raphaela Sanches de. **Densidade e diversidade de fenótipos de resistência a antimicrobianos de Enterococcus sp, Escherichia coli e Aeromonas sp isoladas de água, sedimento e mexilhão coletados em Santos e Itanhaém, São Paulo, Brasil.** 62 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós Graduação em Biodiversidade Aquática, Universidade Estadual Paulista, São Vicente, 2016.

OLIVEIRA, Waléria Finicia; PINTO, Osvaldo Borges. Análise Microbiológica da Qualidade das Águas do Rio Cuiabá Perímetro Urbano, a partir de 4 Pontos de Amostragem. **UNICIÊNCIAS**, v.21, n.2, p.56-59, 2017.

PASSADOURO, Rui. Et al. Avaliação do Perfil de Sensibilidade aos Antimicrobianos na Infecção Urinária da Comunidade. **Acta Med. Port.**, v.27, n.6, p.737-742, 2014.

PASTORE, Ana Paula Winter. **Análise da resistência a antimicrobianos e determinação dos grupos filogenéticos em isolados de Escherichia coli de origem ambiental, humana e animal.** 77 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

PEREIRA, Polyana Silva. **Caracterização molecular de Klebsiella pneumoniae multirresistente produtoras de carbapenemase do tipo KPC isoladas em diferentes regiões do Brasil.** Dissertação (Mestrado), Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, Instituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2012.

PERES, Bianca de Miranda. **Bactérias indicadoras e patogênicas em biofilms de sistemas de tratamento de água, sistemas contaminados e esgoto.** Dissertação (Mestrado), Pós-Graduação em Microbiologia, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2011.

PESSOA, Vanessa da Silva. ***Pseudomonas aeruginosa*: Epidemiologia e resistência a antimicrobianos em hospital universitário do sudeste do Brasil.** Dissertação (Mestrado), Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, 2013.

PORTUGAL, Daniela Sofia Costa Gomes. **Prevalência de bactérias resistentes a antimicrobianos em água natural.** 84 f. Tese (Doutorado) - Curso de Mestrado Integrado em Engenharia Química, Universidade do Porto, 2015.

ROMERO, Lana Carolina Zaire. **Revisão bibliográfica sobre a emergência e disseminação de *Escherichia coli* resistentes aos carbapenêmicos.** Monografia (Graduação), Biomedicina, Universidade Federal do Estado de Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2016.

ROMLING, Ute. Et al. A major *Pseudomonas aeruginosa* Clone Common to Patients and Aquatic Habitats. **Applied and Environmental Microbiology**, v.60, n.6, p.1734-1738, 1994.

ROSSI, Diogo Jorge. Et al. Evolução da resistência de *Klebsiella pneumoniae* no Hospital Universitário de Londrina no período de 2000 a 2011. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v.36, n.1, p.267-274, 2015.

RUFINO, Rui César. **Avaliação da qualidade ambiental do Município de Tubarão (SC) através do uso de indicadores ambientais.** 123 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Engenharia de Produção, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002.

SANTANA, Tatiana Cristina Fonseca Soares de. et al. Perfil de resistência de *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp. isoladas de urocultura de comunidade do município de São Luís – MA no período de 2005-2008. **Revista de Patologia Tropical**, v.41, n.3, p.295-303, 2012.

SANTOS, Daniella Fabíola dos. **Características microbiológicas de *Klebsiella pneumoniae* isoladas no meio ambiente hospitalar de pacientes com infecção nosocomial.** Dissertação (Mestrado), Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Saúde, Universidade Católica de Goiás. Goiânia, 2007.

SCHNEIDER, R.N; NADVORNY, A.; SCHMIDT, V. Perfil de resistência antimicrobiana de isolados de *Escherichia coli* obtidos de águas superficiais e subterrâneas, em área de produção de suínos. **Biotemas**, 22 (3): 11-17, setembro de 2009.

SCHUROFF, Paulo Alfonso et al. Qualidade microbiológica da água do Lago Igapó de Londrina - PR e caracterização genotípica de fatores de virulência associados a *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) e *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC). **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 35, n. 2, p.11-20, 23 abr. 2014. Universidade Estadual de Londrina. 2014.

SEIBERT, Gabriela. Et al. Infecções hospitalares por enterobactérias produtoras de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase em um hospital escola. **Rev. Einstein**, v.12, n.3, p.282-286, 2014.

SILVA, F.F.P.; SANTOS, M.A.A.; SCHMIDT, V. Resistência a antimicrobianos de *Escherichia coli* isolada de dejetos suínos em esterqueiras. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.60, n.3, p.762-765, 2008.

SILVA, Keila de Cássia Ferreira de Almeida. **Caracterização de *Pseudomonas aeruginosa* encontradas colonizando e/ou infectando pacientes queimados internados em um hospital público da cidade do Rio de Janeiro**. Dissertação (Mestrado), Pós-graduação em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde, Universidade Federal Fluminense. Niterói, 2016.

SILVA, Stephanie Targino. Análise fenotípica e genética de fatores de virulência de isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* multidroga-sensível e multi-droga resistente de Recife-PE. Dissertação (Mestrado), Pós-graduação em medicina tropical, Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2016.

SILVA, Tarcísio Macedo et al. Transferência de resistência antimicrobiana entre enterobactérias patogênicas de importância aviária – Impactos em saúde pública. **Archives of Veterinary Science**, v.21, n.2, p.09-20, ago. 2016.

SKORONSKI, Everton et al. Estudo da aplicação de tanino no tratamento de água para abastecimento captada no rio Tubarão, na cidade de Tubarão, SC. **Ambiente e Água - An Interdisciplinary Journal Of Applied Science**, v. 9, n. 4, p.679-687, 17 out. 2014.

TORTORA, Gerard J.; FUNKE, Berdell R.; CASE, Christine L. **Microbiologia**. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 894 p. 2005.

TZOUVELEKIS, L.S. et al. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and Other *Enterobacteriaceae*: an Evolving Crisis of Global Dimensions. **Clinical Microbiology Reviews**, v.25, n.4, p.682-707, 2012.

TUBARÃO, Município. **A cidade: Aspectos físicos**. 2015. Disponível em: <<http://www.tubarao.sc.gov.br/cms/pagina/ver/codMapaItem/22162>>. Acesso em: 26 maio 2018.

TUBARÃO SANEAMENTO. **Nossa água: Mananciais**. 2018. Disponível em: <<http://www.tubaraosaneamento.com.br/nossa-agua>>. Acesso em: 26 jun. 2018.

VASCONCELOS, F. R. et al. Perfil de resistência antimicrobiana de *Escherichia coli* isoladas do açude Santo Anastácio, Ceará, Brasil. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 77, n. 3, p.405-410, jul. 2010.

VOLKMER, Juliane Regina. **Qualidade da água de abastecimento público tratada por sistema convencional de um Município localizado na região noroeste do Rio Grande do Sul**. 58 f. TCC (Graduação) - Curso de Engenharia Ambiental e Sanitária, Universidade Federal da Fronteira Sul, Cerro Largo, 2017.

YAMAGUCHI, Mirian Ueda et al. Qualidade microbiológica da água para consumo humano em instituição de ensino de Maringá-PR. **O Mundo da Saúde**, São Paulo, v. 37, n. 3, p.312-320, 2013.

ANEXOS

ANEXO A – Meio de cultura Ágar Cromogênico Geral

PLACAS ESPECIAIS PROBAC – AGAR CROMOGÊNICO GERAL

Indicações

Meio de Cultura pronto para uso, não seletivo, indicado para isolamento, diferenciação e enumeração de microrganismos em amostras diversas.

Apresentação



PECG90



Pacote com 10 Placas Especiais, na medida de 90 x 15 mm.

Composição

Agar Cromogênico e Água Purificada.

Princípio

O Agar Cromogênico Geral é um meio utilizado para teste presuntivo, em amostras diversas, que baseia-se na coloração diferenciada das colônias, identificando presuntivamente microrganismos de interesse clínico e não clínico.

As Placas Especiais Probac®, possuem uma ampla linha de meios de cultura, produzidas em condições de total esterilidade e hermeticamente fechadas, que proporciona um maior tempo de vida útil ao produto e uma maior flexibilidade para armazenamento e transporte. Podendo ser transportada e mantida a temperatura ambiente (consulte conservação).

Controle de Qualidade

Todos os lotes são submetidos a ensaios de desempenho com cepas padrões ATCC. Após 24hs, a 33°C ± 2°C, em atmosfera adequada, já é possível realizar a contagem das colônias, veja as características conforme descrito no item interpretação dos resultados.

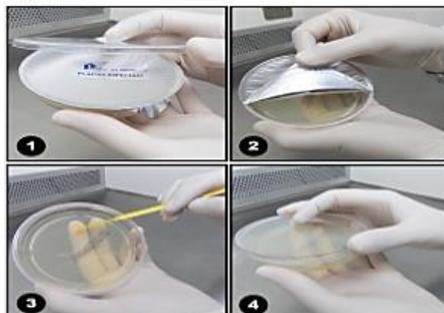
| Cepas* | Desempenho | Coloração |
|---------------------------------|------------|-----------------|
| <i>E. coli</i> ATCC 25922 | Bom | Rosa a Vermelha |
| <i>K. pneumoniae</i> ATCC 18883 | Bom | Azul escuro |
| <i>P. mirabilis</i> ATCC 25933 | Bom | Amarelo |
| <i>S. agalactiae</i> ATCC 12401 | Bom | Azul claro |
| <i>S. aureus</i> ATCC 25923 | Bom | Branco |
| <i>E. faecalis</i> ATCC 29212 | Bom | Azul turquesa |
| Outros microrganismos | Bom | Creme |

* Inóculo 10⁶ UFC

Certificado de Análise, FISPQ e Bula estão disponíveis no site www.probac.com.br

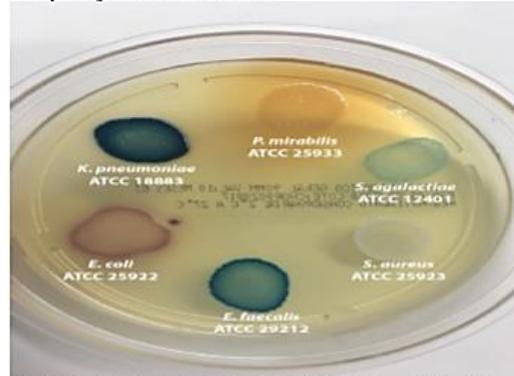
Procedimento

Seguir conforme ilustração abaixo:



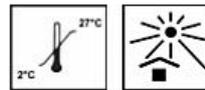
- 1) Retire a tampa plástica;
- 2) Remova o selo protetor;
- 3) Semeie a amostra de acordo com os procedimentos recomendáveis;
- 4) Tampe e incube a placa de acordo com a metodologia utilizada no laboratório.

Interpretação dos Resultados:



Verifique a tabela de desempenho no item controle de qualidade.

Conservação



Manter entre 2° e 27°C, ao abrigo da Luz.

Validade



10 meses a partir da data de fabricação.

Precauções

Após a realização dos testes, este material deverá ser descartado conforme as recomendações vigentes para resíduos de serviços de saúde.

Produto isento de registro no Ministério da Saúde de acordo com a RDC nº 36 de 2015, não podendo ser utilizado para diagnóstico humano.

Referências Bibliográficas

- 1 - Jorgensen JH, Pfaller MA, Carroll KC, Funke G, Landry ML, Richter SS, Warrack DW - Manual of Clinical Microbiology. 11th Ed. ASM Press, Washington, DC, 2015.
- 2 - Koneman E.W. et al. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 7th. ed. Philadelphia: Lippincott, New York: 2016.
- 3 - Atlas R.M., Handbook of Microbiological Media. 4th ed. ASM Press, Washington, DC, 2010.

ISENTO DE REGISTRO Rev.: 00



PROBAC DO BRASIL Produtos Bacteriológicos Ltda.
Rua Jaguaribe, 35 – Santa Ceclia – São Paulo – SP
CEP: 01224-901 Fone: 55 11 3367-4777
CNPJ 45.597.176/0001-00 – Insc. Est. 110.485.842.111
Responsável Técnico: Francisco Donizeti Montagnoli CRF/SP: 47.534
Site: www.probac.com.br email: probac@probac.com.br

ANEXO B – Meio de cultura CROMOCULTBAC

PLACAS ESPECIAIS PROBAC – CROMOCULTBAC

Indicações

Meio de Cultura pronto para uso, indicado para detecção, diferenciação e enumeração de microrganismos do grupo Coliformes Totais e Fecais.

Apresentação



Pacote com 10 Placas Especiais, na medida de 90 x 15 mm.

Composição

Base Cromogênica, Agar Bacteriológico e Água Purificada.

Princípio

Cromocultbac é um meio desenvolvido para seletividade e diferenciação de microrganismos do grupo Coliformes Totais e *E. coli*, em amostras diversas. O meio possui Tergitol em sua formulação, que inibe o crescimento de microrganismos Gram positivos e alguns Gram negativos, não interferindo no crescimento de microrganismos do grupo Coliformes. As Placas Especiais Probac®, possuem uma ampla linha de meios de cultura, produzidas em condições de total esterilidade e hermeticamente fechadas, que proporciona um maior tempo de vida útil ao produto e uma maior flexibilidade para armazenamento e transporte. Podendo ser transportada e mantida a temperatura ambiente (consulte conservação).

Controle de Qualidade

Todos os lotes são submetidos a ensaios de desempenho com cepas padrões ATCC. Após 48hs, a 33°C ± 2°C, em atmosfera adequada, já é possível realizar a contagem das colônias, veja as características conforme descrito no item interpretação dos resultados.

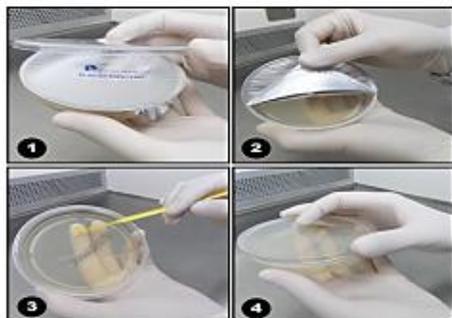
| Cepas* | Desempenho | Coloração |
|---------------------------------|------------|-------------------|
| <i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883 | Bom | Violeta a Azul |
| <i>E. coli</i> ATCC 25922 | Bom | Salmão a Vermelho |
| <i>S. aureus</i> ATCC 25923 | Inibido | -- |
| <i>E. faecalis</i> ATCC 29212 | Inibido | -- |

*Inoculo 10⁸ UFC

Certificado de Análise, FISPQ e Bula estão disponíveis no site www.probac.com.br

Procedimento

Seguir conforme ilustração abaixo:



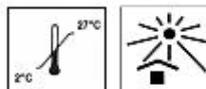
- 1) Retire a tampa plástica;
- 2) Remova o selo protetor;
- 3) Semeie a amostra de acordo com os procedimentos recomendáveis;
- 4) Tampe e incube a placa de acordo com a metodologia utilizada no laboratório.

Interpretação dos Resultados:



Colônias de *E. coli* podem variar de coloração Azul a Violeta e colônias do grupo Coliformes Totais podem apresentar coloração de Salmão a Vermelho. Outros microrganismos podem crescer no meio e apresentar colônias de coloração variada ou sem coloração.

Conservação



Manter entre 2° e 27°C ao abrigo da luz.

Validade



10 meses a partir da data de fabricação.

Precauções

Após a realização dos testes, este material deverá ser descartado conforme as recomendações vigentes para resíduos de serviços de saúde.

Produto isento de registro no Ministério da Saúde de acordo com a RDC nº 36 de 2015, não podendo ser utilizado para diagnóstico humano.

Referências Bibliográficas

- 1 - Jorgensen JH, Pfaller MA, Carroll KC, Funke G, Landry ML, Richter SS, Warnock DW - Manual of Clinical Microbiology. 11th Ed. ASM Press, Washington, DC, 2015.
- 2 - Koneman E.W. et al. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 7th. ed. Philadelphia: Lippincott, New York: 2016.
- 3 - Atlas R.M., Handbook of Microbiological Media. 4th ed. ASM Press, Washington, DC, 2010.

ISENTO DE REGISTRO Rev.: 00



PROBAC DO BRASIL Produtos Bacteriológicos Ltda.
Rua Jaguaribe, 35 – Santa Cecília - São Paulo – SP
CEP: 01224-001 Fone: 55 11 3367-4777
CNPJ 45.597.176/0001-00 - Insc. Est. 110.485.842.111
Responsável Técnico: Franciaco Donizeti Montagnoli CRF/SP: 47.534
Site: www.probac.com.br email: probac@probac.com.br

ANEXO C – Agar Pseudomonas

AGAR PSEUDOMONAS



Indicações

Meio de Cultura indicado para recuperação seletiva e enumeração de *Pseudomonas aeruginosa* em amostras de água, através do método de filtração por membrana.

Apresentação



PMPAC49, PMPAC6 e
PMPAC9

Meio de Cultura pronto para uso, pacote contendo 10 Placas de Petri nas medidas de 49, 60 e 90 mm.

Composição

Extrato de Levedura, L-Lisina HCl, Cloreto de Sódio, Xilose, Sacarose, Lactose, Vermelho de Fenol, Citrato de Ferro Amoniacal, Tiosulfato de Sódio, Sulfato de Magnésio, Kanamicina, Ácido Nalidixico, Agar Bacteriológico e Água Purificada.

Princípio

Os microrganismos do gênero *Pseudomonas* são encontrados na água e no solo. *Pseudomonas aeruginosa* é o patógeno humano mais importante, tanto no que se refere ao número e tipos de infecções causadas como à sua morbidade e mortalidade. Vários métodos têm sido utilizados para a enumeração de *Pseudomonas aeruginosa* a partir de amostras de água, alguns dos quais têm sido mais amplamente aceitos do que outros. Os procedimentos de número mais provável (NMP) resultam em níveis de recuperação satisfatórios de *P. aeruginosa*, mas não são utilizáveis para ensaios de amostras de água de grande volume pela falta de precisão. Esta deficiência é eliminada através da técnica de membrana filtrante (MF).

Extrato de Levedura, Lisina e os carboidratos fornecem compostos carbonáceos e nitrogenados, fontes de energia e vitaminas necessárias para o metabolismo bacteriano. O Cloreto de Sódio mantém o equilíbrio osmótico. Os sais fornecem íons essenciais. O Vermelho de Fenol é um indicador de pH, que se torna amarelo em resposta a ácidos produzidos como resultado da fermentação dos carboidratos. A Kanamicina inibe a síntese protéica de microrganismos gram-positivos. O Ácido Nalidixico bloqueia a replicação das bactérias gram-positivas susceptíveis e o Agar Bacteriológico um agente solidificante.

Controle de Qualidade

Os seguintes resultados foram obtidos nos ensaios de desempenho do meio, com diferentes espécies de cultura após incubação em temperatura e tempo ideal. Todos os lotes são submetidos a ensaios com cepas padrões ATCC, conforme descrito na tabela a seguir:

| Cepas | Crescimento | Coloração |
|---------------------------------|---------------------------|-----------|
| <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 | Bom | Rosa |
| <i>E. coli</i> ATCC 25922 | Inibição parcial ou total | --- |

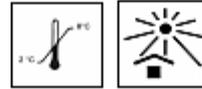
Todos os documentos pertinentes a este produto como Certificado de Análise, FISPO e Bula estão disponíveis no site www.probac.com.br.

Procedimento

- 1) Colete as amostras e processe de acordo com as recomendações para quantificação de *Pseudomonas aeruginosa* em água;
- 2) Depois da filtração da amostra em membrana de 47 mm e 45 µm, coloque a membrana na superfície do meio evitando a formação de bolhas;
- 3) Incubar durante o período e a temperatura ideal para cada microrganismo a ser pesquisado;
- 4) Após o período de incubação, realizar a visualização das colônias.

Consulte o método padrão para informações adicionais a respeito da técnica de filtração por membrana para este meio.

Conservação



Manter sob refrigeração, entre 2° e 8°C ao abrigo da luz.

Validade



4 meses a partir da data de fabricação.

Precauções

Após a realização dos testes, este material deverá ser descartado conforme as recomendações vigentes para resíduos de serviços de saúde.

Referências Bibliográficas

1. Levin and Cabelli. 1972. Appl. Microbiol. 24:864.
2. Carson, Peterson, Favero, Doto, Collins and Levin. 1975. Appl. Microbiol. 30:935.
3. Dutka and Kwahn. 1977. Appl. Environ. Microbiol. 33:240.
4. Brodsky and Ciebin. 1978. Appl. Environ. Microbiol. 36:26.
5. Clesceri, Greenberg and Eaton (ed.), 1998. Standard methods for the examination of water and wastewater, 20th ed. American Public Health Association, Washington, D.C.
6. Estevez. 1984. Lab. Med. 15:258.
7. Manual Difco and BBL Microbiology.

SOMENTE PARA USO "IN VITRO" Rev.: 03



PROBAC DO BRASIL Produtos Bacteriológicos Ltda.
Rua Jaguaribe, 35 – Santa Cecília – São Paulo – SP
CEP: 01224-001 Fone: 55 11 3367-4777
CNPJ 45.597.176/0001-60 - Insc. Est. 110.485.842.111
Responsável Técnico: Francisco Donizeti Montagnoli CRP/SP: 47.534
Site: www.probac.com.br e-mail: probac@probac.com.br