



UNIVERSIDADE FEDERAL DE RORAIMA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS NATURAIS

ILZO COSTA PESSOA

PERFIL DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS DE BACTÉRIAS
ISOLADAS DE AMOSTRAS DE ÁGUAS DAS ESCOLAS ESTADUAIS DE BOA
VISTA - RR

Boa Vista - RR

2011

ILZO COSTA PESSOA

**PERFIL DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS DE BACTÉRIAS
ISOLADAS DE AMOSTRAS DE ÁGUAS DAS ESCOLAS ESTADUAIS DE BOA
VISTA - RR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Recursos Naturais, Universidade Federal de Roraima, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Recursos Naturais na Área de Bioprospecção.

Orientador: Prof. Dr. Marcos José Salgado Vital.

Boa Vista - RR

2011

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal de Roraima

P475p Pessoa, Ilzo Costa.

Perfil de resistência antimicrobianos de bactérias isoladas de amostras de águas das Escolas Estaduais de Boa Vista-RR / Ilzo Costa Pessoa - Boa Vista, 2011.

97 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Marcos José Salgado Vital .

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Roraima, Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais.

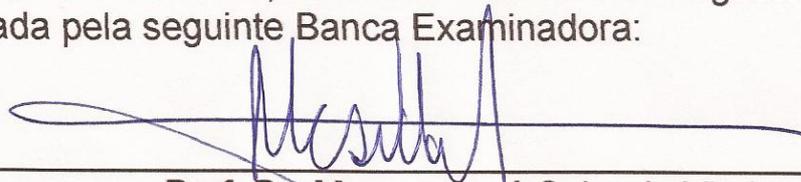
1 – Qualidade da água. 2 – Bactérias heterotróficas. 3 – Coliformes. 4 – Resistência. 5 – Antimicrobianos. I – Título. II – Vital, Marcos José Salgado. (orientador)

CDU – 556.115

ILZO COSTA PESSOA

**PERFIL DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE
AMOSTRAS DE ÁGUAS DAS ESCOLAS ESTADUAIS DE BOA VISTA-RR**

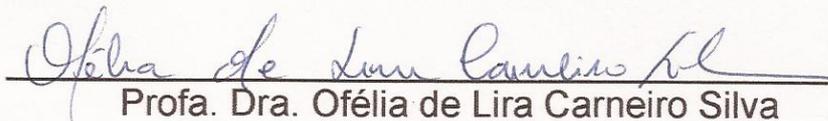
Dissertação apresentada como pré-requisito para conclusão do Curso de Mestrado em Recursos Naturais da Universidade Federal de Roraima, defendida em 24 de agosto de 2011 e avaliada pela seguinte Banca Examinadora:



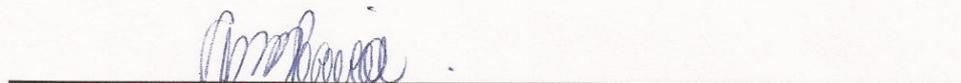
Prof. Dr. Marcos José Salgado Vital
Orientador - UFRR



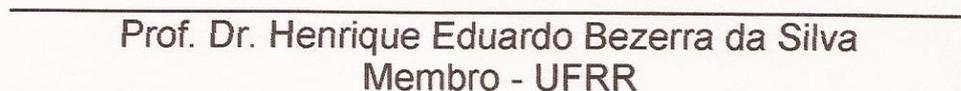
Prof. Dra. Fabiana Granja
Membro - UFRR



Profa. Dra. Ofélia de Lira Carneiro Silva
Membro - UFRR



Profa. Dra. Gilmara Maria Duarte Pereira
Membro - EMBRAPA



Prof. Dr. Henrique Eduardo Bezerra da Silva
Membro - UFRR

In memoriam

A minha mãe Francisca Costa Pessoa

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-graduação em Recursos Naturais da Universidade Federal de Roraima, pela oportunidade.

Ao Prof. Dr. Marcos José Salgado Vital por tudo o que fez por esse trabalho, pela orientação crítica, pelo seu profissionalismo, sempre aconselhando-me para a melhor direção a ser seguida.

Aos professores do Programa de Pós-graduação, pela generosidade ao dividirem sua experiência e conhecimentos.

Aos integrantes das bancas de defesa, pelas contribuições para o aperfeiçoamento deste trabalho.

Aos colegas de turma pela amizade.

A minha companheira Francilvana.

Aos meus filhos Diego, Gabriel e Chicão.

Aos estagiários do Laboratório de Microbiologia Jeffson França e Rodrigo Lopes.

A mestranda Andréia Alencar pelo apoio.

A Secretaria de Estado da Educação, Cultura e Desportos.

Ao Centro de Geotecnologia, Cartografia e Planejamento Territorial.

Às biomédicas Márcia Brazão Silva Brandão, Cátia Alexandra Ribeiro Menezes e o farmacêutico bioquímico Gabriel Turmero Cidade, do Laboratório Central – LACEN-RR, pelo profissionalismo, amizade e auxílio na identificação das espécies de bactérias e nas análises dos antibiogramas.

A todos que de uma forma ou de outra ajudaram, acreditaram e me incentivaram.

A importância dos infinitamente pequenos é infinitamente grande.

(Louis Pasteur)

RESUMO

Atualmente, uma das maiores preocupações da humanidade é com a disponibilidade e qualidade da água. A exploração inadequada das fontes acarreta a contaminação das águas superficiais e subterrâneas que se tornam um risco para a saúde pública. Dentre as fontes biológicas de contaminação da água, incluem-se as bactérias, que são responsáveis por inúmeras doenças, sendo frequentemente tratadas com antimicrobianos. O amplo uso de antimicrobianos na medicina humana e na produção animal tem resultado no aumento do número de bactérias comensais e patogênicas resistentes a agentes antimicrobianos, fato que nos últimos anos vem se tornando um dos principais problemas de saúde pública. O presente trabalho resulta do interesse pelo estudo da qualidade da água consumida pelos alunos de 20 escolas estaduais da rede pública de Boa Vista – RR, bem como obter o perfil de resistência a antimicrobianos de bactérias isoladas a partir de diferentes amostras de águas, coletadas nessas escolas. No período de outubro de 2010 a abril de 2011, foram coletadas 40 amostras de águas de torneiras das copas e 40 amostras de águas de bebedouros, as quais foram submetidas à avaliação microbiológica. A determinação dos coliformes totais e termotolerantes foi realizada por meio da técnica dos tubos múltiplos com 3 diluições e série de 5 tubos. Para a detecção de bactérias heterotróficas uso-se o método "pour plate", de acordo com as normas preconizadas no Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. O isolamento e a identificação dos isolados bacteriano foi realizada no LACEN-RR utilizando-se a série bioquímica. Para a avaliação da resistência aos antimicrobianos, utilizou-se a metodologia de difusão de disco, seguindo as normas estabelecidas pelo CLSI. Das amostras de águas que recebem tratamento completo, 10% apresentaram resultados positivos para coliformes totais e nas amostras de água clorada, 20% apresentaram resultados positivos para coliformes totais e 2,5% resultado positivo para coliformes termotolerantes, o que as tornam imprópria para o consumo humano. A contagem de bactérias heterotróficas variou de $1,4 \times 10$ a $3,6 \times 10^2$ UFC/mL de água, não ultrapassando o estabelecido pela Portaria 518/2004/MS. Foram identificadas as seguintes bactérias Gram-negativas (66,7%): *Acinetobacter* spp., *C. violacea*, *Cocobacilos* spp., *E. aerogenes*, *E. coli*, *K. ozaenae*, *Leptothrix* spp. e Bacilo Gram-negativo não fermentador de glicose, as bactérias Gram-positivas (33,3%), identificadas foram: *B. subtilis*, *Micrococcus* spp., *S. aureus* e *Staphylococcus* spp. Os resultados dos testes de sensibilidade aos antibióticos revelaram que a maioria das bactérias isoladas foi resistente a ampicilina (68,2%), 27,3% apresentaram resistência a oxacilina e 22,7% foram resistentes a eritromicina e meropenem. As cepas de *S. aureus* isoladas das amostras de águas apresentaram maior índice MAR (0,61) entre as bactérias Gram-positivas, enquanto que nas bactérias Gram-negativas, as cepas que apresentaram maior índice MAR foram as cepas de *E. coli*, com índice 0,61. Os resultados comprovam a ocorrência de instabilidade no padrão de qualidade da água fornecida a população de Boa Vista – RR seja no tratamento, na distribuição ou no armazenamento da água. Além de constatar a presença de bactérias multirresistentes a antibióticos, o que representa risco à população.

Palavras-chaves: Qualidade da água. Bactérias heterotróficas. Coliformes. Resistência. Antimicrobianos.

ABSTRACT

One of the main concerns of humanity nowadays is water: its availability and its quality. An inadequate exploitation of the sources results in the contamination of both superficial and deep waters, which become a public health hazard. Bacteria are one of these biological sources of water contamination, responsible for countless diseases which are treated with antimicrobials. The widely spread use of antimicrobials in human medicine along with animal production had resulted in a steady increase in the number of pathogenic and commensal bacteria resistant to antimicrobial agents, which in recent years are becoming one of the main problems of public health. This paper is a result of an interest in studying the quality of water consumed by the students of 20 state schools of the public school system of Boa Vista – RR, as well as trying to obtain a profile of antimicrobial resistance of the bacteria isolated in different water samples collected at these schools. Between October 2010 and April 2011, 40 water samples were collected from taps in lunchrooms, along with 40 samples from drinking wells, and all of them were submitted to microbiological examination. Using the multiple tubes technique, with 3 dilutions and a series of 5 tubes, we determined the total number of coliforms and thermotolerant coliforms. In agreement with the rules of the Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, the “pour plate” method was used at the CBio – UFRR to detect heterotrophic bacteria. Isolation and identification of microorganisms was done at LACEN – RR, using the biochemical series. In evaluating the resistance to antimicrobials, disk diffusion methods were used, in agreement with the established rules of the CLSI. In water samples that receive full treatment, 10% tested positive for total coliforms and, in chlorinated water samples, 20% tested positive for total coliforms and 2,5% for thermo-tolerant coliforms, which makes them inadequate for human consume. The counting of heterotrophic bacteria went from $1,4 \times 10$ to $3,6 \times 10^2$ CFU/mL of water, not surpassing what is established in the ordinance 518/2004/MS. The following Gram-negative bacteria (66,7%) were identified: *Acinetobacter* spp., *C. violacea*, *Cocobacilos* spp., *E. aerogenes*, *E. coli*, *K. ozaenae*, *Leptothrix* ssp. and Gram-negative glucose non fermenting bacillus. The Gram-positive bacteria identified were: *B. subtilis*, *Micrococcus* spp., *S. aureus* and *Staphylococcus* spp. The results of antibiotic sensibility tests revealed that most of the isolated bacteria were resistant to ampicilin (68,2%), 22,3% showed resistance to oxacilin and 22,7% were resistant to both eritromicin and meropenem. In Gram-positive bacteria, the growths of *S. aureus* isolated from water samples showed the greatest MAR index (0,61), while *E. coli* growths were the ones who showed the greatest MAR index in Gram-negative bacteria (also 6,1%). Results prove a great instability in the quality of water provided to the Boa Vista - RR population, being in its treatment, distribution or containment, as well as showing the presence of bacteria resistant to multiple antibiotics, which is a health hazard to the public.

Keywords: Water quality. Heterotrophic bacteria. Coliforms. Resistance. Antimicrobials.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Antibióticos e respectivos mecanismos de resistência nos quais estão envolvidos	27
Figura 2 –	Escolas, localizações e pontos, onde as amostras de água que recebem água com tratamento completo foram coletadas	44
Figura 3 –	Escolas, localizações e pontos, onde as amostras de água que recebem água clorada foram coletadas	44
Figura 4 –	Mapa com a localização das escolas estaduais onde foram realizadas as coletas das amostras de água	46
Figura 5 –	Procedimentos para coleta de amostra de água em torneira ..	47
Figura 6 –	Teste presuntivo: caldo lactosado	48
Figura 7 –	Técnica da fermentação em tubos múltiplos	49
Figura 8 –	Teste confirmativo: caldo EC	50
Figura 9 –	Teste confirmativo: caldo V.B	50
Figura 10 –	Contagem das unidades formadoras de colônias (UFC)	51
Figura 11 –	Ágar MacConkey	52
Figura 12 –	Ágar sangue	52
Figura 13 –	Teste TSI	53
Figura 14 –	Teste da lisina	55
Figura 15 –	Teste do citrato Simmons	55
Figura 16 –	Teste da motilidade	56
Figura 17 –	Teste do indol	56
Figura 18 –	Prova da citocromo-oxidase	57
Figura 19 –	Teste da uréase	58
Figura 20 –	Antibióticos, local de ação de concentrações utilizadas para os antibiogramas	59

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 –	Densidade de coliformes totais, expressa em Número Mais Provável (NMP/100 mL) em amostras de água tratada com cloração, coletadas nas escolas estaduais localizadas em Boa Vista – RR	62
Gráfico 2 –	Densidade de coliformes totais, expressa em Número Mais Provável (NMP/100 mL) em amostras de água com tratamento completo, coletadas nas escolas estaduais localizadas em Boa Vista – RR	64
Gráfico 3 –	Densidade de bactérias heterotróficas presentes em amostras de água tratada com cloração, coletadas nas escolas estaduais localizadas em Boa Vista – RR	65
Gráfico 4 –	Densidade de bactérias heterotróficas presentes em amostras de água tratada com cloração, coletadas nas escolas estaduais localizadas em Boa Vista – RR	66
Gráfico 5 –	Densidade de bactérias heterotróficas presentes em amostras de água com tratamento completo, coletadas nas escolas estaduais localizadas em Boa Vista – RR	67
Gráfico 6 –	Densidade de bactérias heterotróficas presentes em amostras de água com tratamento completo, coletadas nas escolas estaduais localizadas em Boa Vista – RR	68
Gráfico 7 –	Porcentagens de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas isoladas a partir de amostras de águas coletadas nas escolas estaduais localizadas em Boa Vista – RR	72
Gráfico 8 –	Incidência das bactérias Gram-negativas, isoladas a partir de amostras de água, coletadas nas escolas estaduais localizadas em Boa Vista – RR	72
Gráfico 9 –	Incidência das bactérias Gram-positivas, isoladas a partir de amostras de água, coletadas nas escolas estaduais localizadas em Boa Vista – RR	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Resistência das bactérias heterotróficas aos antibióticos testados	78
Tabela 2 –	Índice MAR e porcentagem de padrões de resistência entre bactérias heterotróficas, Gram-positivas, isoladas nas amostras de água, coletadas nas escolas estaduais localizadas em Boa Vista – RR	80
Tabela 3 –	Índice MAR e porcentagem de padrões de resistência entre bactérias heterotróficas, Gram-negativas, isoladas nas amostras de água, coletadas nas escolas estaduais localizadas em Boa Vista – RR	81

LISTA DE SIGLAS

APHA – American Public Health Association
ASM – American Society Microbiology
CAER – Companhia de Água e Esgoto de Roraima
CBio – Centro de Estudos da Biodiversidade
CIM – Concentração inibitória mínima
CETESB – Companhia de Tecnologia e Saneamento
C.L – Caldo lactosado
CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute
C.T.I – Centro de Tratamento Intensivo
C.V.B. – Caldo verde brilhante
DNA – Ácido desoxirribonucleico
EAEC – *Escherichia coli* enteroaderente
E. C. – Caldo *Escherichia coli*
EHEC – *Escherichia coli* enterohemorrágica
EIEC – *Escherichia coli* enteroinvasora
EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EPEC – *Escherichia coli* enteropatogênica
ETEC – *Escherichia coli* enterotoxigênica
IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ITAL – Instituto de Tecnologia de alimentos
ITU – Infecção do trato uniário
LACEN-RR – Laboratório Central de Roraima
MRSA – *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina/oxacilina
MS – Ministério da Saúde
NMP – Número Mais Provável
OF – Oxidação/fermentação
OMS – Organização Mundial da Saúde
OPAS – Organização Pan-Americana de Saúde
PBP – Proteínas ligadora de Penicilina
PCA – Plate Count Agar
pH – Pontencial Hidrogeniônico
RNA – Ácido ribonucléico

SCN – *Staphylococcus* coagulase negativas

TSI – Triple Sugar Iron Agar

UFC – Unidade Formadora de Colônia

UFRR – Universidade Federal de Roraima

UTI – Unidade de terapia intensiva

VISA – *Staphylococcus aureus* com sensibilidade reduzida a vancomicina

VRE – *Enterococcus* vancomicina resistente

WHO – World Health Organization

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	Qualidade da água	14
1.2	Bactérias do grupo coliforme	20
1.3	Bactérias heterotróficas	21
1.4	Microbiota normal do corpo humano	22
1.5	Bactérias patogênicas de interesse médico	22
1.5.1	<i>Enterobacteriaceae</i>	23
1.5.2	<i>Staphylococcus</i>	24
1.6	Antimicrobianos e resistência bacteriana	26
1.7	Métodos e técnicas disponíveis para detecção de micro-organismos	36
1.7.1	Técnica de tubos múltiplos	37
1.7.2	Técnica de presença e ausência	37
1.7.3	Plaqueamento em meio sólido	37
1.7.3.1	Plaqueamento em superfície (“spread plate”)	38
1.7.3.2	Plaqueamento em profundidade (“pour plate”)	38
1.7.4	Técnica de membrana filtrante	39
1.7.5	Métodos rápidos de detecção e identificação de bactérias	39
1.7.5.1	Técnica de substrato cromogênico	40
1.7.6	Provas bioquímicas	40
1.8	Determinação da susceptibilidade aos agentes antimicrobianos	40
2	OBJETIVOS	43
2.1	Objetivo geral	43
2.2	Objetivos específicos	43
3	MATERIAL E MÉTODOS	44
3.1	Área de estudo	44
3.2	Amostragem	45
3.3	Análises bacteriológicas	47
3.3.1	Detecção de coliformes	48
3.3.1.1	Determinação de coliformes totais e termotolerantes	49
3.3.2	Determinação da densidade de indicadores ou N.M.P.	50

3.3.3	Detecção de bactérias heterotróficas	50
3.3.4	Isolamento das bactérias	51
3.3.4.1	Teste do manitol	52
3.3.4.2	Identificação das bactérias Gram-negativas	53
3.4	Avaliação da susceptibilidade aos antimicrobianos	58
3.5	Classificação dos isolados resistentes a múltiplos antimicrobianos (MAR)	60
3.6	Tratamento e análise estatística dos dados	60
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
4.1	Qualidade da água submetida à cloração	61
4.2	Qualidade da água submetida ao tratamento completo	63
4.3	Bactérias heterotróficas isoladas das amostras de água	65
4.4	Caracterização dos isolados	71
4.5	Resistência aos antimicrobianos	78
4.5.1	Resistência das bactérias Gram-positivas aos antimicrobianos	79
4.5.2	Resistência das bactérias Gram-negativas aos antimicrobianos	80
4.5.3	Bactérias multirresistentes aos antimicrobianos.....	81
5	CONCLUSÕES	83
	REFERÊNCIAS	84
	ANEXOS	98

1 INTRODUÇÃO

A água é essencial para a vida e todos os esforços devem ser feitos para garantir sua qualidade, do contrário, a população estará exposta ao risco de doenças. Durante séculos, considerou-se que as fontes de água eram inesgotáveis, porém, o grande crescimento da população mundial, o desenvolvimento industrial e tecnológico, a urbanização e a expansão agrícola comprometem a capacidade de autodepuração das águas. As fontes de contaminação podem ser físicas, químicas e biológicas, tais como: esgotos sem tratamento que são lançados em rios e lagos; aterros sanitários que afetam os lençóis freáticos, os defensivos agrícolas que escoam com a chuva sendo arrastados para os rios e lagos, os garimpos que lançam produtos químicos, como o mercúrio, em rios e córregos e as indústrias que utilizam os rios como carreadores de seus resíduos tóxicos (EMBRAPA, 1994; GLEESON; GRAY, 1997; BOMFIM et al., 2007).

Dentre as fontes biológicas de contaminação da água, destacam-se as bactérias, que podem causar inúmeras doenças que são tratadas com antibióticos. O uso amplo e indiscriminado destes tem levado ao aumento de bactérias multirresistentes, o que vem se tornando um dos principais problemas de saúde pública (SORUM; ABÉE-LUND, 2002; RIVERA-TAPIA, 2003). A presença de cepas bacterianas multirresistentes em águas para consumo humano pode representar riscos à saúde pública. Desta maneira, a circulação de genes de resistência nas águas pode representar um fator de risco para os consumidores. Neste contexto o presente trabalho tem como objetivo caracterizar microbiologicamente amostras de água e testar a sensibilidade das bactérias isoladas aos antibióticos. A importância desse estudo se dá principalmente pelo aumento considerável dos perfis de resistência bacteriana dos agentes causadores de doenças. Fato este constatado na presente pesquisa, desta forma, os resultados obtidos nessa investigação poderá subsidiar as futuras discussões acerca das políticas públicas de saúde do estado.

1.1 Qualidade da água

A água é encontrada em cerca de 70% do planeta, sendo que 97,4% do total são formadas por águas salgadas, 1,8% estão congeladas e 0,8% correspondem às

águas doces (TANCREDI; CERQUEIRA; MARINS, 2002) desta parcela, cerca de 97% se encontra em aquíferos subterrâneos e 3% em superfície (NASCIMENTO et al., 2000).

A água é um recurso natural escasso, indispensável para a vida e o exercício da maioria das atividades econômicas; é insubstituível, não ampliável por mera vontade do homem, irregular em sua forma de apresentação no tempo e no espaço, facilmente vulnerável e suscetível de usos sucessivos. Desta forma, a água constitui recurso unitário, que se renova mediante o ciclo hidrogeológico e que conserva, a efeitos práticos, uma magnitude quase constante dentro de cada uma das bacias hidrográficas (BRASIL, 1985).

Sabe-se que a demanda de água pelo homem cresce constantemente. Como causa deste fenômeno, pode-se mencionar o aumento da população mundial e, em especial, a concentração populacional nas cidades. Assim, a satisfação da demanda de água representa grave problema, pois além do enorme volume consumido e desperdiçado, o produto é restituído na maioria das vezes, ao meio natural, sem qualquer tratamento prévio, sem isenção de risco à saúde e ao próprio ambiente (GERMANO; GERMANO, 2001).

A exploração inadequada das fontes conduz à contaminação das águas superficiais e subterrâneas, que se tornam, assim, um risco permanente para a saúde (CALAZANS et al., 2004). É o que acontece com a poluição e a contaminação provocadas pelos efluentes domésticos, públicos e industriais, lançados diretamente nos cursos de água. A água, portanto, é um problema de segurança nacional e como tal merece a adoção de estratégias direcionadas para cada um de seus aspectos particulares, todos eles de relevância para o desenvolvimento social e econômico dos povos, aí compreendida a saúde pública (GERMANO; GERMANO, 2001).

A água tem influência direta sobre a saúde, sobre a qualidade de vida e sobre o desenvolvimento do ser humano. Para a Organização Mundial da Saúde (OMS) e seus países membros, todas as pessoas, em quaisquer estágios de desenvolvimento e condições sócio-econômicas têm o direito de ter acesso a um suprimento adequado de água potável e seguro. “Seguro”, neste contexto, refere-se a uma oferta de água que não represente risco significativo à saúde, que tenha quantidade suficiente para atender a todas as necessidades domésticas, que seja disponível continuamente e que tenha um custo acessível. Essas condições podem

ser resumidas em cinco palavras-chave: qualidade, quantidade, continuidade, cobertura e custo (OPAS, 2009).

Segundo a OMS, no Brasil morrem 29 pessoas ao dia por doenças decorrentes da qualidade da água e do não tratamento de esgotos e estima-se que cerca de 70% dos leitos dos hospitais estejam ocupados por pessoas que contraíram doenças transmitidas pela água (ARAÚJO JUNIOR, 2009). Os sistemas de saneamento básico adequado e a água tratada podem reduzir em 20% a 80% a incidência de doenças infecciosas, inibindo a sua geração e interrompendo a sua transmissão (UNESCO, 2001; OPAS, 2009).

Em todo o Planeta, é crescente o aumento dos níveis de contaminação da água, provocada pela degradação dos recursos hídricos em razão dos seus usos múltiplos (abastecimento público, irrigação, uso industrial, navegação, recreação e agricultura), embora estas atividades variem de acordo com a organização econômica e social de cada região. No Brasil, o cenário atual é caracterizado pela progressiva contaminação das águas superficiais e subterrâneas em decorrência das deficiências de infraestrutura dos serviços de esgotamento sanitário (MOTA, 1997).

O ambiente aquático, independentemente de sua profundidade, pode servir como habitat para muitos micro-organismos de vida livre e não parasitária que extraem da água os elementos indispensáveis à sua sobrevivência, e por micro-organismos parasitários e/ou patogênicos, que utilizam a água como veículo para transmissão de doenças, podendo contaminar a água, por meio das excretas ou dejetos intestinais do homem e outros animais de sangue quente, constituindo assim um perigo sanitário potencial (MOTA, 1997; SOARES; MAIA, 1999; FREITAS; BRILHANTE; ALMEIDA, 2001; MACÊDO, 2001; CEARÁ, 2004).

As doenças transmitidas ao homem através da água decorrem de sua contaminação por excretas de animais, do próprio homem, ou mesmo da presença de substâncias químicas nocivas à saúde humana (NASCIMENTO et al., 2000). Essa contaminação vem ocorrendo ao longo dos anos, sendo causada pelo crescente desenvolvimento industrial, pelo crescimento demográfico e pela ocupação do solo de forma intensa e acelerada, aumentando consideravelmente o risco de doenças de transmissão hídrica (GUILHERME; SILVA; OTTO, 2000).

A qualidade da água que é consumida pela população depende de diversos fatores tais como: a seleção e proteção eficaz e permanente das origens da água; o tratamento adequado da água; a correta concepção, construção e exploração dos sistemas de distribuição; a manutenção das redes de tubagens e dos reservatórios de armazenamento; o diagnóstico periódico e sistemático da qualidade da água que é distribuída aos consumidores e a realização de ações corretivas que o diagnóstico evidencie como necessárias (PETGNAT et al., 2006).

Segundo Arcuri, 2000 o controle da qualidade da água para consumo humano constitui uma preocupação dominante para muitas entidades gestoras de sistemas de abastecimento de água de todo o mundo. Para que se atinja o objetivo de controlar a qualidade da água distribuída, é necessário utilizar procedimentos de rastreio eficientes e economicamente viáveis.

De acordo com Chaves (2004), o modo mais eficiente de diagnosticar a qualidade pretendida da água, é medir sistematicamente as concentrações dos seus parâmetros. Para isso deve-se proceder à realização de análises físicas, químicas e microbiológicas da água, com uma frequência adequada, em todo o sistema de abastecimento, desde a origem até a distribuição, incluindo todas as etapas do tratamento. Esses parâmetros são indicadores da qualidade da água e constituem impurezas quando alcançam valores superiores aos estabelecidos para determinados usos (MOTA, 1997).

As bactérias patogênicas encontradas na água são principalmente as pertencentes aos gêneros *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio*, *Yersinia*, *Campylobacter* e *Escherichia* (SILVA; JUNQUEIRA; SILVEIRA, 1997). Algumas espécies como *Escherichia coli* e outras relacionadas com os coliformes, como *Enterococcus* e *Clostridium perfringens*, são habitantes normais do intestino grosso do homem e animais, estando presente na matéria fecal (SOARES; MAIA, 1999).

A avaliação da presença de organismos patogênicos na água é determinada pela presença ou ausência de um organismo indicador e sua respectiva população. O isolamento e a identificação de cada tipo de micro-organismo exige uma metodologia diferente e a ausência ou presença de um patógeno não exclui a presença de outros (LEITÃO et al., 1988).

De acordo com Franco e Landgraf (2004), indicadores microbianos são grupos ou espécies de micro-organismos que, quando presentes em um alimento, podem fornecer informações sobre a ocorrência de contaminação, acerca da

possível presença de patógenos ou a respeito da deterioração potencial do alimento, além de poderem indicar condições sanitárias inadequadas durante o processamento, produção ou armazenamento.

Os micro-organismos indicadores são mais comumente utilizados para avaliar a segurança e a higiene alimentar do que a qualidade (FORSYTHE, 2002). Segundo Forsythe (2002) e Franco e Landgraf (2004), para um indicador da qualidade da água ser considerado ideal é importante observar algumas características, tais como, ser aplicável a todos os tipos de água, ter uma população mais numerosa no ambiente que os patógenos, sobreviver melhor que os possíveis patógenos e ser detectado por uma metodologia simples e barata. O indicador ideal de contaminação fecal deveria preencher, além dos requisitos anteriormente citados, os seguintes: ter como habitat natural apenas o trato intestinal humano ou de outros animais homeotérmicos, não se multiplicando facilmente fora deste ambiente, ser detectável de forma fácil e rápida, estar presente em água poluída e ausente em água potável, estar presente na água quando os micro-organismos patogênicos também estão, sobreviver mais tempo na água do que os patógenos, apresentar baixa patogenicidade e estar presente em maior número do que os patogênicos.

Os organismos do grupo coliforme são bons indicadores microbianos da qualidade da água potável em razão, principalmente, da facilidade de detecção e contagem (WENDPAP; DAMBROS; LOPES, 1999). A Portaria nº 518/2004/MS, estabelece a determinação da presença de coliformes totais e termotolerantes (*E. coli*) e a contagem de bactérias heterotróficas em 20% das amostras mensais de água tratada, no sistema de distribuição, não devendo essa contagem exceder 500 UFC/mL (BRASIL, 2004).

Segundo van der Wende e Characklis, 1990, em águas para consumo humano os grupos de micro-organismos potencialmente patogênicos encontram-se presentes em pequenas quantidades. No entanto, podem surgir variações súbitas dos seus valores em decorrência de diversas causas: atravessamento, quando o aumento do número de bactérias na rede de distribuição resulta de bactérias viáveis que conseguiram atravessar o processo de desinfecção e tratamento; crescimento, quando o aumento do número de bactérias no sistema se deve à proliferação de bactérias à jusante do processo de desinfecção, que pode ocorrer tanto em biofilmes (crescimento nas superfícies) como na fase líquida; retrocontaminação, aumento da

quantidade de micro-organismos pela entrada destes em pontos de saída de água e posterior progressão em sentido contrário do movimento da água circulante.

A ocorrência de episódios de contaminação da água para consumo deve-se cada vez menos ao atravessamento ou a retrocontaminação ou qualquer outra fonte de contaminação externa, uma vez que os sistemas de tratamento e distribuição são cada vez mais eficientes. Assim, o crescimento microbiano, principalmente o crescimento sob a forma de biofilmes, assume um papel primordial nas alterações súbitas da qualidade da água nos sistemas de distribuição de água potável, resultante da erosão e do desprendimento de porções do biofilme para a água circulante, influenciando diretamente a qualidade da água (PETGNAT et al., 2006).

Segundo Chaves, 2004, a definição mais usual de biofilme é a de uma matriz polimérica de aspecto gelatinoso, aderida a uma superfície sólida, quase sempre imersa em meio líquido, constituída essencialmente por micro-organismos, pelas substâncias poliméricas extracelulares que estes excretam e por água. As células microbianas aderem firmemente a quase todas as superfícies imersas em solução aquosa. Estas células aderidas crescem, reproduzem-se e produzem substâncias poliméricas extracelulares, que se estendem para além da superfície das células, formando um emaranhado polimérico que envolve toda a biomassa aderida, assumindo o conjunto a designação de biofilme (CHARACKLIS; WILDERER, 1989).

Os biofilmes desempenham um papel importante na natureza e em processos tecnológicos. Do ponto de vista do interesse do Homem podem ser benéficos ou prejudiciais, donde resulta a necessidade do seu estudo para poder desenvolver estratégias no sentido de melhorar as suas características, caso ele seja benéfico, ou para eliminá-lo ou inibir a sua formação, quando a sua ação é prejudicial (CHAVES, 2004).

Como exemplos de biofilmes benéficos temos aqueles que se acumulam em ambientes naturais nos depósitos dos rios, lagos ou ambientes marinhos, e que se desenvolvem em associação com as raízes de algumas plantas fornecendo-lhes alguns nutrientes. São também biofilmes benéficos aqueles que são utilizados em biotecnologia ambiental com grande sucesso no tratamento de efluentes, removendo poluentes orgânicos e inorgânicos de águas contaminadas. Na indústria alimentar os biofilmes apresentam inúmeras vantagens, podendo ser utilizados na produção de alimentos fermentados, como por exemplo, a produção de vinagre (ARCURI, 2000).

Infelizmente, nem sempre as potencialidades dos biofilmes constituem vantagens para o Homem. Na maioria das situações, a adesão de micro-organismos a superfícies sólidas é indesejável, pois, de uma maneira geral, está associada à deterioração das superfícies e/ou ambiente circundante. Nas ciências médicas, os biofilmes apresentam-se geralmente com um caráter nocivo uma vez que estão associados a um grande número de problemas de saúde, tais como infecções em tecidos, infecções do trato urinário, infecções e consequente rejeição de próteses e implantes e infecções da placa dentária (NEU; van der MEI; BUSSCHER, 1992; WILCOX, 1993). Nos sistemas de distribuição de água potável, a formação de biofilme, e principalmente o seu desprendimento, constitui um fator de diminuição da qualidade da água (LECHEVALLIER; MCFETERS, 1985).

1.2 Bactérias do grupo coliforme

O grupo dos coliformes totais é formado por diversas bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, incluindo os gêneros *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Escherichia* (SILVA JR., 2002). Os quais, com exceção do gênero *Citrobacter*, constituem o grupo dos coliformes termotolerantes, importante grupo indicador de contaminação fecal na água (SILVA; JUNQUEIRA; SILVEIRA, 1997).

Os coliformes totais são bacilos Gram-negativos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, não formadores de esporos. Sua identificação se baseia na capacidade de fermentação de lactose, com formação de gás, após incubação por 24 a 48 horas, entre 35°C e 37°C (FRANCO; LANDGRAF, 1999; FORSYTHE, 2002; SILVA JR., 2002; BRASIL, 2004). A utilização dos coliformes totais como indicadores de contaminação fecal não é possível, uma vez que bactérias dos gêneros *Citrobacter*, *Enterobacter* e *Klebsiella* podem ser também encontradas no solo e em vegetais (FRANCO; LANDGRAF, 1999).

Os coliformes termotolerantes, antes denominados coliformes fecais, formam um subgrupo dos coliformes totais, caracterizado pelas bactérias que mantêm a capacidade de fermentar lactose, ainda com produção de gás, em temperatura entre 44°C e 45,5°C (FRANCO; LANDGRAF, 1999; FORSYTHE, 2002).

A espécie bacteriana *E. coli* tem como habitat primário o trato intestinal do homem e demais animais homeotérmicos, estando sempre presente nas fezes

desses seres, por esse motivo, tem sido utilizada como indicador de contaminação fecal.

Existem várias críticas e algumas desvantagens apontadas sobre o uso de coliformes como indicadores de poluição fecal, particularmente o fato de sua pouca tolerância à toxidade da água do mar e ao procedimento de cloração em relação a alguns patógenos mais resistentes. Nenhum indicador é perfeito e aqueles destinados a determinar a contaminação fecal certamente não funcionam adequadamente como indicadores de poluição de outras origens. Assim, a utilização dos coliformes e de outros indicadores fecais devem ser complementada com a utilização de indicadores adicionais que compensem a ineficiência destes no monitoramento de poluição diversificada. Desta forma, a legislação brasileira recomenda que se utilizem as bactérias heterotróficas (mesófilas) e *Pseudomonas aeruginosa* (MACÊDO, 2001), como indicadores complementares.

1.3 Bactérias heterotróficas

O termo bactéria heterotrófica engloba todas as bactérias que usam nutrientes orgânicos para crescimento. Essas bactérias estão universalmente presentes em todos os tipos de água, em alimentos, solo, vegetação e ar (ALLEN; REASONER, 2004). Para a contagem desses micro-organismos em água, são utilizadas as técnicas de contagem padrão em placas e contagem total em placas (WHO, 2003).

A presença de elevados números de bactérias heterotróficas em águas envasadas pode ser decorrente da microbiota natural da fonte. Estas bactérias podem se multiplicar após o envase, resultando em elevadas contagens. A ausência de um desinfetante residual, como o cloro, e períodos longos de armazenamento à temperatura ambiente, ou mais alta, podem resultar na elevação do número dessas bactérias até o consumo (LI; LACROIX; POWELL, 2001).

Vários gêneros de bactérias heterotróficas têm sido encontrados em água envasada, incluindo *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Caulobacter*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium* e *Pseudomonas* (MANAIA et al., 1990). Algumas destas bactérias heterotróficas produzem fatores de

virulência e podem agir como patógenos oportunistas (PAVLOV; GRABOW; EHLERS, 2004).

Estudos com água de torneira, filtrada e não filtrada, mostraram associação entre contagens elevadas de bactérias heterotróficas e gastroenterites (PAYMENT et al., 1991). Os indivíduos que são especialmente suscetíveis a infecções por bactérias heterotróficas são aqueles de pouca idade, os imunologicamente debilitados, os idosos, os transplantados, as gestantes, os portadores de doenças imunossupressoras, como a AIDS, além de pessoas submetidas à quimioterapia (EHLERS; PAVLOV; MÜLLER, 2004).

1.4 Microbiota normal do corpo humano

Para Couto, Pedrosa e Nogueira (1999), toda a variedade de micro-organismos encontrados no corpo humano em qualquer sítio anatômico é denominada microbiota normal. Algumas bactérias são encontradas regularmente em locais anatômicos particulares, outras estão presentes só ocasionalmente ou somente em alguns momentos da vida do hospedeiro.

Embora vários micro-organismos sejam constituintes da microbiota normal do corpo humano, alguns causam doenças ao homem e são os principais responsáveis pelas infecções nosocomiais, sendo considerados micro-organismos de interesse médico pela Comissão de Controle de Infecção Hospitalar. Souza (2003) concluiu que os estudos a respeito da microbiologia de agentes patogênicos humanos em ambientes naturais foram ampliados, porém mesmo assim, é mais conhecido o comportamento destes micro-organismos em seu ambiente específico, ou seja, no corpo humano.

1.5 Bactérias patogênicas de interesse médico

De acordo com Couto, Pedrosa e Nogueira (1999), os microbiologistas classificam como micro-organismos patogênicos aqueles que causam doenças podendo ser patógenos primários, secundários ou oportunistas. Os patógenos primários são aqueles micro-organismos que, possuindo características peculiares, são capazes por si próprios, independentemente de fatores do hospedeiro, de

provocar doenças infecciosas. Geralmente, são causadores de infecções comunitárias e raramente causam infecções hospitalares. Os patógenos secundários desenvolvem suas potencialidades patogênicas quando há um desequilíbrio na relação parasito-hospedeiro, principalmente em casos de imunoresistência do hospedeiro.

Segundo Silva (1999), as infecções podem ser causadas por bactérias, fungos, vírus ou parasitas, podendo ser endógenas ou exógenas. Nas infecções endógenas, o micro-organismo é um componente da microbiota normal do paciente. As infecções endógenas podem ocorrer quando o micro-organismo é aspirado do trato respiratório superior para o inferior ou quando ele penetra na pele ou mucosas traumatizadas ou após processos cirúrgicos. Por outro lado, nas infecções exógenas, o micro-organismo é adquirido a partir do meio ambiente, como por exemplo, do solo, da água, do ar, de objetos, de picada de insetos, etc., ou a partir de outra pessoa ou animal.

1.5.1 *Enterobacteriaceae*

Enterobactérias são bastonetes gram-negativos, aeróbios em sua maioria, que constituem os principais componentes da flora intestinal humana normal, sendo relativamente incomuns em outros locais do organismo humano (MURRAY et al, 1992). As bactérias Gram-negativas possuem duas membranas – uma membrana externa e uma interna (citoplasmática). A membrana externa das bactérias Gram-negativas evita que certos fármacos e antibióticos penetrem na célula, o que explica parcialmente a razão por que são habitualmente mais resistentes aos antibióticos do que as bactérias Gram-positivas. A membrana externa das bactérias Gram-negativas é rica numa molécula chamada lipopolissacarídeo. Se uma bactéria Gram-negativa entra na corrente sanguínea, os lipopolissacarídeos podem desencadear uma grande quantidade de sintomas, incluindo febre alta e uma descida acentuada da tensão arterial. Por essa razão os lipopolissacarídeos são conhecidos frequentemente pelo nome de endotoxinas (MERCK, 2010). As espécies de enterobactérias causadoras de infecções hospitalares incluem *E. coli*, *Klebsiella* sp., *Proteus* sp., *Enterobacter* sp. e *Serratia marcescens*, representando 80% de todos os bastonetes Gram-negativos e 50% de todas as bacteremias clinicamente

significativas isoladas nos laboratórios de microbiologia. A espécie *E. coli* destaca-se como responsável pela maioria das infecções produzidas por este grupo de bactérias, principalmente infecções urinárias (MERCK, 2010).

E. coli é um bacilo Gram-negativo, anaeróbio facultativo, possui exigências nutricionais simples, fermenta a glicose e é oxidase negativa. É encontrada no solo, na água e na microbiota de quase todos os animais de sangue quente, incluindo os seres humanos. Tem sido isolada de diversos sítios do corpo humano, podendo causar patologias como pneumonias, meningites e infecções intestinais. Como parte da microbiota humana, esse micro-organismo tem papel importante na contaminação fecal dos alimentos. Algumas cepas patogênicas da *E. coli* podem produzir uma potente endotoxina, a qual é capaz de causar diarreias severas em todos os grupos etários. O tratamento destes pacientes infectados com antimicrobianos é obrigatório, pois caso contrário, a infecção pode levar-los à morte (MERCK, 2010).

As cepas de *E. coli* que causam diarreia são atualmente classificadas em cinco grupos: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), enterotoxigênica (ETEC), enteroinvasora (EIEC), enterohemorrágica (EHEC) e enteroaderente (EAEC). Não há um teste bioquímico específico que as diferencie das *E. coli* presentes em amostras fecais normais e devem, portanto, ser diferenciadas através de provas sorológicas, com a caracterização dos antígenos somáticos O e flagelar H das mesmas (SILVA, 1999). Vale ressaltar que a presença de *E. coli* em amostras de água, solo, alimento e demais amostras ambientais indica poluição fecal (SILVA; JUNQUEIRA; SILVEIRA, 1997).

1.5.2 *Staphylococcus*

As bactérias pertencentes ao gênero *Staphylococcus* são patógenos humanos amplamente distribuídos na natureza e fazem parte da microbiota normal da pele e mucosas de mamíferos e aves. Atualmente, o gênero *Staphylococcus* é composto por 27 espécies, sendo frequentemente associadas a uma variedade de infecções de caráter oportunista em seres humanos e animais. Entre elas, destacam-se, em patologia humana, as espécies *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus* e *S. haemolyticus* (MURRAY et al., 1992).

Tradicionalmente, os estafilococos são divididos em duas categorias com base na sua habilidade de coagular o plasma (reação de coagulase) - estafilococos coagulase positivos e coagulase negativos. Entre os coagulase positivos, o *S. aureus* representa a espécie geralmente envolvida em infecções humanas, tanto de origem comunitária quanto hospitalar. As espécies coagulase negativas, denominadas como SCN, são hoje também consideradas como importantes causadoras de infecção, particularmente no ambiente hospitalar, em pacientes com as defesas orgânicas comprometidas ou portadores de corpos estranhos, tais como próteses, cateteres e enxertos sintéticos. Praticamente quase todas as pessoas possuem estafilococos coagulase-negativa em sua superfície cutânea (SILVA, 1999).

As bactérias Gram-positivas possuem parede celular composta por múltiplas camadas de peptidoglicano, ácido teicóico, apresentam estrutura flagelar, produzem toxinas, principalmente exotoxinas, são resistentes à ruptura física e também ruptura da parede celular por lisozimas, são altamente sensíveis à penicilina e às sulfonamidas, apresentam sensibilidade a detergentes aniônicos e resistência à azida sódica e ao ressecamento. Dentre as espécies de bactérias Gram-positivas mais importantes que podem causar danos patológicos está *S. aureus*. Embora encontrada com relativa frequência como membro da microbiota normal do corpo humano, *S. aureus* é uma das bactérias patogênicas mais importantes, uma vez que atua como agente de uma ampla gama de infecções, variando desde aquelas localizadas, geralmente superficiais, até algumas disseminadas, com elevada gravidade. Em geral, as doenças causadas por essa bactéria podem ser classificadas como somente superficiais invasivas ou tóxicas, ou ainda apresentar características mistas, tóxicas e invasivas. Sua importância clínica tem variado ao longo dos anos, tendo crescido particularmente devido ao aumento na ocorrência de infecções hospitalares graves causadas por amostras multirresistentes (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

S. aureus, coagulase-positivo, são cocos Gram-positivos que formam grupos de cocos em forma de cachos. São catalase positivos e são suscetíveis à elevada temperatura, assim como a desinfetantes e soluções anti-sépticas. São encontrados na orofaringe, trato gastrointestinal e trato urogenital sendo transportados na superfície cutânea e na nasofaringe (BROOKS et al., 2009).

S. aureus pode causar doenças devido à produção de toxinas, pela invasão direta ou por destruição do tecido. É o agente mais comum de infecções piogênicas que podem se localizar na superfície da pele formando pus ou em regiões mais profundas. As infecções da pele recebem diferentes designações, tais como: foliculite, furúnculos, carbúnculos, conjuntivites, impetigo, síndrome da pele escaldada, de acordo com a localização e outras características. As infecções profundas são de caráter mais grave e ocorrem particularmente em indivíduos debilitados devido a doenças crônicas, ferimentos traumáticos, queimaduras ou imunocomprometidos. Estas infecções incluem pneumonias, abscessos profundos, osteomielites, endocardites, flebites, mastites, meningite e artrite bacteriana. Causa também, intoxicação alimentar devido à ingestão de alimento contaminado pelas toxinas estafilocócicas A, B, C, D, E, sendo a enterotoxina A mais associada à intoxicação alimentar (MARTINS, 2001).

A transferência de *S. aureus* para um indivíduo suscetível pode ocorrer através de contato direto, através de fômites a exemplo de objetos como maçaneta de portas, que podem por sua vez, tornar-se uma fonte de infecção ou através da ingestão de alimentos contaminados. Desta forma, por ser comumente encontrado na flora humana e ser o agente principal das infecções estafilocócicas, uma das formas de evitar sua transferência para os alimentos, paciente ou entre os pacientes, e prevenção da infecção é a adoção do simples hábito de lavar adequadamente as mãos antes de manipular os alimentos e antes e após o atendimento aos pacientes (HARVEY, CHAMPE; FISHER, 2008).

1.6 Antimicrobianos e resistência bacteriana

Segundo Martins (2001), embora o uso de substâncias químicas no tratamento de doenças infecciosas seja tão antigo quanto a humanidade, somente a partir do século XVI, com o desenvolvimento da alquimia, as drogas medicinais passaram a ser obtidas através de laboratórios.

O desenvolvimento dos antimicrobianos foi um dos maiores feitos da ciência nos últimos 70 anos. A partir de 1935 com a identificação das atividades antibacteriana das sulfas e, em 1940 com as penicilinas, os antimicrobianos vêm

sendo utilizados para o tratamento de infecções contribuindo significativamente para a redução da morbidade e mortalidade (CRAIG, 2004; FUCHS, 2004).

De acordo com Funchs (2004), os antimicrobianos são substâncias que provocam morte ou inibição do crescimento microbiano. Classificam-se em antibacterianos, antifúngicos, antiprotozoários, anti-helmínticos e antivirais. Quanto à origem, são divididos em antibióticos, produzidos por micro-organismos (bactérias e fungos) e quimioterápicos sintetizados em laboratórios (parcial ou totalmente). A denominação antibiótico prevalece na prática clínica, independentemente da origem natural ou sintética.

Os antimicrobianos podem atuar de diversas maneiras, interferindo em processos metabólicos ou em estruturas do micro-organismo. O mecanismo de ação é exercido essencialmente por interferência na síntese da proteína celular, alterações na permeabilidade da membrana citoplasmática, interferência na replicação do cromossomo e interferência na síntese protéica (TENOVER, 2006).

Na figura 1, estão relacionados os antibióticos e respectivos mecanismos de resistência nos quais estão envolvidos.

Figura 1: Antibióticos e mecanismos de resistências envolvidos.

Antibióticos	Mecanismo de resistência envolvido
Betalactâmicos: penicilinas, cefalosporinas, carbapênicos Aminoglicosídeos Cloranfenicol	Inativação enzimática
Betalactâmicos (proteínas ligadoras de penicilinas) Aminoglicosídeos (proteínas ribossômicas) Quinolonas (DNA girase) Macrolídeos (RNA ribossômico)	Alteração do sítio de ação
Aminoglicosídeos Quinolonas Betalactâmicos Cloranfenicol	Diminuição da permeabilidade
Quinolonas Tetraciclínas	Promoção de efluxo

Fonte: Adaptado de Martins (2001).

A parede celular é responsável pela forma e rigidez à célula bacteriana. Ela serve como uma barreira osmótica permite que as bactérias retenham nutrientes, proteínas essenciais e ácidos nucleicos no seu interior e mantenham certas moléculas em seu exterior. A membrana externa tem constituição diferente conforme a bactéria seja Gram-negativa ou Gram-positiva. Entretanto, todas têm uma camada em comum, o peptidoglicano (KOCH, 2003). Nas bactérias Gram-positivas, esse mucopeptideo compreende 60% da parede celular, sendo o restante constituído de ácidos teóicos, ribonucleato de magnésio e carboidratos. Já nas Gram-negativas, ele constitui 10% da parede, formando, então, uma camada basal sobre a qual se situa uma camada externa composta por lipopolissacarídeos, fosfolipídeos e proteínas (OPAL; COHEN, 1999).

Segundo Fourgeaud; Mainardi; Morel (2002), a síntese do peptidoglicano ocorre em três etapas: a primeira ocorre no citoplasma bacteriano e resulta na formação de um derivado do ácido N-acetilmurâmico, o ácido uridinodifosfato-N-acetilmurâmico. Na segunda etapa da síntese da parede celular ocorre a formação de um composto derivado do ácido N-acetilmurâmico com um pentapeptídeo, que será transportado por um fosfolipídeo para fora da membrana citoplasmática, juntamente com moléculas de N-acetilglicosamina. No meio externo ocorrerá a terceira etapa com as reações de transglicosilação e transpeptidação.

Proteínas ligadoras de penicilina ou PBPs (*Penicillin-Binding Proteins*) são proteínas situadas na face externa da membrana citoplasmática, que têm atividade enzimática de transglicosidases, transpeptidases, carboxipeptidases e endopeptidases, e participam na terceira etapa da biossíntese das novas moléculas de peptidoglicano (MAZZEI; PERITI, 1999). Estas PBPs são os principais alvos dos antibióticos beta-lactâmicos (penicilinas, cefalosforinas, carbapenêmicos e monobactâmicos), os quais inibem sua ação e, conseqüentemente, a formação do peptidoglicano havendo lise osmótica (SINGH, 2004).

A membrana citoplasmática ou membrana interna, como também é chamada, se localiza abaixo da parede celular, envolvendo o citoplasma onde se encontram as organelas essenciais para as funções vitais do micro-organismo. Sua constituição é a mesma para bactérias Gram-positivas e negativas. Cerca de 66% de sua constituição são proteínas e 33% são lipídeos, principalmente fosfolipídeos. Ela possui permeabilidade seletiva que controla a passagem de soluções para dentro e fora da célula e também apresenta um sistema enzimático de transporte ativo. É

onde ocorre a síntese de ATP por oxidação fosforilativa e onde estão as enzimas envolvidas na síntese do peptidoglicano (YAO; MOELLERING, 2007).

Alterações físico-químicas da membrana citoplasmática levam à morte bacteriana, pois a permeabilidade seletiva é rompida, havendo a saída de elementos vitais à célula, como fosfato, íons, purinas e ácidos nucleicos, ou entrada de substâncias nocivas ao metabolismo bacteriano. Além disso, a morte celular pode ocorrer por alterações do sistema respiratório da célula. Existem antibióticos que se ligam aos constituintes normais da membrana provocando desordem funcional. Estes são os mecanismos de ação das polimixinas e tirotricina (YAO; MOELLERING, 2007).

Quando as duas fitas da dupla hélice de DNA (ácido desoxirribonucléico) são separadas, cada uma pode servir como um molde para síntese de uma nova fita complementar, produzindo duas novas fitas idênticas com orientação antiparalela. Este processo é chamado replicação e é feito por polimerases. Na replicação, ocorrem dois fenômenos físicos: a desnaturação e a renaturação da dupla fita, ou seja, fusão da dupla fita realizada principalmente pela topoisomerase, e reanelamento formando uma nova fita (STILLMAN; WAGA, 1998). Antibióticos que têm como mecanismo de ação interferir na replicação do DNA atuam, na grande maioria das vezes, ligando-se à topoisomerase, como no caso das quinolonas e do ácido nalidíxico (COZZARELLI; HARDY, 2003).

Segundo Hentze; Sachs; Sarnow (1997), a síntese protéica é um processo metabólico, feito a partir de genes cromossomais que envolve três fases: a iniciação, a extensão e a terminação (NOLLER, 1984). A iniciação envolve a reação que precede a ligação entre o primeiro e o segundo aminoácido que irão formar a proteína. Ocorre então, a ligação do ribossomo à sequência que precede a região codificadora do ácido ribonucléico mensageiro (mRNA) formando um complexo que contem o primeiro aminoacil RNA transportador (tRNA). A molécula de mRNA possui códons, que são sequências específicas formadas por três bases. O tRNA possui anticódons que se ligam aos códons do mRNA. Os códons especificam a inserção na cadeia peptídica em formação do aminoácido transportador pelo tRNA.

A extensão envolve todas as reações com adição de aminoácidos à extremidade carboxila da cadeia polipeptídica em formação. Durante esta etapa, os ribossomos movem-se do 5'terminal ao 3'terminal do mRNA que está sendo traduzido. Este processo chama-se translocação. A formação das ligações

peptídicas é catalizada pela peptidiltransferase. A terminação é feita por um códon de terminação e é seguida respectivamente pela liberação da proteína sintetizada e pela dissociação do ribossomo e do mRNA (HENTZE; SACHS; SARNOW, 1997).

De acordo com Moellering; Yao (2007), a síntese protéica pode sofrer interferência em várias fases, como na formação dos RNA (RNA mensageiro, RNA ribossomal e RNA de transporte), na fixação do mRNA ou do tRNA ao ribossomo. A interferência na síntese dos RNA é observada com as rifampicinas, que se ligam de maneira irreversível à RNA polimerase. Já o cloranfenicol atua ligando-se à fração 30S do ribossomo, impedindo a ligação do tRNA, inibindo a ação da peptidiltransferase. As lincosaminas (clindamicina e lincomicina) atuam da mesma maneira que o cloranfenicol e o tiamfenicol, porém ligam-se à porção 50S. As tetraciclinas ligam-se à fração 30S impedindo a ligação do tRNA e consequentemente o aporte de aminoácidos. Os macrolídeos ligam-se também a porção 50S inibindo a translocação do tRNA e bloqueando a união dos aminoácidos na formação da cadeia peptídica.

Com a descoberta das penicilinas e sua utilização no tratamento das infecções acreditou-se que as doenças infecciosas deixariam de ser um problema na prática médica. Pouco tempo após o início da sua utilização, em 1946, cerca de 5% dos *Staphylococcus aureus* isolados de pacientes ou portadores eram resistentes à penicilina. Em 1949, esta resistência podia ser notada em 29% dos estafilococos isolados em hospitais, em 1950, atingia 50% e, em 1959, era cerca de 80% em hospitais americanos (BAUER; KIRBY, 1960).

Outros antibióticos foram sendo sintetizados, mas sempre surgiam bactérias que apresentavam resistência aos novos medicamentos. Através de mecanismos de troca genética, muitas bactérias tornam-se resistentes a várias classes de antimicrobianos. E emergência de cepas de bactérias multirresistentes é consequência natural da pressão seletiva resultante do uso dos antimicrobianos, sendo um problema cada vez mais preocupante (WHITE et al., 2000; FRIDKIN et al., 2002; PATRICK et al., 2004; RUTTIMANN et al., 2004).

Uma bactéria é considerada resistente a um determinado antimicrobiano quando a concentração inibitória mínima definida *in vitro* não pode ser obtida no plasma do paciente (TAVARES, 2002; FUCHS, 2004). Já o conceito de bactéria multirresistente não é unânime. Segundo as diretrizes do CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*), a definição de multirresistência é arbitrária, dependendo

das necessidades e perfil de sensibilidade de cada instituição (SHLAES et al., 1997). Um critério comumente utilizado é a resistência a dois ou mais fármacos de classes distintas, para os quais as bactérias são originalmente sensíveis (COUTO, 2003).

A resistência das bactérias aos antimicrobianos de primeira escolha tem aumentado consideravelmente. São exemplos de bactérias multirresistentes a *Klebsiella* spp e *Escherichia coli* produtora de beta-lactamase de espectro estendido ou que apresentam resistência às cefalosporinas de terceira geração, *Staphylococcus aureus* metilicina resistente (MRSA), *Enterococcus* spp resistentes à vancomicina, *Acinetobacter* spp sensível à carbapenêmicos (SEGAL-MAURER; URBAN; RAHAL, 1996; HARBARTH et al, 2001). *Pseudomonas* spp resistentes à aminoglicosídeos, carbapenêmicos e/ou cefalosporinas (HARBARTH et al, 2001) e *Enterobacter* spp resistentes à beta-lactamases de espectro estendido (CONLY, 2002).

Muitos mecanismos de resistência bacteriana têm sido descritos na literatura (MUTO et al, 2003). Algumas espécies bacterianas são consideradas naturalmente resistentes a uma ou mais classes de agentes antimicrobianos, normalmente porque elas não possuem o alvo molecular para ação do fármaco ou então são impermeáveis a ele, resistência primária (TENOVER, 2006; LIM; WEBB, 2005) e somente concentrações excessivamente altas exerceriam efeito sobre elas. Nesses casos, a tendência é que todas as espécies sejam resistentes a todos os antimicrobianos daquela classe (TENOVER, 2006). A resistência fisiológica ocorre em condições especiais de crescimento bacteriano, como os biofilmes, pela adesão das bactérias nas superfícies, dificultando a penetração dos antimicrobianos e originando ambiente para as trocas genéticas entre as bactérias (FUCHS, 2004). Por outro lado, a resistência adquirida ocorre através de mutação ou através da aquisição de novo material genético transportado por elementos móveis tais como plasmídeos e transposons (LIM; WEBB, 2005). A resistência adquirida (secundária) pode resultar do uso continuado de antimicrobianos, onde as bactérias que inicialmente eram sensíveis a um determinado antimicrobiano tornam-se resistentes através de mutação ou transferência horizontal de material genético (SHLAES et al, 1997; FUCHS, 2004; TENOVER, 2006).

Os mecanismos de resistência adquirida são variados e incluem alteração nos receptores dos fármacos, redução da permeabilidade da membrana celular, eliminação do fármaco por bomba de efluxo e inativação de fármacos (CRAIG, 2004;

LIM; WEBB, 2005). Estes mecanismos geralmente agem sinergicamente para produzir um fenótipo resistente quando somente um mecanismo simples não seria suficiente. Além disso, pressão seletiva pode resultar no agrupamento de diversos genes resistentes em um único pacote de material genético permutável. Isso é especialmente comum em organismos Gram-negativos resistentes (LIM; WEBB, 2005).

Segundo, Lim; Webb (2005), a resistência aos antimicrobianos por alterações no seu receptor geralmente é adquirida por mutação cromossômica, sendo pouco frequente a participação de plasmídeos, tanto entre bactérias Gram-positivas quanto nas Gram-negativas. Este mecanismo inclui qualquer modificação do alvo do antimicrobiano causando afinidade reduzida para o fármaco, ou a troca de alvo por outro caminho.

A resistência aos antibióticos beta-lactâmicos observada em cepas de *Enterococcus* spp e *Streptococcus* spp pode ser devida à diminuição da afinidade destes antibióticos pelas proteínas ligadoras de penicilinas (PBPs), sitio natural de ação dos beta-lactâmicos (JACOBY, 1999). Também pode haver produção de uma PBP adicional com pequena afinidade de ligação aos antibióticos, como observado, por exemplo, em cepas de *Staphylococcus aureus* metilina resistente e *Staphylococcus coagulase* negativa nos quais ocorre o surgimento de uma nova PBP-2, a PBP-2' ou PBP-2a, que substitui a ação das PBPs-1, 2 e 3 (ARCHER; CLIMO, 1994; HIRAMATSU, 2001).

A resistência às fluoroquinolonas resulta de mutação em genes cromossômicos, não sendo conhecida resistência mediada por plasmídeos. Em consequência, formam-se DNA girase modificadas, seja em sua subunidade A ou na subunidade B, ou alterações nas subunidades ParC e ParE das topoisomerasas IV, às quais não mais se ligam aos antimicrobianos ativos (CHAMBERS, 1997).

A substituição dos receptores alvos do antimicrobiano por um caminho alternativo é melhor ilustrada pelo ERV, onde um novo substrato para a síntese da parede celular (D-alanina e D-lactato) é usado, não sendo afetado pela vancomicina (CETINKAYA; FALK; MAYHALL, 2000).

A redução da permeabilidade da membrana celular geralmente acontece sinergicamente com outros mecanismos, como a inativação de fármacos, para produzir resistência clínica quando nenhum dos dois individualmente poderia fazê-lo (LIM; WEBB, 2005). O mecanismo que influencia a penetração dos antibióticos do

meio externo para o meio intracelular relaciona-se à existência de porinas nas membranas, ao tamanho das moléculas do antibiótico e à sua hidrofília, de tal maneira que seja possível a passagem do fármaco através dos poros (NIKAIDO, 1989). A hidrofobia dos antimicrobianos explica a resistência intrínseca observada em muitas bactérias Gram-negativas, tais como *Stenotrophomonas maltophilia* e *Pseudomonas aeruginosa* (LIM; WEBB, 2005).

A resistência por alterações na permeabilidade aos antimicrobianos pode ser adquirida mediada por genes de localização cromossômica ou plasmidial, sendo que, mutação no cromossomo bacteriano tem pequena expressão clínica. Sua ocorrência tem sido descrita no *Mycobacterium tuberculosis* resistente à isoniazida, nas *Pseudomonas aeruginosa* e enterobactérias resistentes às quinolonas e em algumas cepas de *Neisseria gonorrhoeae* resistente às penicilinas e à eritromicina. Também foram descritas cepas de *Escherichia coli* e de *Pseudomonas aeruginosa* resistente à ampicilina e carbenicilina respectivamente, cuja resistência resultou de mutações que provocaram alterações nas porinas, impedindo a difusão dos antimicrobianos para o espaço periplasmático. Também já foi relatada a resistência devida à ausência de porinas (TAVARES, 2002).

A resistência por alteração na permeabilidade adquirida por mutação passou a ter, nos dias atuais, importância maior ao se descrever cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes aos glicopeptídeos. Estas bactérias mostram-se resistentes aos glicopeptídeos provavelmente por apresentarem espessamento da parede celular, resultante do aumento de sua síntese provocada por um maior número de proteínas ligadoras de penicilina. É possível, também que a resistência dos estafilococos aos glicopeptídeos seja decorrente do aprisionamento destes antibióticos por resíduos de mucopeptídeo produzido em excesso, com isso reduzindo a quantidade do antibiótico que chega ao seu local de ação na membrana citoplasmática (HANAKI et al., 1998; HIRAMATSU; HANAKI, 1998).

A resistência devida à alteração na permeabilidade promovida por genes plasmidiais é pouco frequente. Sua ocorrência é descrita em *Pseudomonas aeruginosa* resistente à beta-lactâmicos e ao cloranfenicol e em cepas de *Escherichia coli* e de *Haemophilus influenzae* resistente ao cloranfenicol. É também vista em raras cepas de pneumococos que apresentam resistência múltipla (BENVENISTE; DAVIES, 1973; SHAW, 1984).

A resistência às sulfonamidas, observada em alguns bacilos Gram-negativos, e a resistência da *Pseudomonas aeruginosa* aos aminoglicosídeos é também atribuída à diminuição da permeabilidade mediada por fatores R (plasmídeo de resistência). Neste último caso, não está claro se a reduzida penetração do antibiótico se deve a uma impermeabilidade própria das membranas ou a alterações no sistema de transporte destes antibióticos (RICE; BONOMO, 2007).

O mecanismo da impermeabilidade aos fármacos pode ser um dos fatores responsáveis pela resistência de *Staphylococcus aureus* a meticilina, das bactérias anaeróbias aos beta-lactâmicos e dos bacilos Gram-negativos às quinolonas. Resulta de alterações nas porinas das membranas externas, com isso havendo o bloqueio da penetração dos fármacos em seu local de ação (LEUNG; WILLIAMS, 1978; NORD et al., 1985).

O efluxo de fármacos é a remoção ativa do fármaco antes que ele se ligue ao receptor alvo (LIM; WEBB, 2005). As bombas de efluxo pode ser substrato-específicas como sistemas de efluxo de tetraciclina e de macrolídeos. Outras atuam com antibióticos de classes diferentes, como o sistema MexABOprM que pode exportar uma larga gama de substratos, produzindo resistência cruzada a uma grande número de agentes estruturalmente não relacionados (POOLE, 2000; POOLE, 2000). Este sistema foi identificado na *Pseudomonas aeruginosa*, onde a proteína MexB é uma bomba citoplasmática de amplo espectro, a proteína OprM forma um poro que fornece um portal através da membrana externa e a proteína MexA liga fisicamente estes componentes (LIM; WEBB, 2005).

Segundo Livermore (2001), o sistema confere resistência a penicilina, cefalosporinas, fluoroquinolonas, tetraciclina e cloranfenicol. A combinação do operon MexABOprM com perda de OprD produz resistência ao meropenem além do imipenem, apesar de não ser o mecanismo de efluxo o único responsável pela resistência de carbapenêmicos em *Pseudomonas aeruginosa*.

Mecanismos de efluxo de multi-fármacos têm sido identificados em outros organismos incluindo as *Enterobacteriaceae*. A mutação do loco cromossômico nomeada MAR (resistência a múltiplos antibióticos), que regula a susceptibilidade a antimicrobianos não relacionados, resulta em uma combinação de efluxo ativo e baixa-regulação do canal dos poros OmpF (LIM; WEBB, 2005).

A inativação de fármacos antimicrobianos por enzimas produzidas pelas bactérias é provavelmente o principal mecanismo molecular de resistência

microbiana. Foi inicialmente descrita por Abraham e Chain, em 1940, ao demonstrarem em extratos de *Escherichia coli* uma enzima capaz de inativar a ação da penicilina, à qual denominaram penicilinase. Esta enzima atua sobre o anel beta-lactâmico da penicilina, provocando a abertura do anel por hidrólise e transformando o antibiótico em um produto inativo. Com a introdução das cefalosporina, na década de 60, o termo cefalosporinase passou a ser empregado para designar as enzimas que hidrolisavam este novo grupo de antibióticos beta-lactâmicos.

Subsequentemente verificou-se que as bactérias podiam produzir enzimas hidrolíticas tanto contra as penicilinas como contra as cefalosporinas, passando-se a empregar o termo beta-lactamase para nomear as enzimas contra antibióticos beta-lactâmicos (TAVARES, 2002; LIM; WEBB, 2005).

Mais recentemente, verificou-se que a resistência associada à produção de beta-lactamases podia ocorrer sem haver a destruição das penicilinas e cefalosporinas. Neste tipo de resistência, a interação entre a enzima e o substrato resulta em bloqueio da ação do fármaco, sem haver sua hidrólise. Por isso, este mecanismo de ação enzimática é denominado barreira não-hidrolítica (TAVARES, 2002).

Um terceiro tipo de resistência por inativação enzimática consiste na modificação de antibióticos das famílias dos aminoglicosídeos, do cloranfenicol e da fosfomicina por enzimas produzidas pela bactéria resistente. Desta maneira, os fármacos modificados tornam-se incapazes ou têm dificuldade em penetrar na célula bacteriana ou, então, perdem sua afinidade pelo seu receptor (BENVENISTE; DAVIES, 1973).

A primeira beta-lactamase foi descoberta no *Staphylococcus aureus*. Hoje, essas enzimas produzem mais comumente resistência em patógenos Gram-negativos. As bactérias Gram-negativas naturalmente produzem uma grande variedade de beta-lactamases, algumas são cromossomicamente codificadas e outras residem nos plasmídeos. A primeira beta-lactamase mediada por plasmídeo, TEM-1, foi originalmente isolada em *Escherichia coli* nos anos 60 e em poucos anos disseminou-se em várias espécies de *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonas spp* (BRADFORD, 2001). Esta beta-lactamase é ativa contra todas as penicilinas, mas não contra cefalosporina (WATERER; WUNDERINK, 2001). Através da substituição de aminoácidos, o espectro de atividade enzimática aumentou de forma a incluir cefalosporinas de terceira geração de amplo espectro. Estas enzimas são

coletivamente conhecidas como beta-lactamases de espectro estendido. Mas de 150 beta-lactamases de espectro estendido foram identificadas no mundo inteiro em muitas espécies diferentes (BRADFORD, 2001). Algumas delas são cefalosporinases específicas sendo que algumas têm uma atividade maior, enquanto que outras são resistentes aos inibidores de beta-lactamases, (isto é, ácido clavulânico e tazobactam). Apesar de a maioria das beta-lactamases de espectro estendido permanecer susceptível aos inibidores das beta-lactamase, foram identificadas cepas com alta resistência às cefalosporinas de terceira geração que não são afetadas por inibidores de beta-lactamase (NORDMANN, 1998).

Andreotti, 2003 afirma que a presença de linhagens multirresistentes pode representar risco à saúde pública se atingirem o sistema de abastecimento de água. Desta forma, a circulação de genes de resistência nas águas representa um fator de risco para os usuários e para os consumidores destas águas, uma vez que genes das linhagens multirresistentes podem atingir o homem por via direta ou indireta.

Assim, a possibilidade de disseminação de bactérias resistentes entre diferentes países, as relações entre resistência e virulência e os respectivos efeitos sobre a evolução bacteriana, aliados a dificuldade da indústria em desenvolver novos antimicrobianos na velocidade em que a resistência se estabelece, são constatações que fazem do controle da resistência um enorme desafio (VIEIRA, 2003).

O uso excessivo de antimicrobianos favoreceu a seleção de organismos resistentes, que vêm se disseminando rapidamente, em diversos ambientes. Assim sendo, a disseminação e o crescente aumento da resistência bacteriana tornou-se uma questão emergente de saúde pública, justificando-se a necessidade de conhecer a susceptibilidade dos micro-organismos comumente causadores de infecções hospitalares (*P. aeruginosa* e *S. aureus*) isolados de amostras de água para consumo humano (MACHADO, 2004).

1.7 Métodos e técnicas para detecção de micro-organismos

Serão descritos os métodos diretos mais comumente utilizados para a detecção dos micro-organismos a partir de amostras de águas, de alimentos e amostras clínicas, os quais baseiam-se na capacidade de multiplicação dos micro-

organismos quando transferidos para um meio de cultura que pode ser líquido ou sólido.

1.7.1 Técnica de tubos múltiplos

É um método de análise qualitativa e quantitativa que permite determinar o número mais provável (NMP) dos micro-organismos de interesse, pela estimativa da densidade de bactérias em uma amostra, calculada a partir dos resultados positivos obtidos por diluições sucessivas da amostra e distribuição de alíquotas em uma série de tubos contendo meios de cultura seletivos e diferenciais. Neste método, a cultura é diluída até um ponto em que as amostras da diluição, quando semeadas em meio apropriado, não apresentem crescimento (CETESB,1998). O método se baseia em testes presuntivos e confirmativos e os resultados são obtidos por meio de tabelas do *Standard Methods* (APHA, 2005), correspondente às diluições utilizadas.

1.7.2 Técnica de presença e ausência

O teste de presença/ausência não objetiva quantificar os micro-organismos nas amostras, mas sim verificar sua presença num determinado volume. Sua principal aplicação é na análise de águas destinadas ao consumo humano, para as quais a legislação brasileira através da Portaria nº 518/2004 do Ministério da Saúde, estabelece como padrão a ausência de coliformes totais e termotolerantes em 100 mL da amostra (BRASIL, 2004). É mais simples, rápida e econômica do que a técnica de tubos múltiplos. Pode ser realizada com meios de cultura diferenciais e presuntivos ou com meios que incorporam substrato cromogênicos e fluorogênicos, como o colilert, dentre outros (ITAL, 2000).

1.7.3 Plaqueamento em meio sólido

Segundo Trabulsi e Alterthum (2008), neste método, alíquotas de diluições seriadas da amostra são semeadas em meios de cultura sólidos adequados e incubadas de maneira a permitir o desenvolvimento de colônias (unidades

formadores de colônias – UFC) isoladas. Estas são contadas e, após considerada a diluição, obtém-se o número de bactérias viáveis por mililitro na suspensão original ou, como mais adequadamente se designa, o número de unidades formadoras de colônias (UFC/mL). Conforme consta no manual do ITAL (2000), o plaqueamento em meio sólido pode ser em superfície ou em profundidade.

1.7.3.1 Plaqueamento em superfície (“spread plate”)

Técnica que quantifica os micro-organismos a partir da inoculação das amostras sobre a superfície de um meio sólido (ágar). Limita o volume inoculado a 0,1 mL da amostra ou suas diluições, mas permite uma melhor visualização das características das colônias na superfície, além de facilitar sua transferência para outros meios de cultura.

1.7.3.2 Plaqueamento em profundidade (“pour plate”)

Permite a inoculação da amostra ou suas diluições e é indicado para a análise de amostras com contagens acima de 10^2 /mL.

É uma técnica geral de enumeração de micro-organismos que pode ser utilizada tanto para bactérias heterotróficas como para a contagem de outros grupos, gêneros ou espécies de micro-organismos. Essa versatilidade é decorrente do princípio do método que se baseia na premissa de que cada célula microbiana presente em uma amostra, quando fixada em um meio de cultura sólido adequado, irá formar uma colônia visível e isolada.

É também conhecida como contagem padrão em placas e muito utilizada para estimar o número de bactérias heterotróficas na água, particularmente como uma ferramenta para acompanhar as variações nas condições de processo ou a eficiência das diversas etapas de tratamento, permitindo ainda verificar as condições higiênicas em diferentes pontos da rede de distribuição.

1.7.4 Técnica de membrana filtrante

É uma metodologia de concentração de micro-organismos indicada para amostras nas quais se espera ausência ou contagens muito baixas dos micro-organismos em estudo, fora do limite de detecção das técnicas de plaqueamento convencionais e de outros métodos. Por este motivo, sua principal aplicação é a análise de água destinada ao consumo humano, embora possa ser utilizada para outros tipos de água selecionando-se volumes adequados à concentração dos micro-organismos presentes (ITAL, 2000).

É um método de análise quantitativo que permite determinar o número de unidades formadoras de colônias (UFC) dos micro-organismos alvos na amostra, baseado na filtração de um volume adequado da amostra através de um filtro membrana. É utilizada para a análise de coliformes, *P. aeruginosa*, *Enterococcus* e *C. perfringens*.

Esta técnica baseia-se na filtração de volumes adequados da amostra de água, através de membrana filtrante com porosidade adequada. As bactérias a serem detectadas apresentam dimensões maiores e ficarão retidas na superfície da membrana a qual é então transferida para uma placa de Petri contendo o meio de cultura seletivo e diferencial. Por capilaridade, o meio difunde-se para a membrana, entrando em contato com as bactérias e, após o período determinado de incubação, desenvolvem-se colônias com características típicas, que poderão ser observadas com o auxílio de um microscópio. A partir da contagem destas colônias, calcula-se a densidade de coliformes presentes na amostra (CETESB, 1993).

1.7.5 Métodos rápidos de detecção e identificação de bactérias

Contrastando com os procedimentos convencionais, dependentes de crescimento para identificação de bactérias, o uso de provas com substratos cromogênicos de enzimas, permite ao laboratório identificar numerosas espécies de micro-organismos de modo rápido. Substratos cromogênicos de enzimas detectam enzimas pré-formadas nas bactérias e permitem a identificação rápida de micro-organismos específicos em comparação com os métodos clássicos de identificação, que incluem o crescimento em meios seletivos e diferenciais, as características das

colônias e a morfologia celular em esfregaços corados por Gram (SCHAECHTER et al., 2002). As principais técnicas rápidas de detecção e identificação de bactérias são:

1.7.5.1 Técnica de substratos cromogênicos

Técnica de identificação rápida de espécies bacterianas pela detecção de características fenotípicas. Baseia-se na síntese de compostos incolores que originam produtos de hidrólise coloridos diretamente ou após adição de um reagente. Os substratos enzimáticos comumente utilizados para identificação de bactérias são as enzimas glicosidase e aminopeptidase.

1.7.6 Provas bioquímicas

As provas bioquímicas são amplamente utilizadas para diferenciar e identificar bactérias por meio de suas atividades enzimáticas. Algumas das principais provas bioquímicas normalmente utilizadas para identificação dos micro-organismos de interesse médico e indicadores ambientais são: meio de Rugai modificado, indol, degradação da uréia, motilidade, sulfeto de hidrogênio, citocromo oxidase, coagulase, prova de oxidação/fermentação (O/F) e fermentação do manitol.

Além dessas provas, outra prova rotineiramente utilizada antes de qualquer prova bioquímica para identificação dos micro-organismos é a coloração de Gram, que se caracteriza pela coloração diferencial dos mesmos, através da qual as bactérias são classificadas em Gram-positivas ou Gram-negativas, dependendo da retenção ou não do corante cristal-violeta em sua estrutura (ANVISA, 2004).

1.8 Determinação da susceptibilidade aos agentes antimicrobianos

A determinação da susceptibilidade aos agentes antimicrobianos pode ser determinada direta ou indiretamente. A determinação direta é feita pelos chamados métodos de diluição e a indireta pelo método de difusão em placa (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

Método de diluição: método quantitativo que consiste no preparo de diluições sucessivas do antimicrobiano a serem testadas em tubos contendo caldos de cultura, onde será então inoculada a suspensão bacteriana padronizada do micro-organismo em estudo. Após a incubação, deve-se verificar a menor concentração do antimicrobiano que inibiu o crescimento bacteriano. Esta concentração é denominada concentração inibitória mínima – CIM (TAVARES et al., 2001).

Método de difusão em placa: método qualitativo consiste na deposição de um disco de papel impregnado com o antimicrobiano no meio de cultura sólido e em placa previamente semeada com suspensão da bactéria em estudo. A droga aplicada difunde-se no meio de cultura e o crescimento bacteriano poderá ser inibido, formando-se então um halo de inibição em torno do disco (zona onde não há crescimento bacteriano), cujo diâmetro varia de acordo com a velocidade de difusão do antimicrobiano. Os halos são medidos e os resultados são reportados como sensível, intermediário (moderadamente resistente) ou resistente (TAVARES et al., 2001).

O método de difusão em placa pode ter numerosas variáveis, de acordo com a tecnologia empregada. Para que os resultados obtidos entre os diferentes laboratórios sejam comparados, foi padronizada internacionalmente, a técnica descrita por Bauer e Kirby. Nesta técnica são estabelecidas normas para as concentrações a serem utilizadas nos discos de cada antimicrobiano, padronização do inóculo bacteriano testado e tipo de meio de cultura a ser utilizado (SILVA, 1999).

Para o isolamento e a identificação dos micro-organismos indicadores de contaminação e patogênicos nas amostras de água, deve-se analisar qual destas técnicas é a mais adequada.

A cidade de Boa Vista, capital do estado de Roraima, possuía em 2010, sessenta e uma escolas (61) na zona urbana, que atendia a 49.981 alunos, sendo 32.327 do ensino fundamental, 9.777 do ensino médio, 413 da educação especial e 7.464 da educação de jovens e adultos, distribuídas em 33 bairros. Das 61 escolas da capital, 63,9%, são abastecidas com água apenas clorada e 36,1%, são abastecidas com água que recebem tratamento completo. (RORAIMA, 2011).

O abastecimento de água, esgoto domiciliar e coleta de lixo são importantes indicadores de condições ambientais e de qualidade de vida da população de uma região. O fornecimento de água potável na cidade de Boa Vista, capital do Estado de Roraima, é constituído por dois sistemas de abastecimento: captação superficial das

águas do Rio Branco, localizado no bairro São Pedro, que através de duas adutoras, encaminham a água bruta para as duas estações de tratamento de águas (ETA) e captação subterrânea realizadas em diversos bairros da cidade: Buritis, Caranã, Pintolândia, Tancredo Neves e Jardim Equatorial, através de 68 poços tubulares instalados. As águas bombeadas destes poços recebem cloração antes de serem encaminhadas para abastecimento.

De acordo com dados fornecidos pela CAER/RR no município de Boa Vista, em 2009, 67 mil domicílios encontravam-se ligados a rede geral de abastecimento de água, beneficiando 259 mil pessoas (98% da população da capital), com um volume de 36 milhões de m³/ano de água tratada.

Na verdade, não se sabe a qualidade de água nos reservatórios domiciliares, de onde o produto é realmente consumido pela população. A qualidade da água também pode decair no sistema de distribuição pela intermitência do serviço, baixa cobertura de distribuição de água, manutenção deficiente, entre outros. Nos domicílios os níveis de contaminação podem se elevar pela precariedade das instalações hidráulico-sanitárias, pela falta de manutenção das caixas-d'água e pelo munuseio inadequado da água (D'AGUILA et al., 2000).

O tratamento da água apesar de reduzir a carga microbiana, não elimina algumas bactérias, principalmente as resistentes a antibióticos e níveis elevados de bactérias heterotróficas, especialmente as resistentes a múltiplos antibióticos com possíveis infecções oportunistas, podem representar riscos para a saúde dos indivíduos com pouca idade, os imunologicamente debilitados, os idosos, os transplantados, as gestantes, os portadores de doenças imunossupressoras, além de pessoas submetidas à quimioterapia (BRASIL, 2006).

Boa parte da população do Estado de Roraima conta com sistema de abastecimento de água tratada. Mesmo assim, o consumo de água engarrafada tem crescido muito, pelo fato da população desconfiar que o tratamento da água, apesar de reduzir a carga microbiana, não elimina as bactérias resistentes a antibióticos, o que pode contribuir para a disseminação destes organismos e /ou dos seus genes.

No nosso estado e em particular em Boa Vista – RR, são poucos as pesquisas sobre o perfil de resistência a antimicrobianos de bactérias isoladas em amostras de águas, nesse sentido acreditamos que esta pesquisa irá fornecer uma série de informações que poderão contribuir para um melhor direcionamento das políticas públicas de saúde do estado de Roraima.

OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar microbiologicamente e determinar os riscos da presença de bactérias heterotróficas em amostras de águas consumidas nas escolas estaduais de Boa Vista – Roraima.

2.2 Objetivos específicos

Detectar e quantificar micro-organismos indicadores de qualidade de água nas amostras de águas coletadas nas escolas estaduais localizadas em Boa Vista – RR.

Isolar as bactérias heterotróficas;

Testar a sensibilidade das bactérias isoladas aos antibióticos;

Classificar as bactérias quanto à resistência a múltiplos antibióticos;

Enquadrar as amostras de água na legislação pertinente.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Área de estudo

Foram visitadas 20 escolas públicas localizadas em Boa Vista, as quais atendiam um total de 21.917 alunos. As escolas foram divididas em 2 grupos: as que recebem água com tratamento completo e as que recebem água clorada. As escolas, as localizações e os pontos onde as amostras de águas foram coletadas encontram-se nas figuras 2 e 3.

Figura 2 – Escolas, localizações e pontos, onde as amostras de água que recebem água com tratamento completo foram coletadas.

Escola	Bairro	Pontos
Gonçalves Dias	Canarinho	1 e 2
Penha Brasil	Aparecida	3 e 4
Hildebrando F. Bittencourt	dos Estados	5 e 6
Ana Libória	Mecejana	7 e 8
Ayrton Senna	Centro	13 e 14
Monteiro Lobato	Centro	35 e 36
Oswaldo Cruz	Centro	37 e 38
Euclides da Cunha	Centro	39 e 40

Fonte: Roraima, 2010

Figura 3 – Escolas, localizações e pontos, onde as amostras de água que recebem água clorada foram coletadas.

Escola	Bairro	Pontos
Tancredo Neves	Tancredo Neves	9 e 10
Jesus Nazareno	Caraná	11 e 12
Maria das Dores Brasil	13 de setembro	15 e 16
América Sarmiento	Sílvio Botelho	17 e 18
Severino Cavalcante	Sílvio Botelho	19 e 20
Jaceguai Cunha	Asa Branca	21 e 22
Major Alcides	Asa Branca	23 e 24
Wanda D. Aguiar	Raiar do Sol	25 e 26
Luiz R. Lucena	Nova Cidade	27 e 28
Elza Breves	Conjunto cidadão	29 e 30
Luiz R. de Lima	Equatorial	31 e 32
Hélio Campos	Sílvio Leite	33 e 34

Fonte: Roraima (2010).

3.2 Amostragem

Este trabalho foi desenvolvido durante o período de outubro de 2010 a abril de 2011, no Laboratório de Microbiologia do Centro de Estudos da Biodiversidade – CBio da Universidade Federal de Roraima e no Laboratório Central – LACEN, de Roraima

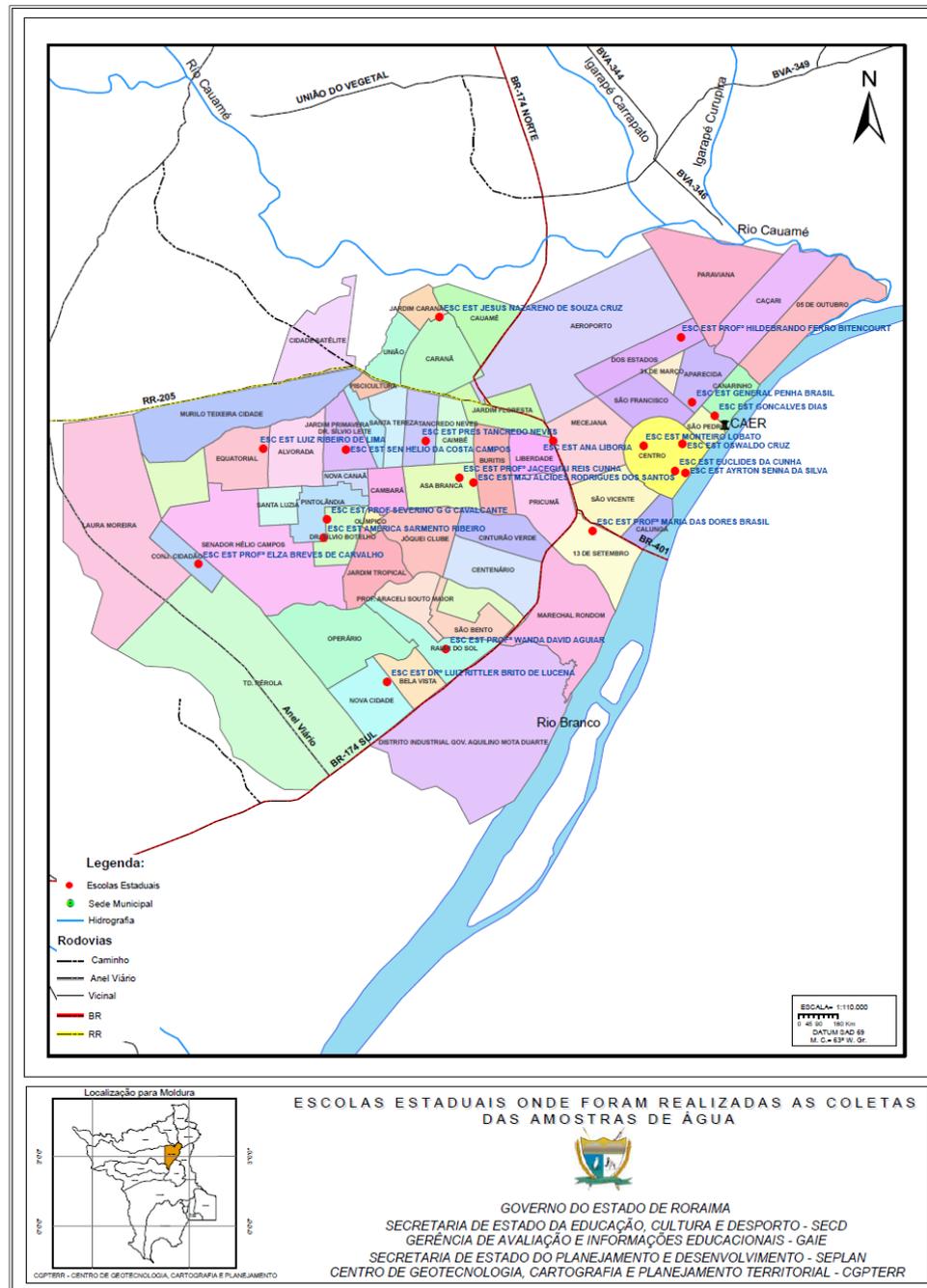
As amostras foram coletadas em vinte (20) escolas estaduais localizadas em Boa Vista – RR, sendo selecionadas aquelas com os maiores contingentes de alunos, localização e tipo de tratamento que a água recebe. Foram escolhidas 12 escolas que recebem água com tratamento completo (coagulação, floculação, decantação, filtração, correção de pH, cloração e fluoretação) e 8 que recebem água clorada e à localização, visando obter-se maior abrangência na distribuição geográficas das escolas. O intervalo entre a primeira e a segunda coleta teve a duração de três meses.

A primeira coleta ocorreu entre 18/10/2010 a 20/12/2010, quando foram realizadas coletas em um bebedouro central, o mais utilizado pelos alunos e outra na torneira da copa de cada escola, perfazendo um total de 40 amostras de água. A segunda coleta foi realizada no período de 17/01/2011 a 11/04/2011, quando foram realizadas novas coletas nos bebedouros e nas torneiras da copa das mesmas escolas da primeira campanha, obtendo-se mais 40 amostras de água, totalizando 80 amostras, sendo 40 da água dos bebedouros e 40 da água das torneiras das copas.

As amostras foram coletadas no período da manhã, acondicionadas em frascos de polietileno, com capacidade para 125 mL, previamente esterilizados contendo 0,01 mL (2 gotas) de tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) a 10% para neutralizar o cloro residual da água dos bebedouros e das torneiras das copas.

O mapa com a localização das escolas estaduais onde foram realizadas as coletas das amostras de água pode ser visto na figura 4.

Figura 4 – Mapa com a localização das escolas estaduais onde foram realizadas as coletas das amostras de água.

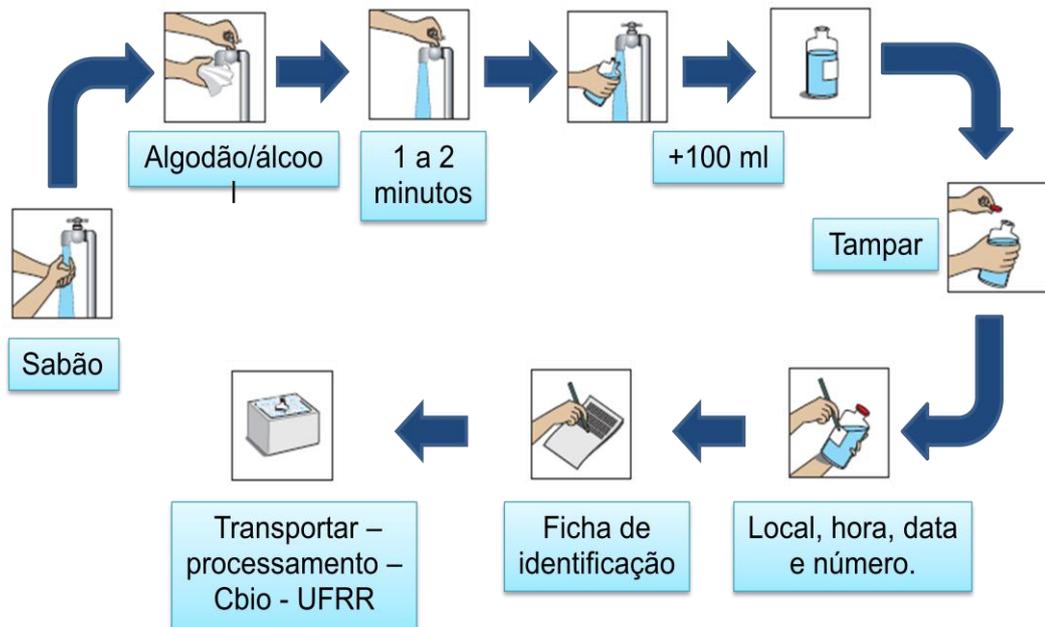


Fonte: Roraima (2011).

Antes de coletar as amostras de água, as torneiras foram limpas com algodão embebido em álcool 70% sendo que permitiu-se o escoamento de água por 2 a 3 minutos. Os frascos foram preenchidos com aproximadamente 100 mL de água e posteriormente realizou-se a identificação dos mesmos. Os frascos foram marcados

com os números das amostras, correspondente aos pontos das coletas e finalmente foram preenchidas as fichas de identificação das amostras de águas. Na figura 5 está representado o procedimento para coleta de amostra de água em torneira

Figura 5 – Procedimentos para coleta de amostra de água em torneira



Fonte: OMS (1998).

Após o procedimento de coleta, os frascos foram acondicionados em caixa isotérmica contendo gelo e transportados imediatamente ao laboratório de Microbiologia do Centro de Estudos da Biodiversidade – CBio da Universidade Federal de Roraima - UFRR, onde foram processadas. Todas as amostras foram analisadas quanto à presença de coliformes totais, coliformes termotolerantes e bactérias heterotróficas.

3.3 Análises bacteriológicas

As técnicas adotadas, para quantificar os coliformes totais e termotolerantes e bactérias heterotróficas nas amostras de água, são as preconizadas no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2005), conforme descritas a seguir.

3.3.1 Detecção de coliformes

Para a determinação dos coliformes foi utilizada a técnica dos tubos múltiplos, com três diluições (10^0 , 10^{-1} , 10^{-2}) e séries de cinco tubos de acordo com as recomendações para as análises de água utilizada para consumo humano. O esquema 2 mostra como é realizada a técnica da fermentação em tubos múltiplos. A água de diluição foi preparada da seguinte forma: em um tubo de ensaio contendo $9 \pm 0,2$ mL de solução salina a 0,85% foi adicionado 1 mL da amostra de água a ser examinada, em seguida foi retirado da diluição com auxílio de uma pipeta esterilizada, 1 mL e inoculado nos tubos contendo caldo lactosado de concentração simples, diluição 1:100).

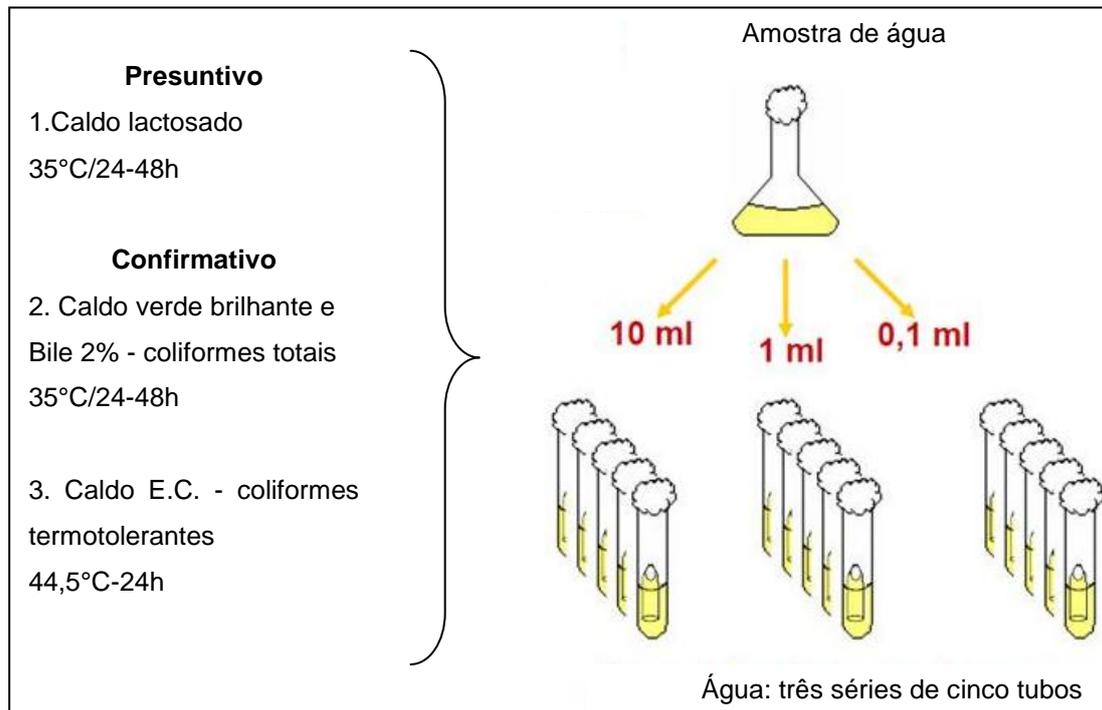
Para a realização do teste foram utilizados 15 tubos de ensaio, distribuídos de 5 em 5, nos primeiros 5 tubos, que contem caldo lactosado de concentração dupla, foram inoculados com auxílio de uma pipeta esterilizada, 10 mL da amostra de água, em cada tubo, figura 6. Nos 10 tubos restantes, os que contêm caldo lactosado de concentração simples, foram inoculados nos 5 primeiros, 1 mL da amostra de água (diluição 1:10) e nos 5 últimos tubos, foram inoculados 1 mL da diluição 1:100 descrita acima.

Figura 6 – Teste presuntivo: tubos com caldo lactosado para coliformes totais.



O esquema da realização da técnica da fermentação em tubos múltiplos associada ao Número Mais Provável se encontra na figura 7.

Figura 7 – Técnica da fermentação em tubos múltiplos.



Fonte: Disponível em: <http://www.dms.ufsc.br/mip7013/arquivos/Microbiologiagua.pdf>

3.3.1.1 Determinação de coliformes totais e termotolerantes

Inicialmente, realizou-se o teste presuntivo com inoculação das amostras em Caldo Lactosado – C.L. (MERCK) duplo e simples que foram incubadas em estufa bacteriológicas a $35,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ por 24-48h. Esse meio de cultivo é rico em nutrientes (lactose e peptona) facilitadores do crescimento dos micro-organismos, oferecendo-lhes como fonte de carbono a lactose, a qual é fermentada pelos coliformes produzindo ácido e gás, sendo que o gás é apreendido no tubo de Durhan.

Quando o resultado apresentou-se positivo no teste presuntivo, ou seja, quando houve produção de gás com aprisionamento do mesmo no tubo de Durhan, realizou-se o teste confirmativo para a presença de coliformes totais, figuras 8 e 9. As amostras positivas foram inoculadas em Caldo Verde Brilhante – C.V.B. (MERCK) e foram incubadas em estufa bacteriológica a temperatura de $35,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ por 48h. O C.V.B. contém dois inibidores de crescimento da microflora acompanhante, especialmente de bactérias Gram-positivas, permitindo um bom desenvolvimento de bactérias do grupo coliforme. Após 48 horas, os tubos que apresentaram produção de gás, tiveram 1 mL de seu conteúdo inoculados em 10 mL

de meio E.C. (MERCK) e foram incubados em banho Maria a temperatura de $44,5\pm 0,2^{\circ}\text{C}$ por 24 horas para verificação da presença de coliformes termotolerantes. O meio E.C. (MERCK) impede o desenvolvimento de coliformes que não são de origem fecal. A cada teste, os resultados foram anotados em formulário próprio.

Figura 8 – Teste confirmativo:
caldo E.C. para coliformes

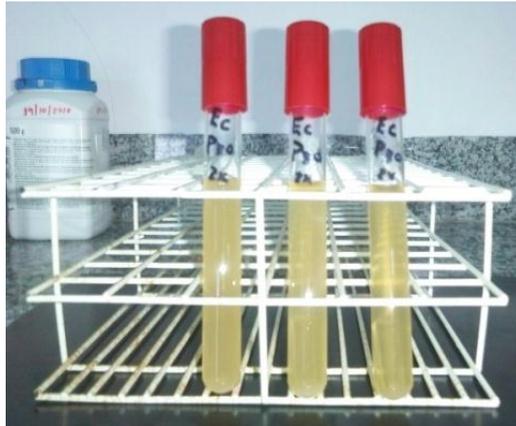
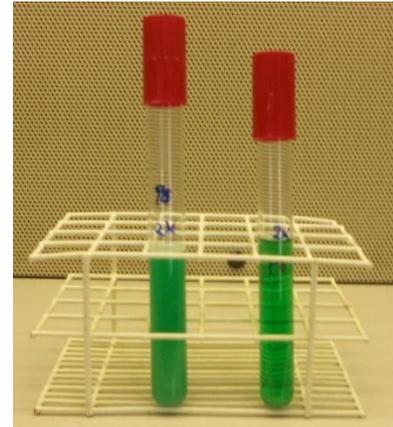


Figura 9 – Teste confirmativo:
caldo V. B. para coliformes totais.



3.3.2 Determinação da densidade de indicadores ou NMP

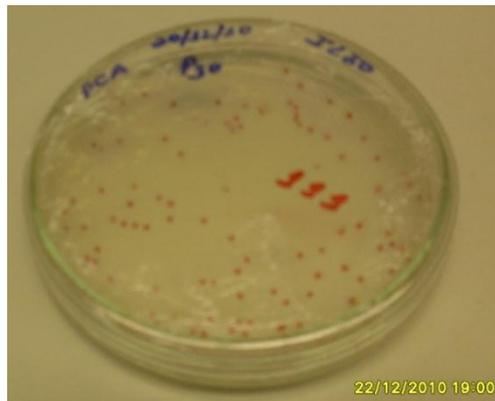
A determinação da densidade de indicadores foi feita através da Tabela de Índice de Número Mais Provável – NMP (Tabela de Hoskins). Os códigos obtidos durante as leituras foram comparados com a tabela e, em seguida, a densidade (UFC/100 mL) foi determinada para cada amostra. O valor obtido na comparação fornece uma probabilidade de 95% de certeza do NMP encontrado estar entre intervalos máximos e mínimos fornecidos pela tabela. O valor de NMP é um valor de probabilidade estatística.

3.3.3 Detecção de bactérias heterotróficas

Para a detecção de bactérias heterotróficas foi usado o método “*pour plate*”. Foi transferido, com auxílio de uma pipeta estéril, 1 mL das amostras de água para placas de Petri esterilizadas e em seguida adicionou-se sobre a alíquota da amostra de água 20 mL do meio de cultura Plate Count Ágar = PCA (HIMEDIA), previamente fundido e estabilizado em banho-maria a $44-46^{\circ}\text{C}$. O conteúdo da placa foi

homogeneizado com movimentos circulares moderados em forma de oito invertido, cerca de 10 vezes consecutivas. Após a solidificação do meio de cultura, a placa foi incubada em estufa, na posição invertida a $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$ durante 48 ± 3 horas. Todas as amostras foram incubadas em triplicata. Findo o período de incubação, realizou-se a contagem das colônias com auxílio de um contador de colônias, figura 10.

Figura 10 – Contagem das unidades formadoras de colônias (UFC), de bactérias heterotróficas em meio PCA, após 48 horas de incubação.



Após a contagem das unidades formadoras de colônias (UFC), foi feita a média aritmética das triplicatas e os resultados, anotados em formulário próprio. As placas foram então, encaminhadas ao LACEN-RR, para isolamento, identificação e avaliação da susceptibilidade aos antimicrobianos.

3.3.4 Isolamento das bactérias

Para a obtenção de culturas puras utilizou-se a técnica do esgotamento. Com o auxílio de uma alça de inoculação, os isolados bacterianos foram inoculados, por meio de uma sequência de estrias não sobrepostas, em placas contendo meio ágar sangue (BIOBRÁS) e ágar MacConkey (BIOBRÁS). O ágar sangue é um meio acrescido de sangue desfibrinado de carneiro, o qual tem o objetivo de propiciar o desenvolvimento da maioria das bactérias patogênicas de importância médica. O ágar MacConkey contém como agentes seletivos sais biliares, o cristal violeta, o vermelho neutro e a lactose, sendo que os dois primeiros constituintes inibem o crescimento das bactérias Gram-positivas e algumas Gram-negativas fastidiosas e

enquanto que os outros servem para diferenciar as colônias bacterianas que utilizam este carboidrato. Cada placa foi devidamente identificada e incubadas a 35°C durante 24 horas.

Figura 11 – Placa com isolados Gram-negativos em ágar.

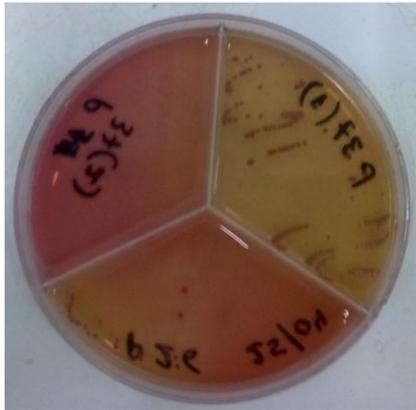


Figura 12 – Placa com isolados Gram-positivos em ágar sangue.



Após o período de incubação, foram feitas as comparações dos isolados que cresceram tanto no ágar sangue quanto no ágar MacConkey. As bactérias que cresceram apenas no ágar MacConkey, figura 11, foram consideradas Gram(-) e foram submetidas à série bioquímica. Os isolados que cresceram no ágar sangue e não cresceram no ágar MacConkey, figura 12, foram considerados bactérias Gram(+). Para identificar os isolados bacterianos pertencentes ao gênero *Staphylococcus* usou-se o teste do manitol.

3.3.4.1 Teste do manitol

O teste de fermentação do manitol é utilizado para a diferenciação de colônias de *S. aureus* de outras espécies de *Staphylococcus* spp. Os isolados crescidos em meio ágar sangue foram semeados em placa com o auxílio de um *swab*, as placas foram incubadas invertidas a 35°C por 24 horas sobre a superfície do meio manitol cuja fórmula contém por g/L: peptona de caseína = 5,0; peptona de carne = 5,0; extrato de carne = 1,0; D-manitol = 10,0; cloreto de sódio = 75,0; vermelho de fenol = 0,025; ágar = 15,0; pH final = 7,4 ± 0,2 a 25°C.. Findo o período de incubação os

isolados que apresentaram cor amarela foram identificados como *S. aureus* e os outros isolados como *Staphylococcus* spp.

3.3.4.2 Identificação das bactérias Gram-negativas

Para caracterização das bactérias Gram-negativas, os isolados foram submetidos à série bioquímica. Cada isolado previamente crescido em meio ágar MacConkey foi inoculado em tubos contendo os seguintes meios: TSI, lisina, citrato, motilidade, indol, oxidase e uréia e incubados em estufa a 35°C durante 24 horas. Após, a incubação foram realizadas as leituras da série bioquímica, sendo que os resultados foram anotados em formulário próprio para comparação com a Tabela Primária de Identificação da ANVISA. (ANEXO A).

Ágar triplice açúcar ferro – TSI, (BIOBRÁS), possui a seguinte composição em g/L: peptona de caseína – 10,0; peptona de carne -10,0; glicose – 1,0; lactose – 10,0; sacarose – 10,0; cloreto de sódio – 5,0; sulfato férrico amoniacal – 0,2; tiosulfato de sódio – 0,2; vermelho de fenol – 0,025, ágar – 13,0 e pH final: $7,3 \pm 0,2$ a 25°C. Depois de preparado foi distribuído 3 mL por tubo e esterilizado para em seguida esfriar em posição inclinada.

Figura 13 – Teste TSI.



Fermentação:
Glicose: (-)
Sacarose: (-)
Lactose: (-)



Fermentação:
Glicose: (+)
Sacarose: (-)
Lactose: (-)
Produção de gás



Fermentação:
Glicose: (+)
Sacarose: (+)
Lactose: (+)
Produção de gás



Fermentação:
Glicose: (+)
Sacarose: (-)
Lactose: (-)
Produção de sulfeto ferroso.

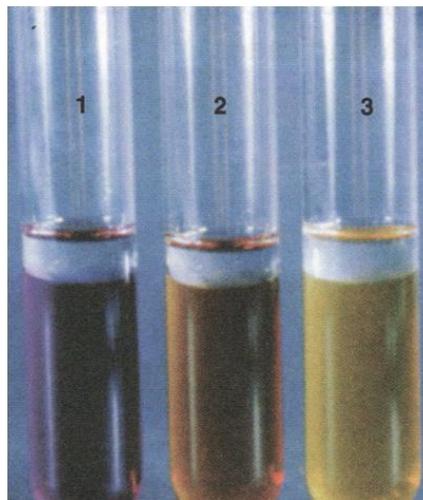
Fonte: Vermelho et al. (2006).

O meio de TSI é inclinado em bico de flauta, de cor vermelho-cereja, a inoculação da massa bacteriana isolada, foi realizada por picada central até o fundo,

seguida de espalhamento na superfície e incubado durante 18-24h a 35°C. Após o crescimento da bactéria neste meio (TSI), pode-se observar os seguintes resultados, figura 13: ápice vermelho e base amarela = fermentação apenas da glicose, lactose e sacarose negativas; ápice e base amarelos = fermentação da glicose, da lactose e/ou da sacarose; vermelho cereja = não fermentação dos açúcares; presença de gás (CO₂) = presença de bolhas ou meio fragmentado e precipitado negro = H₂S positivo (ANVISA, 2004).

Algumas bactérias possuem a enzima lisina descarboxilase que descarboxila a lisina produzindo cadaverina e CO₂, alcalinizando o meio. O meio lisina descarboxilase (BIOBRÁS) possui a seguinte composição por g/L: peptona de gelatina = 5,0; extrato de levedura = 3,0; glicose = 1,0; L-lisina = 5,0; púrpura de bromocresol = 0,002; pH final: 6,8 ± 0,2 a 25°C. Tubos contendo o caldo lisina descarboxilase foram inoculados com os isolados bacterianos e incubados por 24 horas, a 37°C. Os bacilos entéricos produzem ácido na fermentação inicial da glicose, ocasionando uma mudança, na cor do meio, para amarelo. As culturas que também promovem descarboxilação da lisina formam cadaverina e o caldo retorna à cor púrpura alcalina, figura 14. Portanto, após 24 horas de incubação, uma cor amarela indica resultado negativo enquanto que a cor púrpura é um resultado positivo, indicando a descarboxilação da lisina (ANVISA, 2004).

Figura 14 – Teste da lisina.

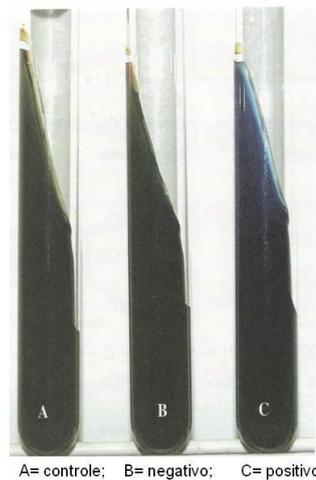


1 = positivo; 2 = controle; 3 = negativo

Fonte: Vermelho et al. (2006).

O ágar citrato Simmons (BIOBRÁS) é usado para diferenciar e identificar enterobactérias, baseando-se na utilização do citrato como única fonte de energia, o Agar citrato Simmons possui a seguinte composição em g/L: fosfato monobásico de amônio = 1,0; fosfato dipotássico = 1,0; cloreto de sódio = 5,0; citrato de sódio = 2,0; sulfato de magnésio = 0,2; azul de bromotimol = 0,008; ágar = 15,0; pH final = $6,9 \pm 0,2$ a 25°C .

Figura 15 – Teste do citrato Simmons.



Fonte: Vermelho et al. (2006).

Depois de preparado foi distribuído 5 mL do meio por tubo e após esterilização foi colocado para esfriar em posição inclinada. Os isolados foram semeados por estria na superfície e por punção e incubados por 4 dias a 35°C . A utilização do citrato como fonte de energia gera nos passos finais da reação uma grande quantidade de gás carbônico (CO_2). Este gás em excesso pode reagir com o sódio (Na^+) e a água (H_2O) do meio, produzindo compostos alcalinos como o carbonato de sódio (Na_2CO_3). Isto faz com que o pH do meio se torne alcalino, ocasionando a viragem do indicador para azul, figura 15, o que é considerado um resultado positivo para a prova do citrato (VERMELHO et al., 2006).

O meio SIM (BIOBRÁS) é usado rotineiramente na diferenciação e identificação de culturas puras de enterobactérias, para determinação da produção de sulfeto e indol e da motilidade. O meio SIM possui a seguinte composição química por g/L: peptona de caseína = 20,0; peptona de carne = 6,1; sulfato de ferro e amônia = 0,2; tiosulfato de sódio = 0,2; ágar = 3,5; pH final = $7,3 \pm 0,2$ a 25°C . Depois de

preparado foram distribuídos 3 mL do meio por tubo nos quais foram semeados por punção, os isolados em estudo e incubados a 35°C por 24 horas, quando então foram realizadas as leituras dos resultados.

A prova da motilidade indica indiretamente a produção de flagelos. Não é uma prova bioquímica e sim fisiológica, mas auxilia na identificação dos isolados bacterianos. A prova indica motilidade quando os isolados crescem deslocando-se da linha de inoculação, turvando o meio, figura 16. A prova é negativa quando ficam restritos ao local da inoculação sem, contudo, turvar o meio (ANVISA, 2004).

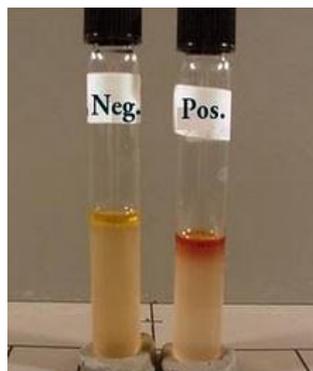
Figura 16 – Teste da motilidade.



Fonte disponível em: <http://bioftbiologia.blogspot/identificacao-bioquimica-de-bacilos.html>

O indol é resultante da degradação do aminoácido triptofano pela enzima triptofanase. A prova é positiva quando na interface da cultura após a inoculação cresce a formação de um anel de cor rósea em no máximo 5 minutos. Este resultado é devido à complexação do indol com o aldeído, em meio ácido, formando o composto colorido.

Figura 17 – Teste do indol.

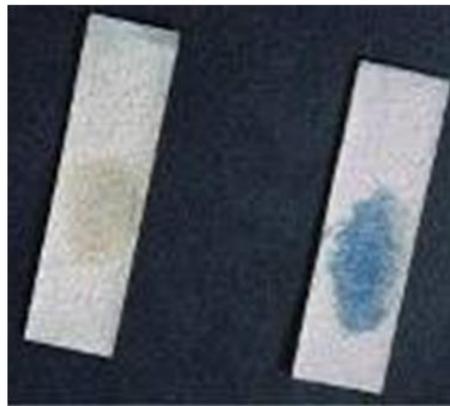


Fonte disponível em: users.stlcc.edu/k.kinser/biochem.html

A prova é negativa com qualquer outra tonalidade de cor, original do meio ou marrom (VERMELHO et al., 2006).

A prova da citocromo-oxidase consiste em colocar uma gota do reagente incolor tetrametil *p*-fenileno de amina, em um papel de filtro. Em seguida, os isolados bacterianos foram espalhados com o auxílio uma alça de platina ou de um bastão de vidro, sobre a área do papel de filtro contendo o reagente. A prova é considerada positiva quando na mistura do reagente com a massa bacteriana desenvolve-se a cor púrpura em até 1 minuto. Na reação negativa não há desenvolvimento de cor púrpura (ANVISA, 2004).

Figura 18 – Prova da citocromo-oxidase.

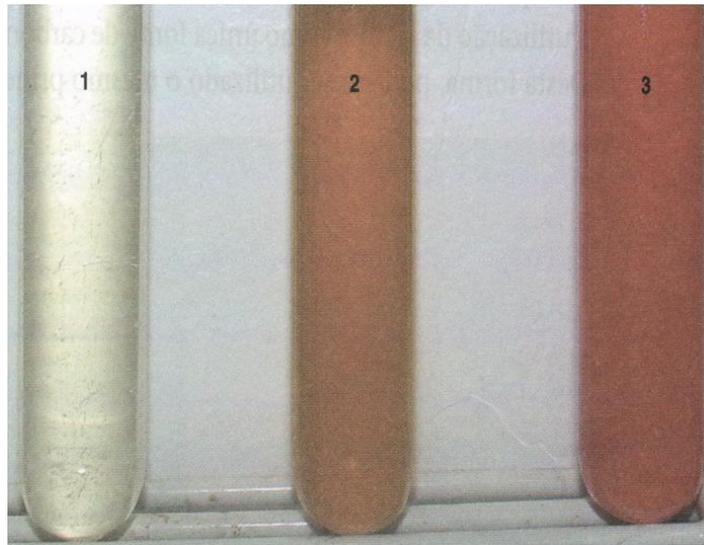


Fonte disponível em: <http://bioftbiologia.blogspot/identificacao-bioquimica-de-bacilos.html>

O caldo uréia base (HIMEDIA) é recomendado para a identificação de bactérias com base na utilização de uréia, especialmente para a diferenciação das espécies *Proteus* das espécies *Salmonella* e *Shigella*. Possui a seguinte composição química em g/L: fosfato monopotássico = 9,10; fosfato dipotássico = 9,50; extrato de levedura = 0,10; vermelho fenol = 0,01; uréia = 20,00; pH final = $6.8 \pm 0,2$ a 25°C. Os tubos contendo o caldo foram inoculados com os isolados bacterianos e incubados a 37°C por 24 horas.

A enzima urease hidrolisa a uréia em produtos finais alcalinos que promovem aumento do pH do meio, causando uma mudança de cor no indicador, que passa a ter uma coloração rosa, representando um resultado positivo para o teste (VERMELHO et al., 2006).

Figura 19 – Teste da uréase.



Fonte: Vermelho et al. (2006).

3.4 Avaliação da susceptibilidade aos antimicrobianos

A avaliação da susceptibilidade aos antimicrobianos dos isolados das amostras de água foi realizada pela metodologia de difusão de discos, por meio de suspensão bacteriana direta, segundo as normas estabelecidas pelo Manual Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI (CLSI, 2005).

O inóculo de cada cultura pura foi transferido para tubos contendo solução salina, até atingir a turbidez padrão 0,5 na escala de McFarland, que equivale a uma concentração de aproximadamente 10^8 organismos/mL. Após a obtenção da turbidez padrão, cada isolado foi semeado com auxílio de um *swab* estéril em placas de Petri contendo ágar Muller-Hinton (BIOBRÁS) meio rico em nutrientes, recomendado para a realização de antibiograma pela técnica de difusão em discos descrita pelo CLSI e que possui a seguinte composição química por g/L: hidrolisado ácido de caseína = 17,5; extrato de carne = 2,0; amido = 1,5; ágar = 17,0; pH final = $7,4 \pm 0,2$ a 25°C . A semeadura foi feita em eixos diferentes para uma completa uniformidade da placa. Os discos dos antibióticos, Diagnósticos Microbiológicos Especializados - (DME) foram depositados sobre a superfície da placa com auxílio de uma pinça estéril, mantendo distância entre os discos para evitar a superposição de halos. Após a deposição dos discos, as placas foram incubadas em posição invertida a 35°C , durante 24 horas. Findo o período de incubação, realizou-se a

medição do diâmetro da zona de inibição dos halos com o auxílio de uma régua milimétrica.

Na figura 20 encontram-se relacionados os antibióticos e as concentrações utilizados para os testes de antibiogramas. A concentração dos discos de antibiograma é padronizada pela Farmacopéia Brasileira e pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2005).

Figura 20 – Antibióticos, local de ação e concentrações utilizadas para os antibiogramas

Antibiótico	Local de ação	Concentração
Ampicilina	Parede celular	10 µg
Amoxicilina		10 µg
Cefalexina		30 µg
Ceftazidima		30 µg
Meropenem		10 µg
Oxacilina		5 µg
Penicilina G		10 µg
Vancomicina		30 µg
Clindamicina	Síntese de proteína	10 µg
Eritromicina		15 µg
Ciprofloxacina	Síntese de DNA	5 µg
Norfloxacina		10 µg
Sulfametoxazol-		25 µg
Trimetoprin		

Fonte: O Autor.

A sensibilidade ou resistência das cepas foi determinada pela medida do diâmetro do halo, em milímetros, comparativamente ao estabelecido pelo CLSI, para cada antibiótico e de acordo com a concentração mínima padronizada internacionalmente para cada droga. Assim, a cepa foi classificada como sensível (S), o isolado inibido pela dosagem ideal de um antibiótico recomendado para a infecção em questão; intermediário (I), o isolado é suprimido por uma dosagem mais alta do que a habitual ou quando a infecção causada pode ser tratada em locais do corpo onde as drogas se concentrem fisiologicamente; e como resistente (R), o isolado que não é inibido pelas concentrações normalmente prescritas em

tratamentos habituais ou pela ocorrência de mecanismos de resistência específicos (CLSI, 2005).

3.5 Classificação dos isolados resistentes a múltiplos antimicrobianos – MAR

O índice MAR (múltipla resistência antimicrobiana) foi utilizado para determinação da múltipla resistência. Este índice, quando aplicado a um isolado bacteriano, é definido como a/b , ou seja, o número de antibióticos aos quais o isolado foi resistente (a) dividido pelo número de antibióticos aos quais o isolado foi exposto (b). Índice MAR acima de 0,2 caracteriza multirresistência (KRUMPERMAN, 1983).

3.6 Tratamento e análise estatística dos dados

Para avaliação dos resultados referentes as análises microbiológicas das amostras das águas coletadas nas escolas estaduais localizadas em Boa Vista – RR, foi desenvolvida análise estatística descritiva. Entretanto, visando detectar possíveis diferenças completou-se o estudo estatístico foi feita a ANOVA, que foi realizada com o auxílio do software Microsoft Excel.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram coletadas 80 amostras de água de bebedouros e de torneiras de 20 escolas estaduais localizadas em Boa Vista, Roraima. As escolas foram selecionadas de acordo com os seguintes critérios: localização (norte, sul, leste e oeste), visando obter-se a maior abrangência possível, o quantitativo de alunos, foram selecionadas as escolas com os maiores números de matrículas e pelo tipo de tratamento que a água consumida recebe; apenas cloração ou tratamento completo, sendo coletadas 2 amostras em cada ponto dentro de cada escola.

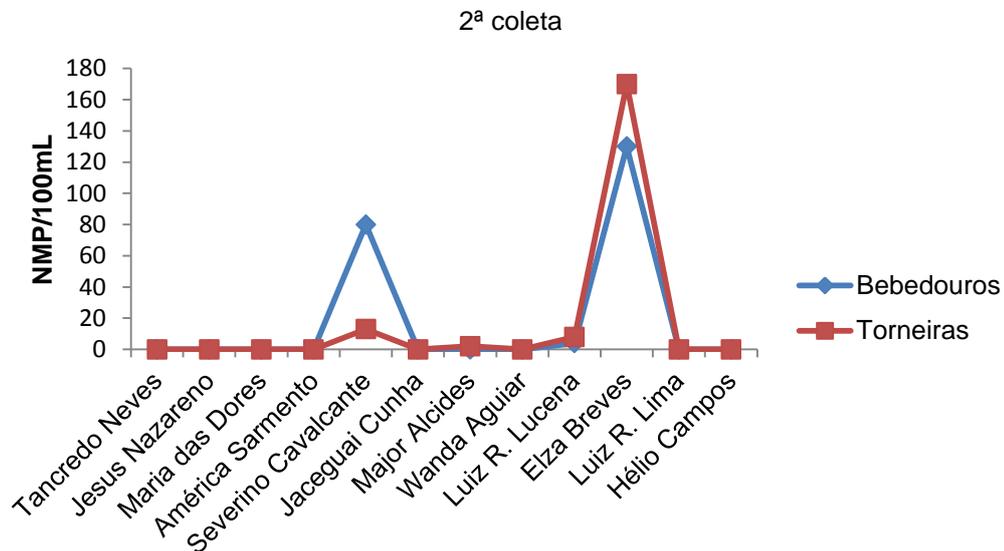
4.1 Qualidade da água submetida à cloração

Na primeira coleta, todas as amostras de água submetidas previamente ao processo de cloração, apresentaram resultados negativos para coliformes totais e coliformes termotolerantes. Como não se verificou a formação de gás em nenhuma das amostras analisadas, só foi realizado o teste presuntivo. Estes resultados estão em conformidade com a Portaria nº 518 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2004), que estabelece como padrão de potabilidade, para a água destinada ao consumo humano, com ausência de bactérias do grupo coliforme.

Resultados similares foram encontrados por Hoffman et al., (1996); Gomes et al., (2005); Lage, Badaró e Barbosa, (2008) e Pezente, (2009) ao estudarem amostras de água fervida e não fervida no preparo de mamadeiras em um hospital de São José do Rio Preto-SP, dos bebedouros de uma Instituição Federal de Ensino Superior (IFES) do sul de Minas Gerais, dos bebedouros do campus Amaro Lanari Jr. do Unileste-MG, dos bebedouros e torneiras de um escola de ensino básico de Timbé do Sul-SC, respectivamente.

O gráfico 1 expõe os resultados da 2ª coleta, das análises das amostras de água que foram submetidas apenas à cloração. Os resultados demonstram que 8 amostras de água (33,34%), das 24 amostras analisadas, apresentaram resultados positivos para coliformes totais. O que as colocam na condição de imprópria para o consumo humano.

Gráfico 1– Densidades de coliformes totais, expressas em Número Mais Provável (NMP/100 mL) em amostras de água tratada com cloração, coletadas nas escolas estaduais localizadas em Boa Vista – RR



As densidades de coliformes totais, expressas em NMP/100 mL em amostras de água tratada com cloração, coletadas nas escolas estaduais Tancredo Neves, Jesus Nazareno, Maria das Dores Brasil, América Sarmento, Severino Cavalcante, Jaceguai Cunha, Major Alcides, Wanda Aguiar, Luiz R. Lucena, Elza Breves, Luiz R. Lima e Hélio Campos localizadas em Boa Vista – RR foram analisadas através de Anova, não sendo observadas diferenças significativas entre elas. O grau confiança igual a 95% de probabilidade, não rejeitamos H_0 .

Podemos observar que a amostra que apresentou a maior densidade de coliformes totais foi a coletada no ponto 30 (torneira da copa da Escola Elza Breves) com 170 NMP/100 mL, seguida da amostra coletada no ponto 29 (bebedouro da Escola Elza Breves), com 130 NMP/100 mL de água. A amostra coletada no ponto 24 (torneira da copa da Escola Major Alcides – bairro Asa Branca) foi a que apresentou a menor densidade, 2 NMP/100 mL de água. Essas variações observadas nos resultados indicam a falta de padrão de qualidade da água fornecida para a população. A Escola Elza Breves atende um contingente de 1388 alunos, na sua maioria do ensino fundamental. Está localizada no bairro conjunto Cidadão, zona oeste da capital de Boa Vista – RR, sendo um dos bairros mais afastados do centro. A amostra de água coletada nesta escola foi a que apresentou a maior

densidade de coliformes totais e foi a única a apresentar coliformes termotolerantes, isso mostra a necessidade de adoção de medidas visem sanar esse problema.

Nossos resultados se assemelham aos obtidos por Zulpo et al., (2006) que, avaliando 47 amostras de água consumidas nos bebedouros da Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava – PR, constataram 4 (8,5%) amostras positivas para coliformes totais e 1 (2%) para coliformes termotolerantes, enquanto que Barreto (2009), analisando amostras de água fornecida às unidades de alimentação de regiões administrativas do Distrito Federal, verificou que, das 40 amostras analisadas, 25% apresentaram contaminação por coliformes totais e 15% para coliformes termotolerantes. Siqueira et al., (2010), avaliando amostras de água de consumo empregadas em unidades de alimentação, verificaram que, das 40 amostras coletadas 62,5% apresentaram contaminação por coliformes totais e 42,5% por coliformes termotolerantes, valores muito superiores aos encontrados nesta pesquisa.

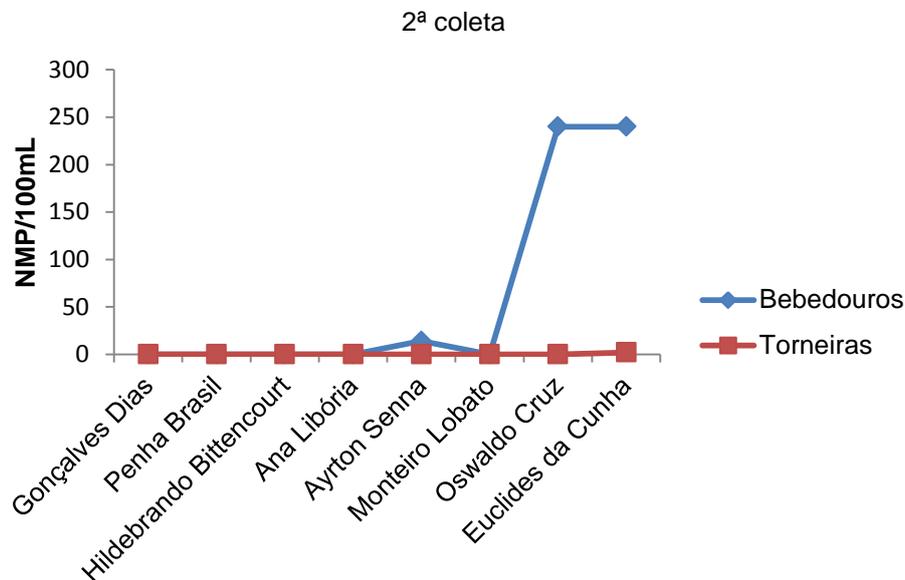
4.2 Qualidade da água submetida a tratamento completo

A água que foi submetida ao tratamento completo sofreu os processos de: coagulação, floculação, decantação, filtração, correção de pH, cloração e fluoretação, para só então, serem distribuídas à cidade.

O gráfico 2, podemos observar que das 16 amostras de águas que receberam tratamento completo coletadas na 2ª coleta, quatro (25%) apresentaram resultado positivos para coliformes totais, o que de acordo com a Portaria nº 518/2004 do Ministério da Saúde as tornam impróprias para o consumo humano.

As densidades de coliformes totais, expressas em NMP/100 mL em amostras de água submetidas ao tratamento completo, coletadas nas escolas estaduais Gonçalves Dias, Penha Brasil, Hildebrando Bittencourt, Ana Libória, Ayrton Senna, Monteiro Lobato, Oswaldo Cruz e Euclides da Cunha, localizadas em Boa Vista – RR foram analisadas através de Anova, não sendo observadas diferenças significativas entre elas. O grau confiança igual a 95% de probabilidade, não rejeitamos H_0 .

Gráfico 2 – Densidades de coliformes totais e termotolerantes, expressas em Número Mais Provável (NMP/100 mL) em amostras de água submetidas ao tratamento completo, coletadas nas escolas estaduais localizadas em Boa Vista – RR



Podemos observar que as amostras que apresentaram maiores densidade de coliformes totais foram as coletadas nos pontos 37 e 39 (bebedouros das Escolas Oswaldo Cruz e Euclides da Cunha) com 240 NMP/100 mL de água, enquanto a amostra que apresentou menor densidade de coliformes totais foi a coletada no ponto 40 (torneira da copa da Escola Euclides da Cunha).

Nossos resultados foram inferiores aos obtidos por Büchele, Rizzardi e Amaral, (2010) que, avaliando a qualidade da água de escolas do interior do município de Cruz Alta – RS constataram 33% de amostras contaminadas com coliformes totais e ausência de coliformes termotolerantes. Pongeluppe et al., (2009), avaliando amostras de água em bebedouros localizados em uma instituição de ensino de Guarulhos – SP constataram contaminação por coliformes totais em 20% das amostras e ausência de coliformes termotolerantes.

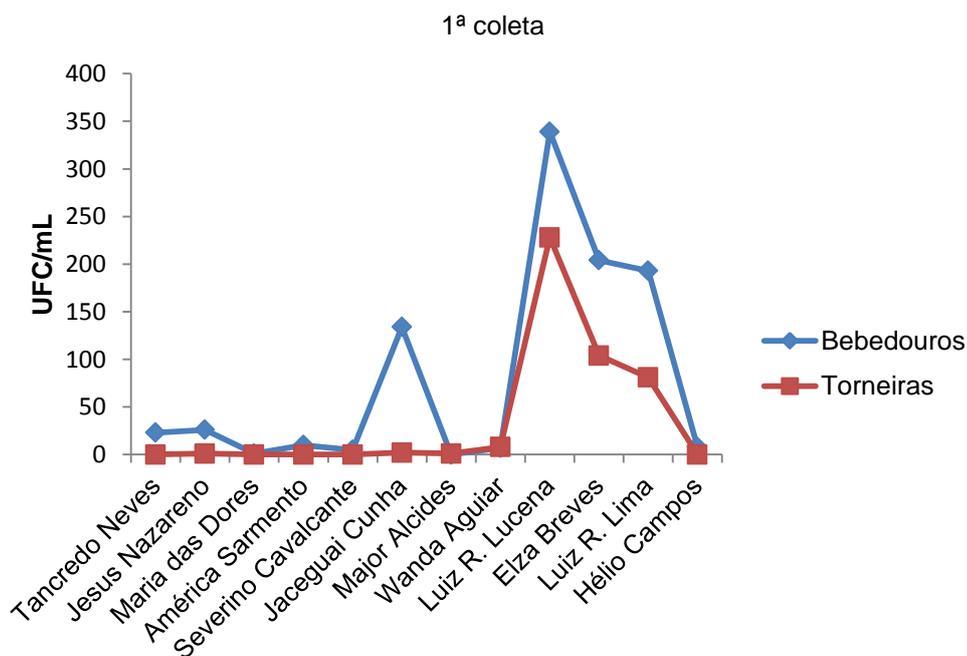
4.3 Bactérias heterotróficas isoladas das amostras de água

A Portaria 518/2004/MS no artigo 11, parágrafo 7º estabelece que, em 20% das amostras mensais para análise de coliformes totais nos sistemas de distribuição,

deve ser efetuada a contagem de bactérias heterotróficas e, uma vez excedidas 500 unidades formadoras de colônia (UFC) por mL, devem ser providenciadas imediatas recoletas, inspeção local e, se constatada irregularidade, outras providências cabíveis. A importância da determinação da densidade de bactérias heterotrófica se justifica pelo fato de que um aumento desta população bacteriana pode comprometer a detecção de bactérias do grupo coliformes. Apesar da maioria das bactérias heterotróficas não ser patogênica, pode representar riscos à saúde, como também deteriorar a qualidade da água, provocando sua presença o aparecimento de odores e sabores desagradáveis (FUNASA, 2006).

Nos gráficos 3, observa-se que, na 1ª coleta de amostras de águas tratadas com cloração não houve contagem de coliformes totais e termotolerantes, mas das 24 amostras analisadas, 9 (37,5%), apresentaram contagens para bactérias heterotróficas, cuja densidade variou de $2,3 \times 10$ (ponto 9 – bebedouro da Escola Tancredo Neves – bairro T. Neves) a $3,39 \times 10^2$ UFC/ mL (ponto 27 – bebedouro da Escola Luiz R. de Lucena – bairro Nova Cidade).

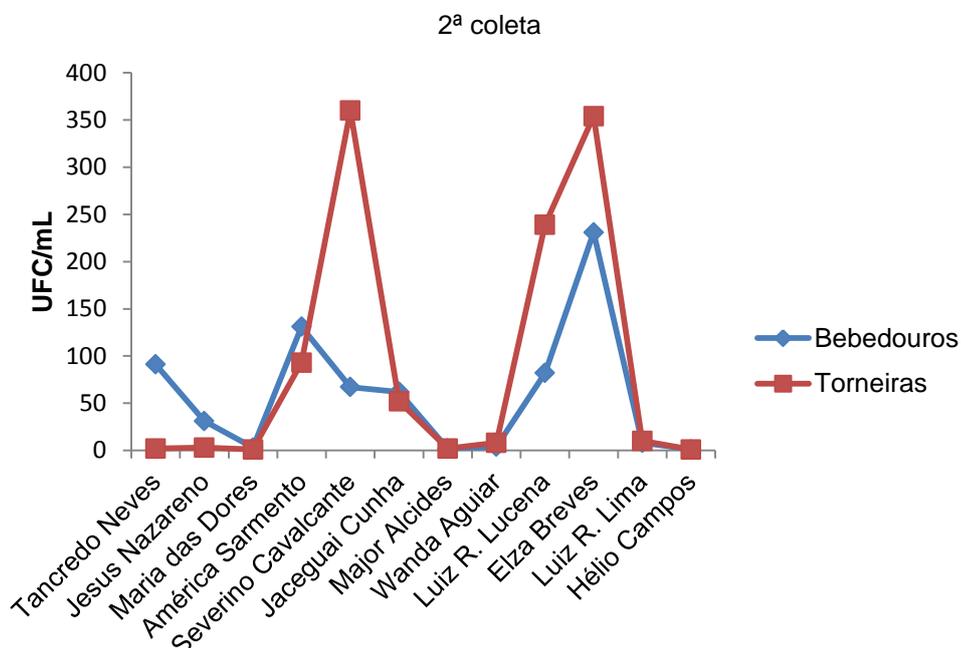
Gráfico 3 – Densidades de bactérias heterotróficas presentes em amostras de água, tratada com cloração, coletadas nas escolas estaduais localizadas em Boa Vista – RR



As densidades de bactérias heterotróficas presentes em amostras de água tratada com cloração, coletadas nas escolas estaduais Tancredo Neves, Jesus Nazareno, Maria das Dores Brasil, América Sarmento, Severino Cavalcante, Jaceguai Cunha, Major Alcides, Wanda Aguiar, Luiz R. Lucena, Elza Breves, Luiz R. Lima e Hélio Campos localizadas em Boa Vista – RR foram analisadas através de Anova, não sendo observadas diferenças significativas entre elas. O grau confiança igual a 95% de probabilidade, não rejeitamos H_0 .

Na 2ª coleta de amostras de águas tratadas apenas com cloração, gráfico 4, em 13 (54,17%) das amostras, observou-se a formação de colônias de bactérias heterotróficas. A densidade de bactérias heterotróficas variou de $1,4 \times 10$ (ponto 25 – bebedouro da Escola Wanda D. Aguiar – bairro Raiar do Sol) a $3,6 \times 10^2$ UFC/mL (ponto 20 – torneira da Escola Severino Cavalcante – bairro Silvio Botelho).

Gráfico 4 – Densidades de bactérias heterotróficas presentes em amostras de água, tratada com coloração, coletadas nas escolas estaduais localizadas em Boa Vista – RR



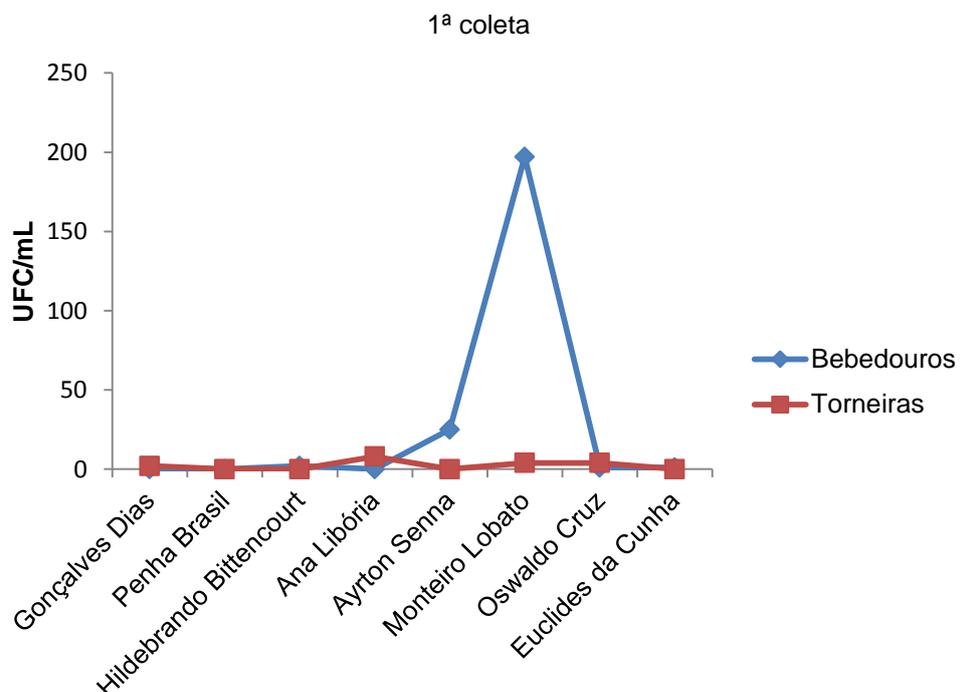
Convêm ressaltar que, as amostras do ponto 29 (bebedouro da Escola Elza Breves), que apresentou coliformes totais, e ponto 30 (torneira da copa da mesma escola), que apresentou coliformes totais e termotolerantes, também apresentaram

densidade elevada de bactérias heterotróficas. Nessa e na maioria das escolas os bebedouros necessitam de manutenção e as torneiras das copas não possuem filtros. Este fato torna ainda mais preocupante a condição da água consumida naquela escola.

As densidades de bactérias heterotróficas presentes em amostras de água tratada com cloração, coletadas nas escolas estaduais Tancredo Neves, Jesus Nazareno, Maria das Dores Brasil, América Sarmiento, Severino Cavalcante, Jaceguai Cunha, Major Alcides, Wanda Aguiar, Luiz R. Lucena, Elza Breves, Luiz R. Lima e Hélio Campos localizadas em Boa Vista – RR foram analisadas através de Anova, não sendo observadas diferenças significativas entre elas. O grau confiança igual a 95% de probabilidade, não rejeitamos H_0 .

Os resultados das contagens de bactérias heterotróficas, em UFC/mL, encontradas nas amostras de água, que receberam tratamento completo, da 1ª e 2ª coletas, podem ser vistos nos gráficos 5 e 6, respectivamente.

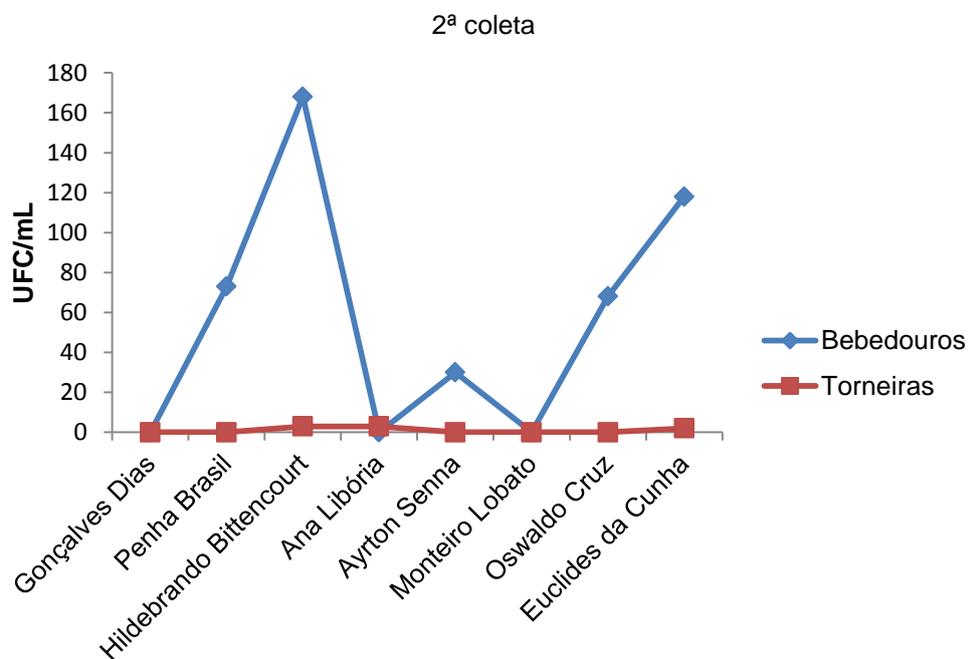
Gráfico 5 - Densidades de bactérias heterotróficas presentes em amostras de águas submetidas ao com tratamento completo, coletadas nas escolas estaduais localizadas em Boa Vista – RR



As densidades de bactérias heterotróficas presentes em amostras de água submetidas ao tratamento completo, coletadas nas escolas estaduais Gonçalves Dias, Penha Brasil, Hildebrando Bittencourt, Ana Libória, Ayrton Senna, Monteiro Lobato, Oswaldo Cruz e Euclides da Cunha, localizadas em Boa Vista – RR foram analisadas através de Anova, não sendo observadas diferenças significativas entre elas. O grau confiança igual a 95% de probabilidade, não rejeitamos H_0 .

Na 1ª coleta de amostras de água com tratamento completo, das 16 amostras coletadas 2 (12,5%) apresentaram contagem de bactérias heterotróficas: as amostras de águas coletadas nos pontos 3 (bebedouro da Escola Penha Brasil – bairro Aparecida), apresentou contaminação por bactérias heterotróficas com $2,5 \times 10$ UFC/mL de água e as coletadas no ponto 35 (bebedouro da Escola Monteiro Lobato – bairro Centro), com $1,97 \times 10^2$ UFC/mL de água.

Gráfico 6 - Densidades de bactérias heterotróficas presentes em amostras de águas submetidas ao com tratamento completo, coletadas nas escolas estaduais localizadas em Boa Vista – RR



As densidades de bactérias heterotróficas presentes em amostras de água submetidas ao tratamento completo, coletadas nas escolas estaduais Gonçalves Dias, Penha Brasil, Hildebrando Bittencourt, Ana Libória, Ayrton Senna, Monteiro

Lobato, Oswaldo Cruz e Euclides da Cunha, localizadas em Boa Vista – RR foram analisadas através de Anova, foram observadas diferenças significativas entre elas. O grau confiança igual a 95% de probabilidade, rejeitamos H_0 .

Na 2ª coleta de amostras de água com tratamento completo, 5 (31,25%) das amostras confirmaram presença de bactérias heterotróficas. A que apresentou menor densidade foi a coletada no ponto 13 (bebedouro da Escola Ayrton Senna – Centro) e a maior densidade foi na amostra coletada no ponto 5 (bebedouro da Escola Hildebrando F. Bittencourt – bairro dos Estados), com $1,68 \times 10^2$ UFC/mL de água. Tanto na 1ª como na 2ª coleta, constatou-se variação na densidade de bactérias heterotróficas nas amostras de água analisada, o que reforça o argumento da instabilidade no padrão da qualidade da água fornecida a população. Conforme se pode perceber, em nenhuma das amostras a contagem ultrapassou o valor permitido de 500 UFC/mL (BRASIL, 2004), o que as classificam como própria para o consumo humano, no entanto a presença de bactérias patogênicas, não relacionadas na legislação vigente, pode representar riscos para a saúde da população.

Os pontos que são abastecidos com água de poços tubulares que receberam apenas a cloração apresentaram maior contaminação se comparados com os pontos abastecidos com água superficiais, que recebem tratamento completo. Na 1ª coleta o ponto 27 - bebedouro da Escola Luiz R. de Lucena (tabela 4) foi o que apresentou maior contaminação ($3,39 \times 10^2$ UFC/mL), enquanto na segunda, destacou-se o ponto 20 - torneira da copa da Escola Severino Cavalcante (tabela 4) com $3,6 \times 10^2$ UFC/mL. Os resultados demonstram uma variação na densidade de bactérias heterotróficas, o que confirma a instabilidade no padrão da qualidade da água fornecida a população.

Considerando o número total de pontos, as amostras coletadas nos bebedouros apresentaram 72,4%, e as amostras das torneiras das copas, 27,6% de contaminação por bactérias heterotróficas. Quando comparamos as amostras de água que receberam tratamento completo com as que receberam apenas cloração, verificamos que, apenas 24,1% das amostras contaminadas eram amostras que receberam tratamento completo, enquanto que 75,9% eram das amostras que receberam apenas cloração. Alguns bebedouros estão localizados próximos aos banheiros, além de se encontrarem mal conservados, apresentando torneiras quebradas, saídas de água entupidas, indicando, em alguns casos, ausência de

manutenção o que pode ser a causa dessa contaminação. Em trabalho semelhante, Pezente (2009), analisando amostras de água de torneiras, obteve o mínimo de 1 UFC/mL e o máximo de $6,5 \times 10$ UFC/mL de água, já em amostras de água de bebedouro, verificou que a quantidade de UFC/mL de água, variou de 3 a $3,2 \times 10$ UFC/mL de água, valores bem abaixo dos encontrados na presente pesquisa. Büchele, Rizzardi e Amaral (2010), pesquisando bactérias heterotróficas em amostras de água de três escolas municipais da área rural de Cruz Alta, RS, verificaram que em nenhuma amostra coletada de bebedouros foi encontrada bactérias heterotróficas, já nas amostras coletadas das torneiras das copas, duas estavam contaminadas com bactérias heterotróficas. Esses resultados diferem destes, onde foi constatada uma maior contaminação nas amostras de água coletadas nos bebedouros em comparação com as amostras de água coletadas das torneiras das copas.

Em nenhuma das amostras analisadas, a contagem de bactérias heterotróficas ultrapassou o valor permitido pela legislação vigente, 500 UFC/mL de água. Pesquisas sobre presença de bactérias heterotróficas em bebedouros e torneiras de instituições de ensino já foram realizadas anteriormente, mostrando uma variação muito grande nos resultados. Bomfim et al., (2007) pesquisando a qualidade da água de abastecimento do laboratório de bromatologia da URRJ e Pongeluppe et al., (2009) , avaliando a qualidade da água em bebedouros de uma instituição de ensino de Guarulhos – SP, não encontraram nenhuma amostra contaminada com bactérias heterotróficas, enquanto que, Gomes et al., (2005) verificaram que 25% das amostras de água de bebedouros de uma IFES do sul de Minas Gerais, ultrapassaram o valor permitido pela Portaria 518/2004 do Ministério da Saúde. Valor semelhante foi encontrado por Lage, Badaró e Barbosa (2008) em monitoramento da qualidade microbiológica da água dos bebedouros do Campus Amaro Lanari Jr. do Unileste – MG, que também verificaram que 25% de suas amostras estavam contaminadas com mais de 500 UFC/mL. Já Carvalho et al., (2009), avaliando a qualidade microbiológica da água de 21 bebedouros de um campus universitário de Ipatinga – MG, verificaram que 100% das amostras ultrapassaram o valor permitido.

A água pode ser contaminada no ponto de origem, durante a sua distribuição e, principalmente, nos reservatórios, sejam eles de empresas ou domiciliares. Segundo Germano e Germano (2001), as causas mais frequentes de contaminação

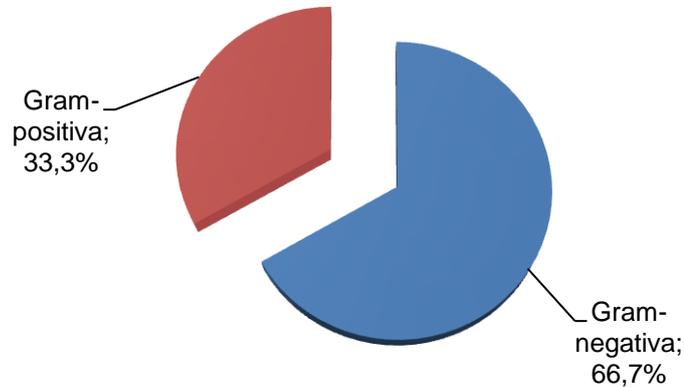
da água nesses reservatórios são vedação inadequada das caixas d'água e cisternas, além da carência de um programa de limpeza e desinfecção regular e periódica.

A garantia da qualidade microbiológica da água de consumo empregada nessa pesquisa está sob a responsabilidade da concessionária de água estadual. Deste modo, supõe-se que a água que chega aos estabelecimentos estudados está em conformidade com os padrões microbiológicos estabelecidos pela legislação. No entanto, os resultados obtidos indicam que um grande percentual de amostras estava contaminado com bactérias heterotróficas que geralmente estão associadas a gastroenterites. Entretanto, dentro dos padrões da legislação a identificação dessas bactérias não é obrigatória, reacendendo a discussão sobre a inclusão de outros indicadores biológicos. Este fato provavelmente deve ser decorrente da não adoção de boas práticas físico-sanitárias nos reservatórios e/ou pontos de consumo (PAYMENT et al., 1991).

4.4 Caracterização dos isolados

As colônias das bactérias foram agrupadas por morfotipos, obtendo-se 226 isolados. Destes foram selecionados 44 isolados, os quais foram submetidos à prova bioquímica. Como se pode observar no gráfico 7, após a realização da prova bioquímica, foram caracterizados 12 isolados, sendo 08 de bactérias Gram-negativas (66,7%), *C. violacea*, *Cocobacillus* spp., *Leptothrix* spp., *E. coli*, *E. aerogenes*, *K. ozaenae*, *Acinetobacter* spp. e Bacilo Gram-negativo não fermentador de glicose e 4 de bactérias Gram-positivas (33,3%), *Bacillus subtilis*, *Micrococcus* ssp., *S. aureus* e *Staphylococcus* ssp.

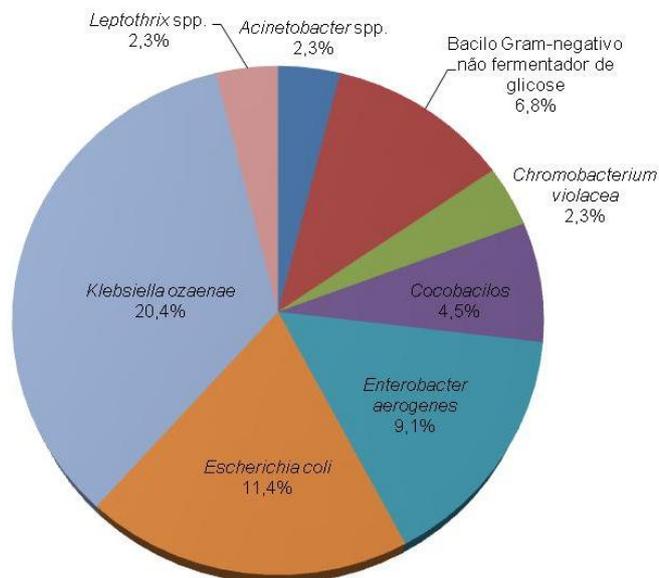
Gráfico 7 - Porcentagens de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas isoladas a partir de amostras de águas coletadas nas escolas estaduais localizadas em Boa Vista – RR



Os resultados obtidos nessa pesquisa são diferentes dos obtidos por Pezente (2009), que ao realizar a análise microbiológica de amostras de água coletadas de uma escola de educação básica de Timbé do Sul – SC., encontrou 42,8% de bactérias Gram-negativas e 57,1% de bactérias Gram-positivas.

As porcentagens da incidência das espécies de bactérias Gram-negativas identificadas nas amostras de água se encontram no gráfico 8.

Gráfico 8 – Incidência de bactérias Gram-negativas, isoladas a partir de amostras de água coletadas nas escolas estaduais localizadas em Boa Vista – RR



Acinetobacter spp., foi isolada das amostras de águas coletadas no ponto 27 (bebedouro da Escola Luiz R. Lucena – bairro Nova Cidade). *Acinetobacter* é um gênero de cocobacilo Gram-negativo, aeróbio estrito. Esta espécie bacteriana pode viver na água e no solo úmido, podendo ser encontrados na microbiota normal humana, inclusive na pele, conjuntiva, nariz, faringe e trato gastrointestinal. É normalmente comensal, ocasionando frequentemente infecção hospitalar, e é o segundo organismo não fermentador encontrado em laboratório clínico, após *P. aeruginosa*. Pode ocasionar pneumonia, bacteremia, endocardite, infecções do trato urinário, meningite, peritonite em pacientes com diálise peritoneal, infecções de pele e feridas, celulite, bem como casos esporádicos de conjuntivite, otite média, osteomielite e sinovite. Em pacientes com queimaduras ou imunodeficientes, atua como patógeno oportunista (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

Bacilo Gram-negativo não fermentador de glicose foi isolado das amostras de água dos seguintes pontos: 15 (bebedouro da Escola Maria das Dores Brasil – bairro 13 de setembro), 25 (bebedouro da Escola Wanda D. Aguiar – bairro Raiar do Sol), 37 (bebedouro da Escola Oswaldo Cruz – Centro), embora a incidência desta bactéria mesmo em hospitais seja pequena quando comparada a outros agentes etiológicos, geralmente apresentam resistência elevada a vários antibióticos e são capazes de causar infecções graves. Estas bactérias colonizam e causam infecções, em especial, em pacientes graves oriundos de CTI e submetidos à procedimentos invasivos (ANVISA, 2004).

C. violacea foi isolada da amostra coletada no ponto 27 (bebedouro da Escola Luiz R. Lucena – bairro Nova Cidade). Esta espécie é encontrada na natureza no solo e na água. A infecção em geral, está relacionada a lesões cutâneas. Lesões localizadas ou formas septicêmicas graves com múltiplos abscessos têm sido esporadicamente relatadas. Mais raramente diarreia e infecção urinária (ANVISA, 2004).

Cocobacilos foram isoladas das amostras de águas coletadas nos pontos: 28 (torneira da copa da Escola Luiz R. Lucena – bairro Nova Cidade) e 32 (torneira da copa da Escola Luiz Ribeiro de Lima – bairro Equatorial). Este gênero inclui bactérias Gram-negativas, aeróbios. Uma das espécies mais importantes do ponto de vista médico é a *Gardnerella vaginalis*, faz parte de microbiota normal do corpo de 69% das mulheres assintomáticas, mas também está associada ao corrimento vaginal, é caracterizado por odor fétido e as secreções apresentam um pH acima de

4,5. Tem importante papel no aborto séptico, na endometrite pós-parto e na infecção pós-cesárea, podendo também causar sepse e infecção de partes moles em recém-nascidos (TRABULSI e ALTERTHUM, 2008).

E. aerogenes foi isolada das amostras de água coletadas nos pontos: (13 bebedouro da Escola Ayrton Senna – Centro), 15 (bebedouro da Escola Maria das Dores Brasil – bairro 13 de setembro), 17 (bebedouro da Escola América Sarmento – bairro Sílvio Botelho) e 26 (torneira da copa da Escola Wanda D. Aguiar – bairro Raiar do Sol). Esta espécie é associada à infecção nosocomial pode causar doenças associadas à bacteremia e síndrome séptica em vários locais, principalmente nos tratos urinários e respiratórios (RABELLO; GODOY; SANTOS, 2001).

E. coli foi isolada das amostras de águas coletadas nos pontos: (20 torneira da copa da Escola Severino Cavalcante – bairro Sílvio Botelho), (26 torneira da Escola Wanda D. Aguiar – bairro Raiar do Sol), 29 e 30 (bebedouro e torneira da copa, respectivamente, da Escola Elza Breves – bairro conjunto Cidadão) e 32 (torneira da copa da Escola Luiz Ribeiro de Lima – bairro Equatorial). Apesar de habitar normalmente o aparelho gastrointestinal, certas variedades podem provocar diarreia com sangue, aquosa ou inflamatória (diarreia do viajante). Nas crianças, a diarreia provocada pela *E. coli* entero-hemorrágica pode desencadear a síndrome hemolítico-urémica, uma doença que destrói os glóbulos vermelhos e causa insuficiência renal. *E. coli* é também causa frequente de infecções das vias urinárias e pode infectar a corrente sanguínea, a vesícula biliar, os pulmões e a pele. Entre os recém-nascidos. Causa bacteriemia e meningite, em especial nos prematuros. Em geral começa-se imediatamente o tratamento com antibióticos, o que depois se altera se os resultados da cultura efetuada demonstrar que há outro antibiótico que se revela mais eficaz. Para uma infecção simples das vias urinárias, administra-se uma sulfamida por via oral. As infecções graves requerem antibióticos por via endovenosa. As infecções por *Klebsiella* e *Enterobacter* costumam ser contraídas no hospital, principalmente por doentes com uma capacidade reduzida para combater as infecções. Estas bactérias costumam infectar as mesmas zonas do organismo que a *E. coli*. A pneumonia por *Klebsiella* é uma infecção pulmonar rara, mas grave, que afeta especialmente os diabéticos e os alcoólatras. O doente pode expectorar escarros de cor castanho-escura ou vermelho-escura. A pneumonia pode provocar abscessos nos pulmões e acumulações de pus no revestimento pulmonar (empiema). Se for tratada com antecipação suficiente, a pneumonia pode ser curada

com antibióticos endovenosos, geralmente cefalosporinas ou quinolonas (MERCK, 2010).

Klebsiella ozaenae foi isolada das amostras de águas coletadas nos pontos: 9 (bebedouro da Escola Tancredo Neves – bairro Tancredo Neves), 15 e 16 (bebedouro e torneira da copa, respectivamente, da Escola Maria das Dores Brasil – bairro 13 de setembro), 17 e 18 (bebedouro e torneira da copa, respectivamente, da Escola América Sarmiento – bairro Sílvio Botelho), 21 (bebedouro da Escola Jaceguai Cunha – bairro Asa Branca), 25 e 26 (bebedouro e torneira da copa, respectivamente, da Escola Wanda D. Aguiar – bairro Raiar do Sol) e 27 (bebedouro da Escola Luiz R. de Lucena – bairro Nova Cidade).

Os membros do gênero *Klebsiella* possuem uma cápsula proeminente que é responsável pela aparência mucóide das colônias isoladas e pela virulência aumentada dos micro-organismos *in vivo*. Atribui-se *K. ozaenae* à etiologia da ozena, que corresponde a uma rinite atrófica crônica, acompanhada de secreção nasal mucopurulenta fétida. Por ser raro esta bactéria causar infecções humanas, são poucos os estudos publicados sobre a sua patogenicidade. É possível que a *Klebsiella* seja apenas um invasor secundário e não o agente da doença (MURRAY et al., 1992).

Leptothrix spp., foi isolada da amostra de água coletada no ponto 31 (bebedouro da Escola Luiz Ribeiro de Lima – bairro Equatorial). É um bacilo que se assemelha a finos pêlos. O seu grande tamanho propicia curvaturas que lembram letras (S, U e C). Incidem em 0,2 % dos exames colpocitológicos de rotina e em 0,3 % das vaginites citologicamente específicas (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

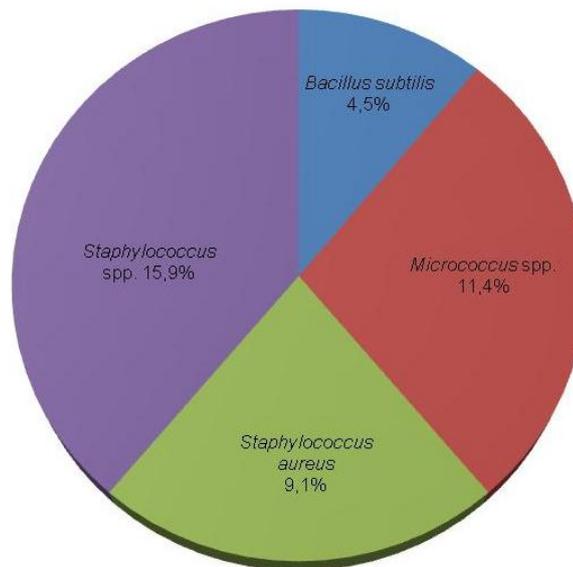
Na presente pesquisa o gênero *Staphylococcus* representou (25%) do total das bactérias Gram-positivas isoladas, porcentagem muito superior a encontrada por Jeena et al., (2006), que analisando amostras de águas engarrafadas vendidas na Índia, constatou que o gênero *Staphylococcus* representou (13,4%) do total das bactérias isoladas.

A incidência de bactérias Gram-positivas identificadas nas amostras de água está exposta no gráfico 9.

Bacillus subtilis foi isolada das amostras de águas coletadas nos pontos 28 (torneira da copa da Escola Luiz R. Lucena – bairro Nova Cidade) e 29 (bebedouro da Escola Elza Breves – bairro Conjunto Cidadão). Os organismos dessa espécie não são patogênicos, são Gram-positivos, saprófitos, podem ser encontrados tanto

em solo como em água. São bacilos conhecidos como “bacilos da grama” ou “bacilos de feno”, toleram condições ambientais atípicas, por isso estão presentes com frequência nos alimentos estragados, conferindo aquela “aparência liguenta” ao arroz, bolos ou ao pão, por exemplo (MERCK, 2010).

Gráfico 9 – Incidência de bactérias Gram-positivas, isoladas a partir de todas as amostras de água, coletadas nas escolas estaduais localizadas em Boa Vista – RR.



Micrococcus spp. foi isolada das amostras de águas coletadas nos pontos 11 (bebedouro da Escola Jesus Nazareno – bairro Caranã), 13 (bebedouro da Escola Ayrton Senna – Centro), 19 (bebedouro da Escola Severino Cavalcante – bairro Sílvio Botelho) e 21 e 22 (bebedouro e torneira da copa, respectivamente, da Escola Jaceguai Cunha – bairro Asa Branca). São aeróbios estritos, catalase positivos, ocorrendo isolados ou aos pares, dividindo-se formando aglomerados. Têm capacidade de se multiplicar na presença de 5% de NaCl. São encontrados no solo, água, pó e na pele do homem e dos animais. São comumente encontrados nos alimentos, especialmente leite e derivados, carcaças de animais e produtos cárneos. São importantes agentes de deterioração de alimentos. (FRANCO e LANDGRAF, 2008). De modo geral, os *Micrococcus* são micro-organismos do meio ambiente que às vezes são encontrados transitoriamente na pele do ser humano e, muito raramente, associados a infecções, tais como abscessos, pneumonia, bacteremia,

artrite séptica e meningite. Nestes casos, geralmente a espécie envolvida é *M. luteus*. (TRABULSI et al, 2008).

Staphylococcus aureus foi isolada das amostras de águas coletadas nos pontos: 5 (bebedouro da Escola Hildebrando F. Bittencourt – bairro dos Estados), 16 (torneira da copa da Escola Maria das Dores Brasil – bairro 13 de setembro), 20 (torneira da copa da Escola Severino Cavalcante – bairro Sílvio Botelho) e 35 (bebedouro da Escola Monteiro Lobato – Centro).

Staphylococcus são parasitas comuns de humanos e animais, ocasionalmente causando infecções graves. Em humanos, são reconhecidas duas espécies principais: *Staphylococcus epidermidis* – um organismo não pigmentado, não patogênico, normalmente encontrado na pele ou nas membranas mucosas – e *Staphylococcus aureus* – uma espécie com pigmentação amarela, mais comumente associada a condições patológicas, incluindo furúnculos, acne, pneumonia, osteomielite, meningite e artrite.

Staphylococcus spp. foi isolada das amostras de águas coletadas nos pontos: 21 (bebedouro da Escola Jaceguai Cunha – bairro Asa Branca), 25 (bebedouro da Escola Wanda D. Aguiar – bairro Raiar do Sol), 27 e 28 (bebedouro e torneira da copa, respectivamente, da Escola Luiz R. de Lucena – bairro Nova Cidade), 37 (bebedouro da Escola Oswaldo Cruz – Centro) e 39 e 40 (bebedouro e torneira da copa, respectivamente, da Escola Euclides da Cunha – Centro).

4.5 Resistência aos antimicrobianos

A Norma publicada pelo National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2003) que padroniza o teste de Disco-Difusão foi traduzida pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em 2003. Entretanto, todos os anos são publicadas atualizações pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), e a mais recente, CLSI 2010, preconiza a utilização do documento M45 – (Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of infrequently Isolated or Fastidious Bacteria (CLSI, 2005), que traz as interpretações dos termos utilizados para a classificação dos micro-organismos diante da atuação dos antibióticos, considerando sensível o isolado inibido pela dosagem ideal de um antibiótico recomendado para a infecção em questão; intermediário o isolado que é suprimido

por uma dosagem mais alta do que a habitual ou quando a infecção causada pode ser tratada em locais do corpo onde as drogas se concentrem fisiologicamente; e como resistente o isolado que não é inibido pelas concentrações normalmente prescritas em tratamentos habituais ou pela ocorrência de mecanismos de resistência específicos (CLSI, 2005).

Os resultados dos testes de sensibilidade aos antibióticos (tabela 8) revelaram que a maioria das bactérias heterotróficas isoladas das amostras de água dos bebedouros e das torneiras das copas das escolas foi resistente a ampicilina (68,2%).

Os resultados da avaliação da resistência de bactérias aos antibióticos se encontram na tabela 1.

Tabela 1 – Resistência de bactérias heterotróficas aos antibióticos testados

Antibióticos	resistência	resistência intermediária (%)
Ampicilina	68,2	9,1
Amoxicilina	9,1	-
Cefalexina	31,8	-
Ceftazidima	-	4,5
Ciprofloxacina	-	-
Clindamicina	4,5	-
Eritromicina	22,7	-
Meropenem	22,7	-
Norfloxacina	4,5	-
Oxacilina	27,3	-
Penicilina G	4,5	-
Vancomicina	18,2	-
Sulfametoxazol/trimetoprin	9,1	-

(-) = sensível.

Nossos resultados são semelhantes aos obtidos por Mary, Defives e Hornez (2000), que analisando água mineral da França, constatou que 70% das bactérias heterotróficas isoladas foram resistentes a ampicilina, e Jeena et al., (2006), que constatou que 61% das bactérias heterotróficas isoladas das amostras de água comercializadas na Índia, eram resistentes a ampicilina e abaixo dos encontrados

por Papandreou et al., (2000), que verificou que 77,5% das bactérias isoladas das amostras de água potável na Grécia.

Nesta pesquisa 9,1% dos isolados revelaram resistência intermediária a ampicilina e 4,5% foram resistentes a ceftazidima. Não verificamos resistência a ciprofloxacina e nem a ceftazidima. A menor resistência verificada foi contra a clindamicina, norfloxacin e a penicilina G, seguida pela resistência a amoxicilina e a sulfametoxazol/trimetoprim.

Cepas resistentes a mais de dois antibióticos foram consideradas resistentes a múltiplos antibióticos, deixando 38,5% dos isolados Gram-negativos e 28,6% dos isolados Gram-positivos encontrados na presente investigação nessa categoria (tabela 9 e 10).

4.5.1 Resistência das bactérias Gram-positivas aos antimicrobianos

O isolamento de estafilococos resistentes às penicilinas pôde ser observado logo após os primeiros experimentos com a introdução da penicilina G na clínica em 1941, registrando-se em 1944 e 1945 índices de resistência de 12 a 22% (MOREIRA, 1995).

Nos dias atuais, em praticamente todas as partes do mundo, os estafilococos comunitários, sejam coagulase-positivo ou coagulase-negativo, mostram elevada resistência (acima de 70%) à benzilpenicilina (penicilina G), bem como à penicilina V, ampicilina, amoxicilina e carbenicilina (MOREIRA, 1995). Para combater estes estafilococos foram descobertas as penicilinas antiestafilocócicas, tais como a metecilina e a oxacilina e seus derivados, e as cefalosporinas da primeira e segunda gerações (TAVARES, 2000).

No Brasil, na atualidade, os estafilococos, tanto o *S. aureus* como o *S. epidermidis*, mostram-se resistentes à penicilina G, ampicilina e amoxicilina em mais de 70% das cepas isoladas, seja em ambiente hospitalar ou na comunidade, não sendo mais indicado o uso destes antimicrobianos para o tratamento de infecções estafilocócicas, mesmo que benignas e mesmo que procedam do ambiente extra-hospitalar (PINTO et al., 1996).

O índice MAR foi utilizado para determinação da múltipla resistência. Este índice, quando aplicado a um isolado bacteriano, é definido como a/b, ou seja, o

número de antibióticos aos quais o isolado foi resistente (a) dividido pelo número de antibióticos aos quais o isolado foi exposto (b). Índice MAR acima de 0,2 caracteriza multirresistência (KRUMPERMAN, 1983).

O índice MAR e a porcentagem de padrões de resistência entre as bactérias heterotróficas Gram-positivas, isoladas das amostras de água das escolas estaduais de Boa Vista – RR, se encontra na tabela 2.

Variações no padrão de resistência também foram observadas dentro de diferentes isolados de um mesmo gênero, o que confirma a característica específica de desenvolvimento da resistência. Entre os isolados Gram-positivos, o que apresentou maior índice de resistência foi o *S. aureus*.

Tabela 2 – Índice MAR e a porcentagem de padrões de resistência entre as bactérias heterotróficas, Gram-positivas, isoladas nas amostras de água das escolas estaduais de Boa Vista – RR

Padrão Resistência	Isolados	Antibióticos	%
0,08	<i>Staphylococcus</i> spp.	Oxi	14,3
0,15	<i>Staphylococcus</i> spp.	Oxi, Van	28,5
0,15	<i>Staphylococcus</i> spp.	Amp, Amo	14,3
0,15	<i>Staphylococcus</i> spp.	Caz, Oxi	14,3
0,23	<i>Staphylococcus</i> spp.	Cfe, Oxi, Van	14,3
0,61	<i>S. aureus</i>	Amp, Amo, Cli, Mer, Oxi, Pen, Van	14,3

MAR = número dos antibióticos aos quais o isolado foi resistente dividido pelo número total de antibióticos para que o isolado foi exposto. Amp = ampicilina; Amo = amoxicilina; Cfe = cefalexina; Caz = ceftazidima; Cip = ciprofloxacina; Cli = clindamicina; Eri = eritomicina; Mer = meropenem; Nor = norfloxacina; Oxa = oxacilina; Pen = penicilina G; Van = vancomicina; Sut = sulfametoxazol/trimetoprin.

4.5.2 Resistência das bactérias Gram-negativas aos antimicrobianos

O índice MAR e a porcentagem de padrões de resistência entre as bactérias heterotróficas, Gram-negativas, isoladas nas amostras de água das escolas estaduais de Boa Vista – RR, se encontra na tabela 3.

Entre as bactérias Gram-negativas isoladas a que apresentou maior índice de resistência (0,63) foi a *E. coli*, o menor foi o Bacilo Gram-negativo não fermentador de glicose (0,12).

Tabela 3 - Índice MAR e a porcentagem de padrões de resistência entre as bactérias heterotróficas, Gram-negativas, isoladas nas amostras de água das escolas estaduais de Boa Vista – RR

Padrão resistência	Isolados	Antibióticos	%.
0,12	BGNnfg, <i>E. coli</i> , <i>E. aerogenes</i>	Amp	23,1
0,12	<i>K. ozaenae</i>	Mer	7,7
0,25	<i>K. ozaenae</i>	Amp, Eri	7,7
0,25	<i>K. ozaenae</i> , <i>E. aerogenes</i>	Amp, Mer	15,3
0,25	<i>K. ozaenae</i>	Amp, Sut	7,7
0,38	<i>E. aerogenes</i>	Amp, Cfe, Mer	7,7
0,38	<i>K. ozaenae</i> , <i>E. coli</i>	Amp, Cfe, Eri	23,1
0,63	<i>E. coli</i>	Amp, Cfe, Eri, Nor, Sut	7,7

MAR = número dos antibióticos aos quais o isolado foi resistente dividido pelo número total de antibióticos para que o isolado foi exposto. Amp = ampicilina; Cfe = cefalexina; Caz = ceftazidima; Cip = ciprofloxacina; Eri = eritomicina; Mer = meropenem; Nor = norfloxacina; Sut = sulfametoxazol/trimetoprin.

As bactérias Gram-negativas são frequentemente envolvidos na gênese de infecções hospitalares e, por sua origem, também com frequência apresentam selecionada sensibilidade aos antibióticos, muitas vezes mostrando padrões de resistência elevada e múltipla (TAVARES, 2000).

4.5.3 Bactérias multirresistentes aos antimicrobianos

Altos níveis de bactérias resistentes a múltiplos antibióticos em água potável já foram relatados anteriormente (PAPANDREOU et al., 2000). A ocorrência de bactérias resistentes a múltiplos antibióticos no ambiente é certamente um fenômeno bem conhecido. Muitos investigadores como: Suassuna e Suassuna (1971), Linton (1984), Saunders (1984), Buu-Hoi, Goldstein e Acar (1986) Feinman (1998) e Witte (1998), acreditam que estes organismos resistentes aos medicamentos têm se tornado mais comum, devido ao amplo uso de antibióticos na medicina e na agricultura em todo o mundo (JEENA et al., 2006).

A constatação de bactérias resistentes a múltiplos antibióticos entre os isolados de amostras de águas tratadas representa uma ameaça em potencial para os consumidores. As bactérias resistentes as drogas podem também atuar como reservatório de plasmídeos que possuam o fator de transferência de resistência, que

podem trocar livremente com os possíveis agentes patogênicos do nosso intestino (KURYLOWICZ, 1981).

O acúmulo de bactérias heterotróficas no sistema de distribuição de água e/ou nos reservatórios propicia a formação de biofilmes, o que compromete a qualidade da água.

Apenas recentemente, entrou em vigor no Brasil, a RDC nº 44/2010/MS (ANVISA, 2010), que dispõe sobre a venda de antibióticos, de uso humano ou veterinário o que já pode contribuir para a redução do seu uso indevido. Além disso, campanhas de sensibilização sobre a utilização indevida e uso abusivo de antibióticos devem ser lançadas pelas autoridades governamentais para educar o público em geral, para fazer face a ameaça crescente de patógenos resistentes a múltiplas drogas.

Para amenizar essa situação é necessário que se identifique e corrija as causas da instabilidade no padrão de qualidade da água distribuída para a população. Realizar campanhas educativas para caracterizar e orientar os profissionais de saúde para a devida utilização dos antibióticos e alertar a população quanto aos riscos de ingestão de subdosagens de antibióticos em produtos de origem animal.

5. CONCLUSÕES

Amostras de águas que recebem apenas cloração apresentaram maior incidência de contaminação por coliformes totais e termotolerantes.

Amostras de águas que recebem tratamento completo revelaram maior densidade de coliformes termotolerantes.

Em nenhuma das amostras de água, a contagem de bactérias heterotróficas ultrapassou o limite de 500 UFC/mL.

A contagem de bactérias heterotróficas variou nas amostras de água, enfatizando a instabilidade no padrão de qualidade da água fornecida a população.

As amostras de águas que são apenas cloradas apresentam maior índice de contaminação por bactérias heterotróficas quando comparadas com as amostras de água que recebem tratamento completo.

A porcentagem de bactérias Gram-negativas isoladas das amostras de água foi superior a das bactérias Gram-positivas.

Os isolados pertencentes à família das *Enterobacteriaceae* foram predominantes entre os isolados identificados.

A maioria das bactérias heterotróficas isoladas das amostras foi resistente a ampicilina, seguida pela resistência a cefalexina e a eritromicina e meropenem.

Foi observada resistência intermediária a ampicilina e a ceftazidima.

Entre as bactérias Gram-negativas, os isolados de *E. coli* foram os que apresentaram maior índice MAR, e entre as bactérias Gram-positivas, destacou-se *S. aureus*.

Diferentes isolados do mesmo gênero apresentaram resistências diferentes.

As bactérias Gram-negativas que apresentaram maior incidência foram *K. ozaenae*, *E. coli* e *E. aerogenes*, nesta ordem.

As bactérias Gram-positivas que apresentaram maior incidência foram *Staphylococcus* spp., *Micrococcus* e *S. aureus*, nesta ordem.

Não foram encontradas resistências a ceftazidima e nem a ciprofloxacina

A constatação de bactérias resistentes a múltiplos antibióticos representa uma ameaça aos consumidores.

REFERÊNCIAS

ALLEN, M. J.; REASONER, D. J. Heterotrophic plate count bacteria – what is their significance in drink water? **International Journal of Food Microbiology**, Toronto, v.92, n.3, p.265-274, maio. 2004.

APHA – AMERICAN SOCIETY MICROBIOLOGY. **Standard methods for the examination of dairy products**. 21. ed. Washington: APHA, 2005. 646p.

ANDREOTTI, R. Uso de Antimicrobianos e resistência em gado de corte. In: SIMPÓSIO DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS, 2, 2003. Rio de Janeiro. **Conferência**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2003, 1 CD-ROM.

ANVISA. Ministério da Saúde. **RDC nº 44**, de 26 de outubro de 2010. Dispõe sobre o controle de medicamentos à base de substâncias classificadas como antimicrobianos, de uso sob prescrição médica, isoladas ou em associação e dá outras providências. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/resolucao+antibioticos.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 30 jul. 2011.

ANVISA. **Detecção e identificação de bactérias de importância médica**. 2004. Disponível em: www.anvisa.gov.br/servicosade/microbiologia/introducao.pdf. Acesso em: 15 jun. 2011.

ANVISA – **Padronização dos testes de sensibilidade a antimicrobianos por disco-difusão**. 2005. Disponível em: www.anvisa.gov.br/servicosade/microbiologia/introducao.pdf. Acesso em: 15 jun. 2011.

ARAÚJO JUNIOR, O. **Consciência sobre a Água**. Disponível em: http://www.uniagua.org.br/public_html/consciencia. Acesso em: 3 dez. 2009.

ARCHER, G. L.; CLIMO, M. W. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Bethesda, v. 38, n. 10, p.2231-2237, out. 1994.

ARCURI, E. F. Biofilmes bacterianos na indústria de alimentos. **Revista Leite e Derivados**, São Paulo, v. 53, n. 9, p. 40-45. set. 2000

BARRETO, E. F. Análise microbiológica da água fornecida a unidades de alimentação de regiões administrativas do Distrito Federal-DF. **Anuário da Produção de Iniciação Científica Discente**, Valinhos, v. 12, n. 13, p. 7-15. 2009.

BAUER, A; PERRY, D; KIRBY, W. Drug usage and antibiotic susceptibility of staphylococci. **Journal of the American Medical Association**, Chicago, v. 4, n.173, p. 475-480, jun. 1960.

BENVINISTE, R; DAVIES, J. Mechanisms of antibiotic resistance in bacteria. **Annus Review of Biochemmistry**, Palo Alto, v. 42, p. 471-506, jul. 1973.

BOMFIM, M. V. J. et al. Avaliação físicoquímica e microbiológica da água de abastecimento do laboratório de bromatologia da UERJ. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 21, n. 152, p. 99-103, jun. 2007.

BRADFORD, P. A. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 14, n. 4, p. 933-951, out. 2001.

BRASIL. Lei nº 7.347, de 24 de julho de 1985, **Lei das águas**. Disponível: <http://www.rededasaguas.org.br/legisl>. Acesso em: 10 de mar. de 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria nº 518**, de 25 de março de 2004. Aprova a norma de qualidade da água para consumo humano. Disponível em: <http://dtr2001.saude.gov.br/sas/PORTARIAS/Port2004/GM/GM-518.htm>. Acesso em 11 fev. 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Inspeção sanitária em abastecimento de água**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 84p.

BROOKS, G. F. et al. **Jawetz, Melnick e Adelberg: Microbiologia Médica**. 20. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2009. 820p.

BÜCHELE, D. S.; RIZZARDI, A.; AMARAL, C. H. Avaliação da qualidade da água de escolas do interior do município de Cruz Alta - RS. In: SEMINÁRIO INTERINSTITUCIONAL DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO. 15, 2010, Cruz Alta. **Anais...** [s.l.]: Disponível em: http://www.unicruz.edu.br/15_seminario/seminario.pdf. Acesso em: 07 jun. 2011.

BUU-HOI, A.; GOLDSTEIN, F.W.; ACAR, J. F. R-factors in Gram-positive and Gram-negative aerobic bacteria selected by antimicrobial therapy. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, Bethesda, v. 49, p. 46-55, jan.1986.

CAER. **Companhia de água e esgoto de Roraima**. 2011. Disponível em: <http://www.caer.com.br/>. Acesso em: 14 jun. 2011.

CALAZANS, G. M. T. et al. Análises bacteriológicas de águas provenientes de creches, asilos e poços artesianos situados próximos ao *campus* da UFPE. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE EXTENSÃO UNIVERSITÁRIA, 2, 2004, Belo Horizonte. **Anais...** [s.l.]: Disponível em: <http://www.ufmg.br/pdf> Acesso em: 25 jul. 2011.

CARVALHO, D. R. et al. Avaliação da qualidade físico-química e microbiológica da água de um Campus Universitário de Ipatinga-MG. **Nutrir Gerais**, Ipatinga, v. 3, n. 5, p. 417-427, ago./dez. 2009.

CEARÁ – Superintendência Estadual do Meio Ambiente. **Cartilha de água**. Fortaleza: SEMACE, 2004. 20p.

CETESB. **Norma técnica L 220: *Pseudomonas aeruginosa*** – Determinação em amostras de água técnica de membrana filtrante. São Paulo: CETESB, 1993. 30p.

CETESB. **Norma técnica L 5.202: Coliformes totais e fecais** – Determinação do número mais provável pela técnica de tubos múltiplos. São Paulo: CETESB, 1998. 39p.

CETINKAYA, Y; FALK, P; MAYHALL, C. G. Vancomycin-resistant enterococci. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 13, n. 4, p. 686-707, out. 2000.

CHAMBERS, H. F. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 10, n.4, p. 781-791, out. 1997.

CHARACKLIS, W. G.; WILDERER, P. A. **Structure and function of biofilms**. John Wiley & Sons, Chichester. 1989.

CHAVES, L. C. D. **Estudo da cinética de formação de biofilmes em superfícies em contacto com água potável**. 2004. 186p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia do Ambiente) – Universidade de Minho, 2004.

CLSI. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests**. 8. ed. Pennsylvania: CLSI, 2005.

CONLY, J. Antimicrobial resistance in Canada. **Canadian Medical Association Journal**, Ottawa, v. 15, n. 167, p. 885-891, out. 2002.

COUTO, R. C.; PEDROSA, T. M. G; NOGUEIRA, J.M. **Infecção hospitalar: epidemiologia e controle**. 2. ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 1999. 205p.

COUTO, R. C. Bactérias Multirresistentes. In: COUTO, R. C; PEDROSA, T. M. G; NOGUEIRA, J. M. (editores). **Infecção Hospitalar e Outras Complicações não infecciosas da Doença**. 3. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2003, p. 557-588.

CRAIG, W. A. Antibacterial Therapy. In: GOLDMAN; AUSIELL. (editores). **Cecil Textbook of Medicine**. 22. ed. Saunders: Copyright, 2004, p 1853-1926.

D'AGUILA, P. S. et al. Avaliação da qualidade de água para abastecimento público do município de Nova Iguaçu. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 16, n. 3, p. 791-798, jul. - set. 2000.

EHLERS, M. M. et al. Random survey of the microbial quality of bottled water in South Africa. **Water AS**, Gezina, v.30, n.2, p. 203-210, abr. 2004.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. **Atlas do meio ambiente do Brasil**. Brasília, DF: Terra Viva, 1994. 138p.

FEINMAN, S. E. Antibiotics in animal feed – Drug resistance revisited. **ASM News**, Washington, v. 64, n.1, p. 24-30, jan. 1998.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2002. 424p.

FRANCO, B. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2004. 182p.

FREITAS, M. B.; BRILHANTE, O.; ALMEIDA, L. M. Importância da análise de água para a saúde pública em duas regiões do Estado do Rio de Janeiro: enfoque para

coliformes fecais, nitrato e alumínio. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.17, n.3, p.651-660, maio/jun. 2001.

FRIDKIN, S. K. et al. Monitoring antimicrobial use e resistance: comparasion with a national benchmark on reducing vancomycin use and vancomycin-resistant enterococci. **Emerging Infectious Diseases**, Bethesda, v. 8, n. 7, p. 702-707, jul. 2002.

FUCHS, F. D. Princípios gerais do uso de antimicrobianos. In: FUCHS, F; WANNAMACHER, L; FERREIRA, M. (editors). **Farmacologia clínica – Fundamentos da terapêutica racional**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004, 3 ed. p. 342- 349.

FUNDAÇÃO NACIONAL DA SAÚDE (FUNASA) Ministério da Saúde. **Manual prático de análise de água**. Brasília, 2006. Disponível em: <http://www.funasa.gov.br/Web%20Funasa/pub/pdf/Mnl%20analise%20agua.pdf>. Acesso em: 15 jun. 2011.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. 3. ed. São Paulo: Varela, 2001. 680p.

GLEESON, C.; GRAY, N. **The coliform index and wasteborne disease, problems of microbial drinking water assessment**. London: E & FN Spon, 1997. 194p.

GOMES, P. C. F. L. et al. Análise físico-química e microbiológica da água de bebedouros de uma IFES do sul de Minas Gerais. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 19, n. 133, p. 63-65, jul. 2005.

GUILHERME, E. F. M.; SILVA, J. A. M.; OTTO, S. S. *Pseudomonas aeruginosa*, como indicador de contaminação hídrica. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v.14, n.76, p.43-47, set. 2000.

HANAKI, H. et al. Activated cell-wall synthesis is associated with vancomycin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strains Mu3 and Mu50. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Oxford, v. 42, n. 2, p. 199-209, ago. 1998.

HARBARTH, S. et al. Parallel analysis of individual and aggregated data on antibiotic exposure and resistance in Gram-negative bacilli. **Clinical Infectious Diseases**, Bethesda, v. 1, n. 33, p. 1462-1468, nov. 2001.

HARDY, C. D; COZZARELLI, N. R. Alteration of *Escherichia coli* topoisomerase IV to novobiocin resistance. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, Bethesda, v. 47, n. 3, p. 941-947, mar. 2003.

HARVEY, R. A.; CHAMPE, P. C.; FISHER, B. D. **Microbiologia Ilustrada**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2008. 448p.

HIRAMATSU, K; HANAOKI, H. Glycopeptide resistance in staphylococci. **Current Opinion in Infectious Diseases**, Bethesda, v. 11, n. 6, p. 653-658, dez. 1998.

HIRAMATSU, K. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: a new model of antibiotic resistance. **The Lancet Infectious Diseases**, Londres, v.1, n. 3, p. 147-155, out. 2001.

HOFFMAN, F. L. et al. Avaliação das condições higiênico-sanitárias de mamadeiras preparadas no lactário de um hospital de São José do Rio Preto, SP. **B. CEPPA**, Curitiba, v. 14. n. 2, p. 231-252, jul/dez. 1996.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Sinopse do censo demográfico de 2010**. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/cidadesat>. Acesso em: 13 jun. 2011.

ITAL/INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS. **Manual de métodos de análise microbiológica de água**. Campinas: ITAL, Núcleo de Microbiologia, 2000. 99p.

JACOBY, G. Antimicrobial action and resistance. In: ROOT, R; WALDVOLGEL, F; COREY, L; STAMM, W. (editors). **Clinical Infectious Disease: A Practical Approach**. New York: Oxford University Press, 1999, p. 209-215.

JEENA, M. I. et al Risk assessment of heterotrophic bacteria from bottled drinking water sold in Indian markets. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, Amsterdam, v. 209, n. 2, p. 191-196, mar. 2006.

KOCH, A. L. Bacterial wall as target for attack: past, present, and future research. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 16, n. 4, p. 673-687, out. 2003.

KRUMPERMAN, P.H. Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods. **Applied Environmental Microbiology**, Washington v. 46, n. 1, p.165-170, jul. 1983.

KURYLOWICZ, W. **Antibióticos - Uma revisão crítica**. Recife: Editora Universitária – Universidade Federal de Pernambuco, 1981. 341p.

LAGE, M. M.; BADARÓ, A. C. L.; BARBOSA, D. A. Monitoramento da qualidade microbiológica da água dos bebedouros do Campus Amaro Lanari Jr. In: SEMANA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 9, 2008, Coronel Fabriciano. **Anais...** [s.l.]: Disponível em: http://www.unilestemg.br/pic/sic_09/resumos/saude.pdf. Acesso em: 07 jun. 2011.

LECHEVALLIER, M. W.; MCFETERS, G. A. Interactions between Heterotrophic Plate Count Bacteria and Coliform Organisms. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 49, p. 1338-1341, maio. 1985.

LEITÃO, M. F. F. et al. **Tratado de Microbiologia**. São Paulo: Manole, 1988. 186p.

LEUNG, T; WILLIAMS, J. D. Beta-lactamases of subspecies of bacteroides fragilis. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, Ottawa, v. 4, n. 8, p. 47-54, jul. 1978.

LI, W. M. K.; LACROIX, B.; POWELL, D. A. **The microbiological safety of bottled water in Canada**. 2001. Disponível em: http://foodsafety.k-state.edu/articles/468/micro_sfty_bottled_water_canada.pdf. Acesso em: 11 mar. 2010.

LIM, S. M; WEBB, S. A. Nosocomial bacterial infections in intensive Care Units. I: Organisms and mechanisms of antibiotic resistance. **Anaesthesia**, Bethesda, v. 60, n. 9, p. 887-902, set. 2005.

LINTON, A. H. Antibiotic-resistant bacteria in animal husbandry. **British Medical Bulletin**, Oxford, v. 40, n. 1, p. 91-95, jan. 1984.

LIVERMORE, D, M. Of *Pseudomonas*, porins, pumps and carbapenems. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, Ottawa, v. 47, n. 3, p. 247-250, mar. 2001.

MACÊDO, J. A. B. **Águas & Águas**. Juiz de Fora – MG: Ortofarma, 2001. 504p.

MACHADO, C. L. **Avaliação da presença de microrganismos indicadores de contaminação e patogênicos em líquidos lixiviados do aterro sanitário de Belo Horizonte**. 2004. 140p. Dissertação (Mestrado em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2004.

MANAIA, C. M. et al. Heterotrophic plate counts and the isolation of bacteria from mineral Waters on selective and enrichment media. **Journal of Applied Bacteriology**, Malden, v. 69, p. 871-876, dez. 1990.

MARY, P.; DEFIVES, C.; HORNEZ, J. P. Occurrence and multiple antibiotic resistance profiles of non-fermentative Gram-negative microflora in five brands of non-carbonated French bottled spring water. **Microbiology Ecology**, Nova York, v. 39, n. 4, p. 322-329, maio. 2000.

MERCK. **Manual Merck de informação médica**. São Paulo: Roca, 2010, 1944p. Disponível em: <http://www.manualmerck.net/>. Acesso em: 01 jul. 2011.

MAINARDI, J. L. et al. Balance between two transpeptidation mechanisms determines the expression of beta-lactam resistance in *Enterococcus faecium*. **Journal Biological Chemistry, Bethesda**, v. 27, n. 277, p. 35801-35807, set. 2002.

MOREIRA, B. M; DAUM, R.S. Antimicrobial resistance in staphylococci. **Pediatric Clinics of North America**, Chicago, v. 42, n. 3, p. 619-648, mar. 1995.

MOTA, S. **Introdução à engenharia ambiental**. Rio de Janeiro: ABES, 1997. 292p.

MUTO, C. A. et al. Shea guideline for preventing nosocomial transmission of multidrug-resistant strains of *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus*. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, Bethesda, v. 24, n. 5, p. 362-386, maio. 2003.

NASCIMENTO, A. R. et al. Qualidade microbiológica das águas minerais consumidas na cidade de São Luís -MA. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 14, n. 76, p. 69-72, set. 2000.

NEU, T. R.; van der MEI, H. C.; BUSSCHER, H. J. Biofilms Associated with Health. In: Bott, T. R.; Fletcher, M.; Melo, L. F. **Biofilms-Science and Technology**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1992. p. 21-34.

NIKAIDO, H. Outer membrane barrier as a mechanism of antimicrobial resistance. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, Bethesda, v. 33, n. 11, p. 1831-1836, nov. 1989.

NOLLER, H, F. Structure of ribosomal RNA. **Annual Review of Biochemistry**, Bethesda, v. 53, p. 119-162, 1984.

NORD, C.E. et al. Beta-lactamases in anaerobic bacteria. **Scandinavian Journal Infectious Diseases**, Bethesda, v. 46, p. 57-63. 1985.

NORDMANN, P. Trends in beta-lactam resistance among *Enterobacteriaceae*. **Clinical Infectious Diseases**, Bethesda, v. 27, p. 100-106, ago. 1998.

OPAL, S. M; COHEN, J. Clinical Gram-positive sepsis: does it fundamentally differ from Gram-negative bacterial sepsis? **Critical Care Medicine**, Bethesda, v. 27, n. 8, p. 1608-1616, ago. 1999.

ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD. **Guias para a calidad Del águas potable: recomendaciones**. 2. ed. Genebra: OMS, v.1, 1995. 195p.

ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD. Gabinete regional para a saúde. **Desinfecção da água**, 1996. 20p.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE - OPAS. **Água e Saúde**. Disponível em: <http://www.opas.org.br/sistema/fotos/agua>. Acesso em: 3 dez. 2009.

ORTOLAN, M. G. S.; CARDOSO, M. R. A. I.; AYUB, M. A. Z. Perfil microbiológico de bactérias mesófilas do efluente do hospital das clínicas de Porto Alegre. In: CONGRESSO INTERAMERICANO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 27, 2000, Porto Alegre. **Anais...** [s.l.]: Disponível em: <http://sbmicrobiologia.org.br/PDF/cdsbm/listaresumos.htm>. Acesso em: 20 mar. 2010.

PAPANDREOU, S. et al. Multiantibiotic resistance of Gram-negative bacteria isolated from drinking water samples in southwest Greece. **Journal of Chemotherapy**, Trespiano, v. 12, n. 4, p. 267-273, ago. 2000.

PATRICK, D. M. et al. Per capita antibiotic consumption: how does a North American jurisdiction compare with Europe? **Clinical Infectious Diseases**, Bethesda, v. 1, n. 39, p. 11-7, jul. 2004.

PAVLOV. D. et al. Potentially pathogenic features of heterotrophic plate count bacteria isolated from treated and untreated drinking water. **International Journal of Food Microbiology**, Toronto, v. 92, n.3, p. 275-287, maio. 2004.

PAYMENT, P. et al. A randomized trial to evaluate the risk of gastrointestinal disease due to consumption of drinking water meeting current microbiological standards. **American Journal of Public Health**, Washington, v. 81, n.6, p.703-708, jun. 1991.

PERITI, P; MAZZEI, T. New criteria for selecting the proper antimicrobial chemotherapy for severe sepsis and septic shock. **International Journal Antimicrobial Agents**, Ottawa, v. 12, n. 2, p. 97-105, jul. 1999.

PETIGNAT, C. et al. Exogenous source of *Pseudomonas aeruginosa* in a intensive care unit patients: implementation of infection control and follow-up with molecular typing. **Infection Control Hospital Epidemiology**, New Jersey, v. 27, n. 9, p. 953 - 957, set. 2006.

PEZENTE, A. W. **Análise microbiológica, física e química da água dos bebedouros e torneiras consumida na E. E. B. Timbé do Sul, localizada no centro do município de Timbé do Sul - SC.** Criciúma, 2009. 43p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC. Disponível em: <http://www.bib.unesc.net/biblioteca/sumario.pdf>. Acesso em: 07 jun. 2011.

PINTO, C. A. G. et al. Comportamento microbiológico das infecções comunitárias no Hospital Municipal Odilon Behrens (HNOB) – jan/94 a dez/95. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE INFECTOLOGIA, n. 9, 1996, Recife. **Resumo...** Recife: [s.l.], p. 184.

PONGELUPPE, A. T. et al. Avaliação de coliformes totais, fecais em bebedouros localizados em uma instituição de ensino de Guarulhos-SP. **Revista Saúde – UnG**, Guarulhos, v. 3, n. 2, p. 5-9, jun. 2009.

POOLE, K. Efflux-mediated resistance to fluoroquinolones in Gram-negative bacteria. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, Bethesda, v. 44, n. 9, p. 2233-2241, set. 2000.

POOLE, K. Efflux-mediated resistance to fluoroquinolones in Gram-positive bacteria and the mycobacteria. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, Bethesda, v. 44, n. 10, p. 2595-2599, out. 2000.

RABELLO, S. B; GODOY, C. V. C.; SANTOS, F. R. W. Presença de bactérias em instrumentais e superfícies do ambiente clínico odontológico. **Revista Brasileira de Odontologia**, Rio de Janeiro, v.58, n.3, p. 184-187, maio - jun. 2001.

RICE, L; BONOMO, R. A. Mechanisms of resistance to Antibacterial Agents. In: MURRAY, P. R; BARON, E; JORGENSEN, J. H; LANDROY, M. L; PFALLER, M. A. (editors). **Manual of Clinical Microbiology**. Washington: ASM Press, 2007, 9 ed., p. 1114-1145.

RIVERA-TAPIA, J.A. Antibiotic resistance, public health problem. **Asociación Médica del American British Cowdray Hospital**. México, v. 48, n. 4, p.42-47, jan.-mar. 2003.

RORAIMA. Secretaria de Estado do Planejamento e Desenvolvimento. **Informações socioeconômicas do município de Boa Vista – RR**, 2010. Disponível em: http://www.seplan.rr.gov.br/roraimaemnumeros/dados_municipios/Boa_Vista.pdf. Acesso em: 13 jun. 2011.

RORAIMA. Secretaria de Educação, Cultura e Desportos. **Censo escolar da educação básica, 2011**. Disponível em: http://www.educacao.rr.gov.br/index.php?option=com_content&task=view&id=1810&Itemid=29. Acesso em: 13 jun. 2011.

RUTTIMANN, S. et al. Long-term antibiotic cost savings from a comprehensive intervention program in a medical department of a university-affiliated teaching hospital. **Clinical Infectious Diseases**. Bethesda, v. 1, n. 38, p. 348-356, fev. 2004.

SACHS, A. B; SARNOW, P; HENTZE, M. W. Starting at the beginning, middle, and end: translation initiation in eukaryotes. **Cell**, Bethesda, v. 13, n. 89, p. 831-838, jun. 1997.

SAUNDERS, J. R. Genetics and evolution of antibiotic resistance. **British Medical Bulletin**, Oxford, v.40, n. 54-60, jan. 1984.

SCHAECHTER, M. et al. **Microbiologia: mecanismos de doenças infecciosas**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

SEGAL-MAURER, S; URBAN, C; RAHAL, J. J. Current perspectives on multidrug-resistant bacteria. Epidemiology and control. **Infectious Disease Clinics North America**, Amsterdam, v. 10, n. 4, p. 939-957, dez, 1996.

SHAW, W. V. Bacterial resistance to chloramphenicol. **British Medical Bulletin**, Oxford, v. 40, n. 1, p. 36-41, jan. 1984.

SHLAES, D. M. et al. Society for healthcare epidemiology of America and infectious diseases society of America joint Committee on the Prevention of Antimicrobial Resistance: guidelines for the prevention of antimicrobial resistance in hospital. **Clinical Infectious Diseases**, Bethesda, v. 25, n. 3, p. 584-599, set. 1997.

SILVA JR., E. A. **Manual de controle higiênico-sanitário em alimentos**. 5. ed. São Paulo: Varela, 2002.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de Métodos de Análises Microbiológicas de Alimentos**. São Paulo: Varela, 1997. 295p.

SINGH, G. S. Beta-lactams in the new millennium. Part-II: cepheems, oxacepheems, penams and sulbactam. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, Bethesda, v. 4, n. 1, p. 93-109, jan. 2004.

SIQUEIRA, L. P. et al. Avaliação microbiológica da água de consumo empregada em unidade de alimentação. **Ciência & Saúde Coletiva**, Manguinhos, v. 15, n. 1, p. 63 - 66, set. 2010.

SOARES, J. B.; MAIA, A. C. F. **Água: Microbiologia e tratamento**. Fortaleza: UFC, 1999. 206p.

SORUM, H.; ABÉE-LUND, T.M. Antibiotic resistance in food-related bacteria – a result of interfering with the global web of bacterial genetics. **International Journal of Food Microbiology**, Toronto, v. 78, n. 1, p. 43-56, set. 2002.

SOUZA, L.F. **Composição de resíduos sólidos de serviços de saúde com resíduos urbanos**. 2003. 169p. Tese (Doutorado em Engenharia de Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental) - Instituto de Pesquisas Hidráulicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.

SUASSUNA, I.; SUASSUNA, I. R. Perspectivas do emprego clínico dos antibióticos. **Tribuna Médica**, [s.l.], v.14, n. 1, p.10-17, jan. 1971.

TANCREDI, R. C. P.; CERQUEIRA, E.; MARINS, B. R. **Águas minerais consumidas na cidade do Rio de Janeiro: avaliação da qualidade sanitária**. 2002. Disponível em: http://www4.ensp.fiocruz.br/visa/publicacoes/_arquivos.pdf. Acesso em: 11 mar. 2010.

TAVARES, W. Resistência Bacteriana. In: TAVARES, W. (editor). **Manual de Antibióticos e Quimioterápicos Antiinfeciosos**. 3 ed. São Paulo: Atheneu, 2002, p. 55-144.

TAVARES W. Bactérias Gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 33, n. 3, p. 281-301, maio - jun. 2000.

TENOVER, F. C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. **American Journal of Medicine**. Bethesda, v. 34, n. 5, p. 3-10, jun. 2006.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2008. 760p.

van der WENDE, E.; CHARACKLIS, W. G. Biofilms in Potable Water Distribution Systems. In: Gordon A. **Drinking Water Microbiology**. Nova York: Springer-Verlag, 1990. p. 250-268.

VERMELHO, A. B. et al. **Prática de microbiologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006, 239p.

VIEIRA, R. H. S. F. Susceptibilidade antimicrobiana de *E. coli* de origem humana, alimentar e ambiental. In: SIMPÓSIO DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS, 2, 2003. Rio de Janeiro. **Conferência**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2003, 1 CD-ROM.

WAGA, S. STILLMAN, B. The DNA replication fork in eukaryotic cells. **Annual Review of Biochemistry**, Bethesda, v. 67, n. 67, p. 721-751, maio. 1998.

WATERER, G. W; WUNDERINK, R. G. Increasing threat of Gram-negative bacteria. **Critical Care Medicine**, Bethesda, v. 29, n. 4, p. 75-81, abr. 2001.

WENDPAP, L. L.; DAMBROS, C. S. K.; LOPES, V. L. D. Qualidade das águas minerais e potável de mesa, comercializadas em Cuiabá-MT. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 13, n. 64, p. 40-44, set. 1999.

WHITE, R. L. et al. Assessment of the relationship between antimicrobial usage and susceptibility: differences between the hospital and specific patient-care areas. **Clinical Infectious Diseases**, Washington, v. 31, n. 1, p. 16-23, jul. 2000.

WHO. World Health Organization. **Guidelines for Drinking water**. Geneve: World Health Organization, 2003.

WILCOX, M. H. Medical Devices-Associated Adhesion. In: Denyer, S. P.; Gorman. **Microbial Biofilms Formation and Control**. London: Blackwell Scientific Publications, 1993. p.113-146.

WITTE, W. Medical consequences of antibiotic use in agriculture. **American Association for the Advancement of Science**, Washington, v. 279, n. 5353, p. 96 - 997, fev. 1998.

UNESCO - ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA EDUCAÇÃO, CIÊNCIAS E CULTURA. **A ética do uso da água doce: um levantamento**. 2001. Disponível em: <http://unesdoc.unesco.org/images/0012/001271/127140por.pdf>. Acesso em: 31 mar. 2010.

YAO, J; MOELLERING, R. Antibacterial agents. In: MURRAY, P. R.; BARON, E; JORGENSEN, J. H; LANDRY, M. L; PFALLER, M. A. (editors). **Manual of Clinical Microbiology**. Washington: ASM PRESS, 2007, 9. ed, p. 1077-1113.

ZULPO, D. L. et al. Avaliação microbiológica da água consumida nos bebedouros da Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava, Paraná, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 27, n. 1, p. 107-110, jan. – mar. 2006.

ANEXO A
TABELA PRIMÁRIA DE IDENTIFICAÇÃO

Bactérias	Lactose	Glicose/ gás	H ₂ S	Urease	FAD	Motili- dade	Indol	LIA	Citrato
<i>Escherichia coli</i>	+	+	-	-	-	-/+	+	+	-
<i>Klebsiella oxytoca</i>	+	+	-	+	-	-	+	+	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	+	-	+	-	-	-	+	+
<i>Klebsiella ozaenae</i>	+	+	-	-	-	-	-	+/-	+
<i>Enterobacter cloacae</i>	+	+	-	-/+	-	+	-	-	+
<i>Enterobacter aerogenes</i>	+	+	-	-	-	+	-	+	+
<i>Citrobacter freundii</i>	-/+	+	-/+	-/+	-	+	-/+	-	+
<i>Arizona</i>	+	+	+	-	-	+	-	+	+
<i>Shigella sp</i>	-	-	-	-	-	-	-/+	-	-
<i>Edwardsiella tarda</i>	-	+	+	-	-	+	+	+	-
<i>Salmonella sp</i>	-	+	+	-	-	+	-	+	+
<i>Serratia marcescens</i>	-	+	-	-/+	-	+	-	+	+
<i>Proteus mirabilis</i>	-	+	+	+	+	+	-	-	-/+
<i>Proteus vulgaris</i>	-	+	+	+	+	+	+	-	-/+
<i>Providencia rettgeri</i>	-	+	-	-	+	+	+	-	+
<i>Yersinia enterocolitica</i>	-	-	-	+	-	-/+	-/+	-	-/+

+: positivo,

- : negativo,

Fonte: ANVISA, 2000