



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
FACULDADE DE BIOMEDICINA

FABRICIO DA SILVA LOPES

PERFIL DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIBACTERIANOS DE *Escherichia coli* ISOLADAS DA ÁGUA DE CONSUMO E DE RIO DA RESERVA EXTRATIVISTA (RESEX) MARINHA DE TRACUATEUA, PARÁ.

Orientador (a): Prof^a Dr^a Karla Tereza Silva Ribeiro

BELÉM-PARÁ

2017

FABRÍCIO DA SILVA LOPES

PERFIL DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIBACTERIANOS DE *Escherichia coli* ISOLADAS DA ÁGUA DE CONSUMO E DE RIO DA RESERVA EXTRATIVISTA (RESEX) MARINHA DE TRACUATEUA, PARÁ.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Biomedicina da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Biomedicina.

Orientador (a): Prof^a Dr^a Karla T. S. Ribeiro

BELÉM-PARÁ

2017

FABRICIO DA SILVA LOPES

PERFIL DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIBACTERIANOS DE *Escherichia coli* ISOLADAS DA ÁGUA DE CONSUMO E DE RIO DA RESERVA EXTRATIVISTA (RESEX) MARINHA DE TRACUATEUA, PARÁ.

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Faculdade de Biomedicina da
Universidade Federal do Pará, como
requisito parcial para obtenção do grau de
Bacharel em Biomedicina.

BANCA EXAMINADORA

Orientador (a): Prof^a Dr^a Karla T. S. Ribeiro – ICB–UFPA.

Avaliador 1: Prof^a Dr^a Antônia Benedita Rodrigues de Oliveira – ICB-UFPA

Avaliador 2: Prof^a Dr^a Lucimar Di’Paula Santos Madeira – ICB-UFPA

Avaliador 3: Prof^a Dr^a Vânia Nakauth de Azevedo (Suplente) - ICB-UFPA

BELÉM-PARÁ

2017

EPÍGRAFE

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

(Madre Teresa de Calcutá)

DEDICATÓRIA

*Aos meus alicerces que nunca me deixaram cair,
minha querida mãe Leonedes e minha irmã Adna,
pela força e todo suporte que dedicaram
a mim durante toda essa trajetória.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao meu Deus, por ter me proporcionado muitas conquistas durante a minha caminhada e por nunca ter de me desamparado.

À minha Mãe, por ter sido uma mulher forte e por me segurar pela mão nos momentos mais difíceis.

As minhas irmãs, pelo apoio incondicional que um ser humano pode oferecer ao seu próximo.

Aos amigos, pela companhia nas horas difíceis.

À minha tia Maria Orceles, que sempre me apoiou e tinha o sonho de me ver formado, porém hoje se encontra nos braços do Senhor.

Aos professores do ICB-UFPA, por todo o ensinamento e dedicação que um profissional oferece ao seu aluno.

Em especial à professora Dr^a Antônia Vieira, por ter sido além de uma professora, uma mulher de exemplo que me aceitou como seu monitor durante dois anos. Obrigado por ter me repassado um conhecimento valioso e ter me preparado para vida lá fora, tenho certeza que serei um bom profissional.

À professora Dr^a Karla Ribeiro, por toda paciência e puxões de orelha no decorrer deste trabalho. Sem a senhora eu não teria conseguido sozinho, obrigado por me conceder a grande oportunidade da realização deste trabalho, espero que ele possa servir de referência aos alunos que estão por vir.

Ao Bruno Ataíde e à Jéssica Diana, pela força que me deram durante a construção deste trabalho.

E por fim, porém não menos importante, aos que permaneceram ao meu lado de forma direta ou indireta. O meu muito obrigado!

REFERENCIAL TEÓRICO

1 – FAMÍLIA ENTEROBACTERIACEAE

1.1 - *Escherichia coli*

A enterobactéria *Escherichia coli* é um dos microrganismos mais bem estudados e muito conhecidos na área científica, no que se refere a infecções gastrointestinais. Descrita em 1885, com a denominação *Bacillus coli comune*, por Theodore Escherich, médico alemão que observou através de estudos sua alta prevalência na microbiota intestinal de indivíduos saudáveis e a sua capacidade de causar sérios danos à saúde humana quando inoculadas em regiões extraintestinais¹. Alguns estudos revelaram que existem geralmente 3 ou 4 linhagens de *E. coli* que formam uma composição no intestino humano, sendo uma delas residente e as outras transitórias, as residentes permanecendo no organismo humano por meses, e as transitórias por algumas semanas².

Na década de 1920, surgiu a suspeita de que a *E. coli* era causadora de infecções intestinais, quando foram analisados alguns biotipos fermentativos denominados *Dyspepsie coli*, raros em crianças normais, porém bastante frequentes em crianças com dispepsia. A partir dessa descoberta, esses biotipos fermentativos foram subclassificados em 6 grupos diferentes³.

Em 1950, a nomenclatura *E. coli* ganhou conformidade e classificação a partir de um esquema desenvolvido por estudiosos da época, esse esquema consistia em sorotipagem, técnica também utilizada para diferenciar as variedades sorológicas de *Salmonella enterica*, sendo adaptado para as cepas de *E. coli*. Desse modo, os isolados foram distinguidos uns dos outros por seus antígenos: somáticos (O); flagelares (H) e os capsulares (K)^{4,5}.

1.1.1. Características Morfológicas e Bioquímicas da *Escherichia coli*.

Pertencem à família Enterobacteriaceae, o gênero *Escherichia* engloba as espécies *Escherichia coli*, *Escherichia blattae*, *Escherichia fergusonii*, *Escherichia hermannii*, *Escherichia vulneris*. Dentre elas, a principal espécie de importância clínica é a *E. coli*⁶.

São, portanto, bastonetes Gram-negativos, não esporulados, sendo a maioria móvel com a presença de flagelos, medem de 1,1 a 1.5 µm por 2 a 6 µm. Possuem

metabolismo anaeróbico facultativo, fermentam açúcares como lactose, manose, maltose, produzem gás e ácidos^{7,8}. Com relação às características bioquímicas, algumas delas estão exemplificadas no quadro 1. As *E. coli* apresentam também atividades enzimáticas para as enzimas β -galactosidase e β -glucoronidase⁹.

Quadro 1 – Características bioquímicas da *Escherichia coli* nos testes para diagnóstico.

Ágar MacConkey	(+)	Lactose	(+) (em 90%)
Oxidase	(-)	Glicose	(+) (ácido e gás)
Indol	(+)	Manitol	(+)
Vermelho de metila	(+)	Dulcitol	(v)
Catalase	(+)	Sacarose	(v)
Gás Sulfídrico (H ₂ S)	(-)	Salicina	(v)
Motilidade	(v)	Adonitol	(-)
Nitrato > nitrito	(+)	Inositol	(-)
Ágar tergitol	(+)	Sorbitol	(+)
Voges-proskauer	(-)	Malonato	(-)
Citrato (Simmons)	(-)	Celobiose	(-)
Urease	(-)	Meio com KCN	(-)
Lisina descarboxilase	(+)	Agar EMB	(+)
Ornitina descarboxilase	(v)	Fenilalanina desaminase	(-)

(Fonte: Cunha et al., 2014).

Os isolados de *E. coli* podem ser associados a patogenicidade, possuindo mecanismos de virulência específicos para cada amostra patogênica que podem estar ligados a genes adquiridos por plasmídeos ou por componentes estruturais da própria bactéria, determinando assim a classificação das linhagens da espécie de *Escherichia coli* em patótipos^{11,12}.

Os patótipos consistem em dois grupos: linhagens diarreio gênicas, responsáveis por infecções intestinais e as linhagens extraintestinais (ExPEC), causadoras de infecções fora do trato intestinal. O grupo diarreio gênico pode ser subdividido em classes de acordo com os fatores de virulência: EPEC (*E. coli* enteropatogênica), ETEC (*E. coli* enterotoxigênica), STEC/EHEC (*E. coli* produtora da toxina de Shiga ou

enterohemorrágica), EIEC (*E. coli* enteroinvasora), EAEC (*E. coli* enteroagregativa) e DAEC (*E. coli* difusa aderente)^{13,14}. Essas classificações estão listadas na figura 1.

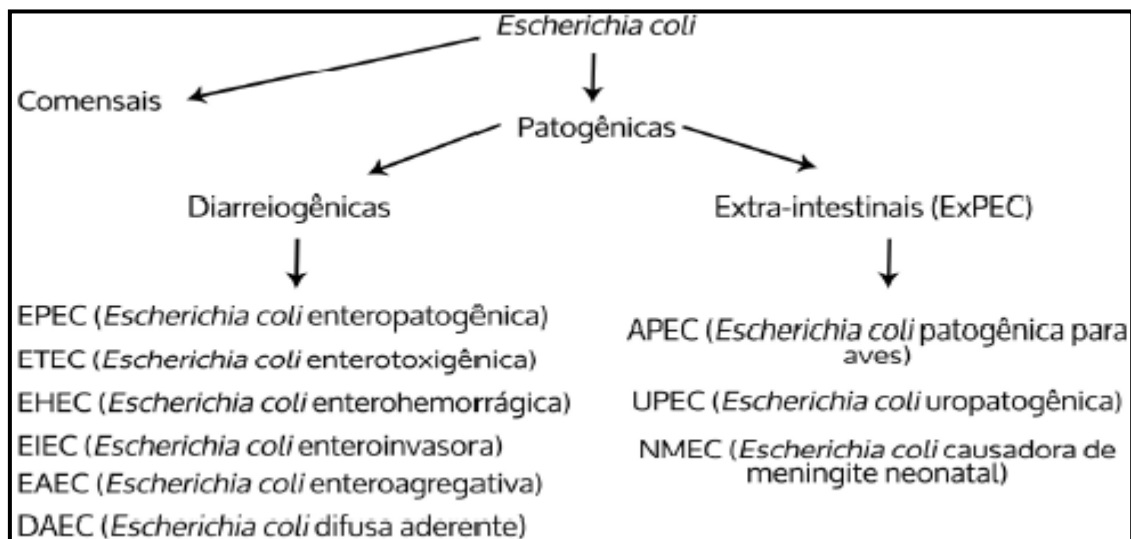


Figura 1 – Distribuição dos patótipos de *Escherichia coli*.

(Fonte: Cunha et al., 2014).

As *E. coli* são também importante indicadores de contaminação fecal da água e de alimentos. Fazem parte do grupo dos coliformes (totais e termotolerantes) que integra outras espécies da família das enterobactérias, como a *Klebsiella* sp; *Enterobacter* sp e *Citrobacter* sp. Ressalta-se aqui que no grupo dos coliformes, apenas a *E. coli* confirma presença de contaminação fecal¹⁰.

Destaca-se que as precárias condições de acesso à água potável no país são um dos fatores associados com os elevados índices de infecções gastrointestinais ou entéricas de origem bacteriana, em particular nas crianças menores de cinco anos, residentes em áreas onde há deficiência do serviço de saneamento. E o tratamento da infecção intestinal de origem bacteriana, muitas vezes requer o uso de antibacterianos, como os beta-lactâmicos^{15,16}.

1.2.1 - Os Beta-lactâmicos

Os beta-lactâmicos caracterizam-se por possuírem o anel beta-lactâmico, que é responsável pelas funções de inibição da síntese de peptidoglicano; possuem uma baixa toxicidade ao homem devido não haver a estrutura alvo da parede celular bacteriana nas células humanas, ou seja, possuem um alto tropismo para as bactérias, são constituídos por 3 átomos de carbono e um de nitrogênio (figura 2)¹⁷.

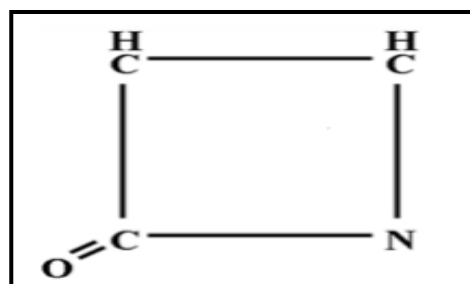


Figura 2 – Estrutura do anel beta-lactâmico.

(Fonte: <http://www.cram.com/flashcards/antibacs-i-anaerobes-opporinfections-3059782>).

O grupo dos beta-lactâmicos engloba quatro famílias que se diferem nas suas estruturas químicas e podem conter diferentes tipos de cadeias lineares. Sendo assim, a família dos beta-lactâmicos é formada por: cefalosporinas, penicilinas, monobactâmicos e carbapenêmicos (figura 3)^{18,19}.

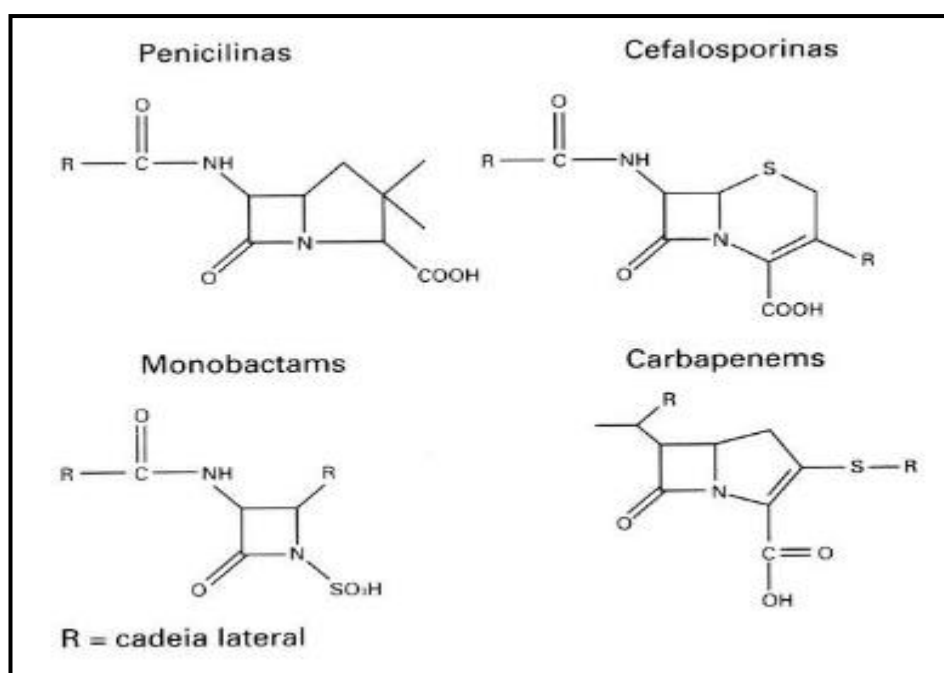


Figura 3 – Estrutura dos antibióticos que formam a família dos Beta-lactâmicos.

(Fonte: Williams, 1999).

A utilização dessas drogas permitiu uma revolução em relação à preservação e ao tratamento de diversas infecções de origem bacteriana. Entretanto, o uso intensivo desses antimicrobianos gerou uma pressão seletiva aos microrganismos, e consequentemente uma grande dificuldade para seu uso, devido à resistência bacteriana que é um problema persistente até os dias atuais²⁰.

1.2.2 - Resistência bacteriana aos beta-lactâmicos.

A resistência aos antibacterianos não é um evento recente e são muitos os processos fisiológicos e bioquímicos envolvidos, no caso dos beta-lactâmicos esses processos podem ter quatro mecanismos como: a alteração do alvo antibacteriano; presença de mecanismos enzimáticos destruidores do anel beta-lactâmico; mutações nos canais de porina, promovendo assim, um mecanismo de efluxo; alterações na permeabilidade, o que provoca na redução da entrada dos antibacterianos (figura 4). Esses processos que conferem resistência podem ser provenientes de enzimas denominadas beta-lactamases, que hidrolisam o anel beta-lactâmico pela quebra da ligação amida^{21,22}.

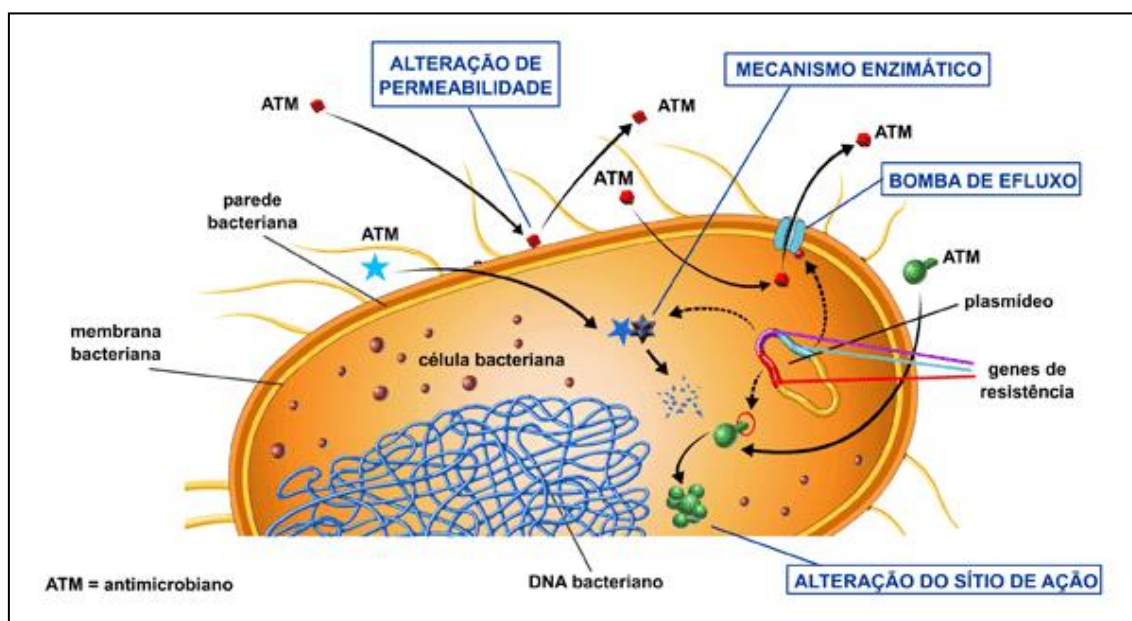


Figura 4 – Representação esquemática dos principais mecanismos de resistência bacteriana aos antibióticos.

(Fonte: http://www.anvisa.gov.br/servicosaudef/controlere/rede_rm/cursos/rm_controlere/opas_web/modulo3/mec_animacao.htm).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Escherich T. Die darmbakterien des neugeborenen und sauglings. Fortschr D Med. 1885; 3: 515-522.
2. Sears HJ, Brownlee I, Uchiyama JK, Persistence of individual strains os *Escherichia coli* in the intestinal tract of man. J Bacteriol. 1949; 59: 293-301.
3. Bueris V. Interação de *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) atípica que apresenta o padrão de adesão localizada-like com a célula epitelial in vitro. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo; 2008. 45 p.
4. Kauffmann F, Dupont A. *Escherichia* strains from infantile epidemic gastro-enteritis. Acta Path Microbiol Scandinav. 1950; 27: 552-564.
5. Neter E, Webb CR, Shumway CN, Murdock MR. Study on etiology, epidemiology, and therapy of infantile diarrhea, with particular reference to certain serotypes of *Escherichia coli*. Amer J Publ Health. 1951; 41: 1490-1496.
6. Corrêa FAF. Características dos patótipos de *E.coli* e implicações de *E.coli* patogênica para aves em achados de abatedouros frigoríficos. Goiânia (GO): Universidade Federal de Goiás. 2012. 30 p.
7. Quinn PJ, Markey BK, Carter ME, Donnelly WJ, Leonard FC. Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas. 1ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2005, 512 p.
8. Filho ALR. Saúde aviária e doenças. São Paulo: Roca. 2007; 10: 112-117.
9. Oliveira WF, et al. Utilização de diferentes meios de cultura para o isolamento de enterobactérias em amostras fecais de frango de cortes procedentes de explorações industriais do Estado de Ceará, Brasil. RPCV. 2004; 99(552): 211-214.
10. Andrade CL. Histopatologia e identificação da *Escherichia coli* como agente causal da celulite aviária em frangos de corte. Fluminense (RJ): Universidade Federal de Fluminense; 2005. 62 p.
11. Coura FM, Lage AP, Heinemann MB. Patótipos de *Escherichia coli* causadoras de diarreia em bezerros: uma atualização. Pesq. Vet. Bras. 2014; 34(9): 811-818.
12. Borges CA. Detecção e caracterização de *Escherichia coli* potencialmente patogênicas em aves selvagens e pombos domésticos na cidade Jaboticabal – SP. Jaboticabal (SP): Universidade Estadual Paulista; 2015. 75 p.

13. Santos ACM, Pignatari ACC, Silva RM. et al. A virulência de *Escherichia coli* patogênica extra-intestinal (ExPEC) em relação à idade e ao sexo do hospedeiro. O Mundo da Saúde, São Paulo. 2009; 33(4): 392-400.
14. Almeida et al. Detecção de enteropatógenos e teste de susceptibilidade a agentes sanitizantes de cepas diarreio gênicas de *Escherichia coli* isoladas das praias de São Luis-Maranhão. Rev Patol Trop. 2012; 41(3): 304-318.
15. Aminov RI. A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. Frontiers in Microbiology. 2010; 1: 134.
16. Tabolt GH. Beta-lactam antimicrobials: what have you done for me lately. Annals of the News York Academy of Sciences. 2013; 1277: 76-83.
17. Fernandes R, Amador P, Prudêncio C. β -Lactam: chemical structure, mode of action and mechanisms of resistance. Reviews in Medical Microbiology. 2013; 24: 7-17.
18. Schito GC, Pesce A, Debbia EA, Marchese A. The beta-lactamase problem: new therapeutic options. J Chemother., 1995; 7 Suppl 1:5-8
19. Goll AS, Faria MGFI. Resistência bacteriana como consequência do uso inadequado de antibióticos. BJSCR, Maringá-PR. 2014; 7(1): 69-72.
20. Montelli AC, Sadatsune T. Antibióticoterapia para o clínico. Sociedade Brasileira de Microbiologia. Rio de Janeiro, 2001. 7p.
21. Baptista MGFM. Mecanismos de resistência aos antibióticos. Lisboa (Portugal): Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia; 2013. 51 p.
22. Williams JD. β -lactamases and β -lactamase inhibitors. Inter. J. Antimicrob. Agents. 1999; 12 : 3-7.

PERFIL DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIBACTERIANOS DE *Escherichia coli* ISOLADAS DA ÁGUA DE CONSUMO E DE RIO DA RESERVA EXTRATIVISTA (RESEX) MARINHA DE TRACUATEUA, PARÁ.

Profile of antibacterial susceptibility of *Escherichia coli* isolated from drinking water and Extractive Reserve – Tracuateua RESEX - PARÁ

Fabrício da Silva Lopes
Instituto de Ciências Biológicas, Universidade
Federal do Pará, Belém, Pará, Brasil

Karla Tereza Silva Ribeiro
Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do
Pará, Belém, Pará, Brasil

RESUMO

A qualidade da água é um fator determinante para a manutenção da saúde pública e sua preservação é atribuição relevante do VIGIAGUA. No Brasil, a Portaria Nº2.914 de 12 de Dezembro de 2011 do Ministério da Saúde, determina normas para a potabilidade da água na qual deve estar isenta de coliformes totais e *Escherichia coli*. Infecções gastrointestinais provenientes de microrganismos bacterianos tais como linhagens diarreiogênicas de *Escherichia coli* constituem-se em um sério problema de saúde ainda na atualidade e o que determinou o objetivo deste trabalho foi à resistência frente aos antibacterianos da classe dos beta-lactâmicos dos isolados *E. coli* em água de consumo e de rio nas comunidades do entorno da RESEX Estuarina de Tracuateua, Estado do Pará. Para consolidar esses dados, as amostras de água foram coletadas em dois períodos (Junho/2016 e Agosto/2016) e posteriormente foram encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia Ambiental da Universidade Federal do Pará, para pesquisa dos indicadores sanitários, seguindo o isolamento e identificação de *E. coli* e teste do perfil de sensibilidade aos antibacterianos. Foram selecionadas, de forma aleatória, 20 isolados de *E. coli* de cada período de amostragem. Foi possível observar nos resultados da análise que tanto na água de consumo quanto na de rio, houve presença de *E. coli* e concomitantemente resistência bacteriana em alguns antibacterianos testados, dentre eles, houve maior percentagem de resistência bacteriana ao antibacteriano ampicilina. Enquanto que nos 40 isolados, houve sensibilidade bacteriana à ceftriaxona, sulfazotrim, gentamicina e cefepime. Baseando-se nestes resultados e de acordo com a legislação vigente no país, destaca-se que a qualidade da água estava imprópria para o consumo devido presença de *E. coli*, que é considerado o principal indicador sanitário, assim como, a água de rio. Os isolados de *E. coli* apresentaram perfil resistência a diferentes antibacterianos, revelando riscos da circulação de linhagens resistentes no ambiente aquático.

Palavras – chave: Água; *Escherichia coli*; Resistência bacteriana

INTRODUÇÃO

A água é de extrema importância em todos os segmentos da vida, em uma escala mundial aproximadamente 97,5% é salgada e imprópria para o consumo humano, restando apenas uma pequena parcela disponível para consumo em rios, lagos e outros recursos hídricos¹. No Brasil, de acordo com a Portaria Nº2.914 de 12

de Dezembro de 2011 do Ministério de Saúde, toda água destinada ao consumo humano que atenda o padrão de potabilidade deve estar isenta de coliformes totais e *Escherichia coli*. Sobre as competências dos municípios, esta portaria infere que haja a execução de ações estabelecidas no VIGIAGUA e quando for detectada qualquer falha que seja relativa à qualidade dos serviços de abastecimento, deve-se manter articulações com as entidades de

regulação, bem como inspecionar, executar diretrizes e realizar procedimentos de análises microbiológicas completas².

Desse modo, a preservação da qualidade da água distribuída para a população é atribuição relevante do VIGIAGUA, visando a prevenção das doenças de veiculação hídrica. No entanto, algumas atividades humanas promovem alterações na qualidade e na composição de diversos recursos hídricos. Contaminações por fatores de origem química ou biológica, tais como: esgotos, aterros sanitários e produtos tóxicos agrícolas, contribuem na má qualidade da água distribuída para a população^{3,4}.

Ressalta-se ainda que quanto maior o nível de contaminação da água, maior será o risco de infecções gastrointestinais por enteropatógenos como *Vibrio cholerae*, *Salmonella typhi*, *Giardia lamblia*, Vírus da hepatite A, entre outros agentes que colonizam o trato intestinal. E na impossibilidade de se identificar todos os enteropatógenos na água, foi estabelecido, na portaria acima citada, a pesquisa de indicadores sanitários. Entre os indicadores destaca-se o grupo dos coliformes, que incluem os gêneros *Klebsiella* sp, *Enterobacter* sp, *Citrobacter* sp e a espécie *Escherichia coli*, que são membros da família Enterobacteriaceae⁶.

De acordo com a Portaria Nº2.914/2011 os coliformes totais são bacilos Gram-negativos, anaeróbios facultativos, não formadores de esporos, capazes de fermentar a lactose a 35°C. Entretanto, o Ministério da Saúde, por meio da Resolução Nº12, de 2 de janeiro de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) adotou a denominação coliformes a 45°C (considerando os padrões de coliformes termotolerantes e de origem fecal) ao invés de coliformes fecais, devido não ser correta a relação direta da presença de coliformes termotolerantes na água ou alimento com origem fecal, visto que bactérias como *Klebsiella* e *Enterobacter* também podem ser encontradas em outros ambientes tais como o solo e vegetais. Os coliformes termotolerantes

apresentam-se como subgrupos das bactérias do grupo coliforme, fermentam lactose a 44,5°C em 24 horas, tendo como o principal bioindicador de origem fecal presente na água a *Escherichia coli*^{8,9}.

Destaca-se que a *E. coli* são bactérias classificadas como anaeróbias facultativas, Gram-negativas, presentes na microbiota entérica animal e humana. A espécie comensal que reside no intestino não é patogênica^{10,11}. Entretanto, existem variedades patogênicas de *E. coli* que apresentam perfis diferentes das linhagens comensais, sendo classificadas em seis categorias: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* produtora da toxina de Shiga (STEC), também chamada enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* de aderência difusa (DAEC). Destaca-se que essas linhagens causam infecções intestinais ou entéricas nos seres humanos^{12,13}. São também consideradas importantes no desenvolvimento da resistência aos antibacterianos, possuindo uma alta capacidade para adquirir ou transmitir genes de resistência a bactérias filogeneticamente distantes¹⁴.

Um mecanismo que confere resistência aos antibacterianos ocorre por meio da enzima beta-lactamase que é sintetizada por linhagens de *E. coli* e *Klebsiella* sp., em particular, e outras bactérias produtoras de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL). Esta enzima hidrolisa a ligação amida dos antibacterianos beta-lactâmicos inibindo sua ação¹⁵. Os beta-lactâmicos são de grande importância clínica e engloba quatro famílias: cefalosporinas, penicilinas, monobactâmicos e carbapenêmicos. Outro exemplo de mecanismo de resistência é ocasionado por plasmídeos e transposons, que proporcionam modificações genéticas, bem como alterações no sítio alvo dos antibacterianos, efluxo rápido e inativação da droga^{16,17}.

A utilização de medicamentos em produção animal com fins terapêuticos de profilaxia, o iodo de esgoto e excretos de

animais com a finalidade de adubação, contribuem na disseminação de resíduos de antibióticos no meio ambiente. Desse modo, esses resíduos podem acumular-se nos solos, sofrer a ação da lixiviação ou serem transportados para os corpos hídricos¹⁸.

Considerando que linhagens bacterianas multirresistentes podem ser encontradas na água e oferecem sérios riscos à saúde pública, o presente trabalho objetivou analisar o perfil de resistência aos antibacterianos de isolados de *Escherichia coli* da água de consumo e de rio utilizada pelas comunidades habitantes do entorno da RESEX de Tracuateua, estado do Pará.

METODOLOGIA

a) Área de estudo: A Reserva Extrativista (RESEX) Marinha de Tracuateua é uma Unidade de Conservação Federal de Uso Sustentável, localizada no município de Tracuateua, estado do Pará, criada pelo Decreto Presidencial s/nº de 20/05/2005. A reserva apresenta uma área total aproximada de 27.153,670 ha, sendo 8.113,802 ha de espelho d'água e os demais 19.039,868 ha com manguezais (especialmente), restingas, praias, campos alagados e ilhas. A base principal da atividade extrativista é a pesca artesanal (peixes, crustáceos e moluscos), beneficiando 53 comunidades agroextrativistas, organizadas em sete pólos e que congregam um universo aproximado de 2.100 famílias, totalizando cerca de 6.500 pessoas.

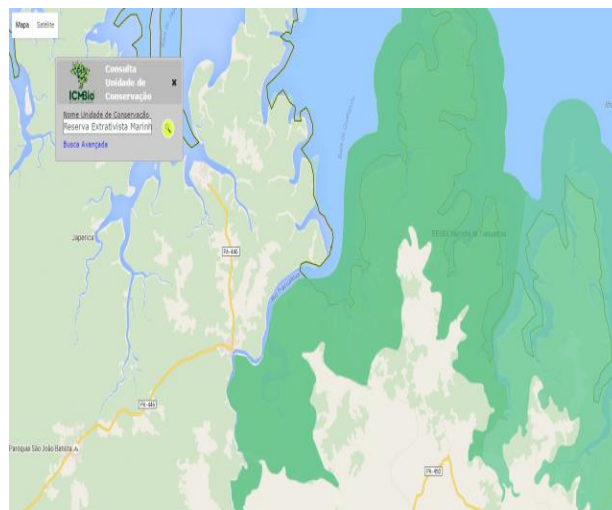


Figura 1—Reserva Extrativista (RESEX) Marinha de Tracuateua-PARÁ.

b) Desenho de estudo: O presente estudo é do tipo descritivo, transversal e está vinculado ao projeto “RESEX Tracuateua: uma abordagem ambiental, socioeconômica e sanitária”, aprovado no Edital 005/2014/ FAPESPA—Tema: Sociedade e Sustentabilidade Urbano/Rural.

c) Coleta do material:

c.1. Coleta de Água de Consumo e de Rio: No mês de Junho/2016 foi realizada visita em três comunidades da RESEX. Na ocasião das visitas foram coletadas amostras de água nos domicílios, em escolas (torneira/bebedouro) e de soluções alternativas coletivas (SAC) e individuais (SAI), localizadas nas comunidades do entorno da RESEX. Foi recolhido volume de 100mL de água das torneiras e de beber (garrafas PET, filtros e outros) em bolsas plásticas estéreis (*Thio Bag*). Na tabela abaixo estão listadas as comunidades visitadas na RESEX.

Tabela 1 - Visita nas comunidades da RESEX no mês de Junho/2016, Tracuateua-PA.

Comunidade	Número de Amostras
Comunidade Ferreira Pinto	14
Comunidade Cocal	5
Comunidade Santa Maria	3

Foi realizada em agosto de 2016 a coleta de água em oito pontos de amostragens no rio Tracuateua. Volumes de 100 mL foram recolhidos em bolsas plásticas estéreis (*Thio Bag*) para análise laboratorial. Os procedimentos de coleta, armazenamento e transporte seguiram as recomendações do Guia Nacional de Coleta e Preservação de Amostras de Água (CETESB/ANA, 2011)¹⁹.

d) Análise Laboratorial:

d.1. Análise Laboratorial da Água de Consumo:

As amostras de água coletadas foram enviadas ao Laboratório de Microbiologia Ambiental localizado na Universidade Federal do Pará (UFPA) para pesquisa dos indicadores sanitários através da Técnica do Substrato Cromogênico Definido ONPG-MUG (INDEXX/Colilert®), de acordo com o *Standard Methods for the Examination of Water and Waster water* (APHA, 2005)²⁰. Em cada amostra coletada foi adicionado um flaconete contendo o reagente enzimático, seguindo breve homogeneização, e transferência para a cartela Quanti-Tray /2000 com 97 cavidades, visando à quantificação de Coliformes totais e *E. coli*. As cartelas foram lacradas na seladora e incubadas por 24 horas a 35±2°C. Os resultados foram verificados com a mudança de cor nas cavidades da cartela, considerando positividade para Coliformes totais as cavidades de tonalidade amarela. E a presença de *E. coli* foi confirmada através da fluorescência das cavidades quando submetidos à luz UV de 365nm. Os resultados eram quantificados e comparados na tabela para NMP/100mL que acompanha a cartela Quanti-Tray/2000.

d.2. Análise Laboratorial da Água Superficial:

A água superficial foi coletada em oito pontos de amostragem no rio Tracuateua (PA), no dia

agosto/2016. Foi realizada a pesquisa dos indicadores sanitários através da Técnica do Substrato Cromogênico Definido ONPG-MUG (INDEXX/Colilert®), de acordo com o *Standard Methods for the Examination of Water and Waster water* (APHA, 2005)²⁰. Para a determinação do Número Mais Provável (NMP) foi utilizada a água bruta e diluída (10⁻⁰ e 10⁻¹), onde foi adicionado, em cada 100 mL da amostra de água, o reagente enzimático, seguindo breve homogeneização, e transferência para a cartela Quanti-Tray/2000 com 97 cavidades, visando à quantificação de Coliformes totais e *E. coli*. As cartelas foram lacradas na seladora e incubadas por 24 horas a 35±2°C. Os resultados foram verificados com a mudança de cor nas cavidades da cartela, considerando positividade para Coliformes totais os poços de tonalidade amarela. A presença de *E. coli* foi confirmada através da fluorescência dos poços da cartela quando submetidos à luz UV de 365nm. Os resultados eram quantificados e comparados na tabela para NMP/100mL que acompanha a cartela Quanti-Tray/2000.

d.3. Isolamento e Identificação de *Escherichia coli*:

Foram semeadas alíquotas do cultivo das cartelas Quanti-Tray em Ágar Eosina Azul de Metileno (EMB), seguindo incubação por 24 horas na estufa a 35±2°C. Após o período de incubação, foram selecionadas de 3 a 5 colônias de cada placa e submetidas aos testes de identificação fenotípica, entre os quais o comportamento metabólico verificado nos seguintes meios de cultivo: Ágar Açúcar Triplo Ferro (TSI), Fermentação da Glicose, Vermelho de Metila, Indol, Motilidade, Citrato de Simmons, Ágar Lisina Descarboxilase e Ágar Fenilalanina (Winn et al., 2008)²¹. Os isolados de *E. coli* confirmados foram estocados em meio de conservação.

e) Perfil de Sensibilidade aos Antimicrobianos:

De modo aleatório foram selecionadas 20 isolados de *Escherichia coli* procedentes de amostras de água coletadas nas comunidades da RESEX (consumo e beber) e 20 isolados da água superficial (rio), para a realização do teste de suscetibilidade aos antimicrobianos, a qual seguiu a técnica de

disco difusão em ágar (BRASIL, 2013)²². Desse modo, foi preparada uma suspensão bacteriana em solução salina esterilizada, e o aspecto da turvação foi comparado ao tubo 0,5 da escala de Mc Farland. Em seguida o material foi semeado com auxílio de swab estéril em placa contendo Ágar Mueller Hinton. Ao final foram depositados os seguintes discos de antibacterianos: Ampicilina 10µg; Imipenem 10µg; Ciprofloxacina 5µg; Aztreonam 30µg; Ceftriaxona 30µg; Sulfazotrim 30µg; Cefoxitina 30µg; Gentamicina 10µg; Cefepime 30µg; Amoxicilina 10µg; Amicacina 30µg; Ceftazidima 30µg. Após a incubação a 35 ± 2° C por 24 horas, foi realizada a leitura dos halos de inibição, seguindo a interpretação dos resultados de acordo com os critérios estabelecidos pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (BRASIL, 2003)²³.

e) Armazenamento dos dados: Os dados foram armazenados no programa Microsoft Excel, versão 2013, para análise e elaboração de gráficos e tabelas.

f) Aspectos Éticos: Destaca-se que o projeto foi registrado no Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade – SISBIO, com registro Nº 6297364, e coleta de água nos domicílios foi possível após autorização dos gestores da RESEX.

RESULTADOS

A tabela 2 mostra que no período de Junho/2016, dos 20 isolados de *E. coli* procedentes de água de consumo, é possível observar 4/20 isolados bacterianos resistentes em pelo menos um antibacteriano, 6/20 isolados bacterianos intermediários em pelo menos um antibacteriano e 10/20 isolados sensíveis aos 12 antibacterianos. Já na água coletada em agosto/2016 no rio Tracuateua (PA), dos 20 isolados, é possível observar 11/20 isolados bacterianos resistentes em pelo menos um ou mais antibacterianos, 5/20 isolados intermediários em pelo menos um ou mais antibacterianos e apenas 4/20 isolados sensíveis aos 12 antibacterianos utilizados.

Tabela 2- Perfil de resistência aos antibacterianos dos isolados de *E. coli* por período de coleta.

Período	N	R	I	S
Junho/2016 água de consumo	20	4 (20%)	6 (30%)	10 (50%)
Agosto/2016 água de rio	20	11 (55%)	5 (25%)	4 (20%)
Total	40	15(37,5%)	11(27,5%)	14 (35%)

Resistente (R); Intermediário (I); Sensível (S); Número de cepas (N).

Dentre os isolados procedentes da água de rio, 4 foram multirresistentes em pelo menos dois antibacterianos, sendo possível observar na tabela 3.

Tabela 3 – isolados de *E. coli* multirresistentes em pelo menos dois antibacterianos.

Nº	AMP	IPM	CIP	ATM	CRO	SUT	CFO	GEN	CPM	AMC	AMI	CAZ
1	x						x			x	x	
2							x			x		
3							x			x		
4	x	x										

Ampicilina (AMP); Imipenem (IPM); Ciprofloxacina (CIP); Aztreonam (ATM); Ceftriaxona (CRO); Sulfazotrim (SUT); Cefoxitina (CFO); Gentamicina (GEN); Cefepime (CPM); Amoxicilina (AMC); Amicacina (AMI); Ceftazidima (CAZ).

Em uma análise dos percentuais do perfil de resistência aos antibacterianos dos isolados procedentes da água de consumo, observa-se na figura 2 que houve resistência bacteriana somente aos antibacterianos ampicilina e imipenem.

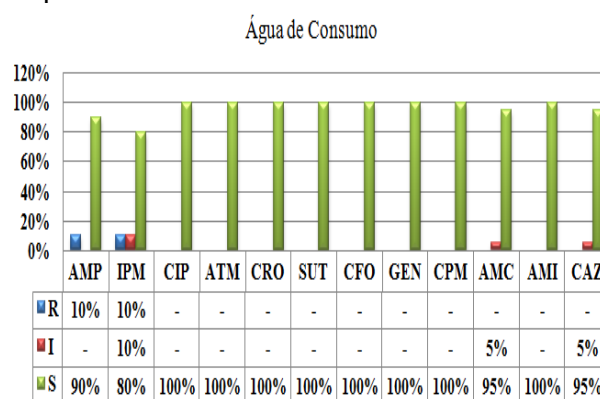


Figura 2 – Percentual do perfil de resistência aos

antibacterianos em amostras de água de consumo no período de 17/06/2016.

Para as amostras de rio, a figura 3 revela o maior percentual de resistência bacteriana à ampicilina (40%), valores altos de resistência bacteriana também foram observados para cefoxitina e amoxicilina, sucessivamente.

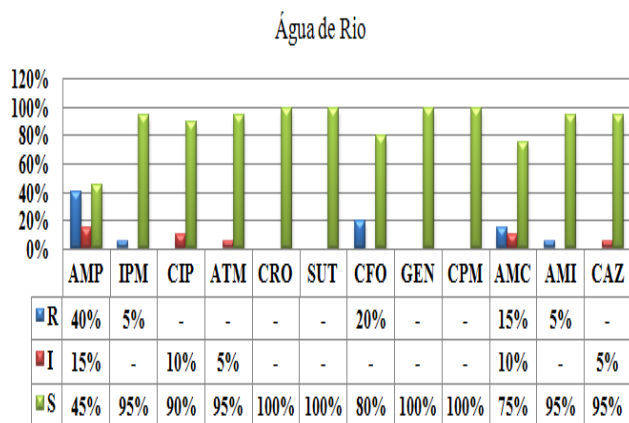


Figura 3 – Percentual do perfil de resistência aos antibacterianos em amostras de água de rio no período de 30/09/2016.

Em uma análise dos percentuais distribuídos para os 12 antibacterianos nos 40 isolados de *E. coli*, houve sensibilidade bacteriana aos antimicrobianos ceftriaxona, sulfazotrim, gentamicina e cefepime. Porém, a figura 4 mostra mais uma vez valores de resistência bacteriana evidentes à ampicilina, em comparação aos demais.

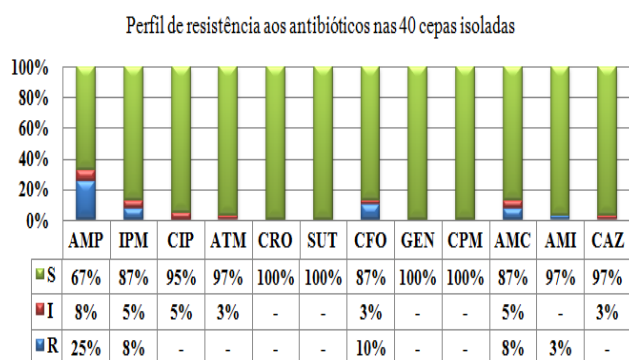


Figura 4– Perfil de resistência aos antimicrobianos nos 40 isolados de *E. coli* procedentes da água de consumo e de rio.

DISCUSSÃO

Corroborando com os resultados descritos anteriormente, um estudo realizado em um

tratamento de águas residuais e de rio com o objetivo de analisar a resistência bacteriana aos antimicrobianos de isolados de *E. coli*, houve maior índice de resistência bacteriana ao antibacteriano ampicilina (82%)²⁴. É possível comparar os resultados descritos acima também com outro trabalho, que revelou um percentual de 96% de resistência bacteriana à ampicilina em amostras de água de origem animal, humana e ambiental, reforçando mais uma vez os resultados do presente estudo²⁵.

Destaca-se que o perfil de resistência dos isolados de *E. coli* aos antimicrobianos observados neste trabalho, assemelha-se de forma corroborativa com os resultados de outras pesquisas realizados tanto no Brasil como em outros países, tal como o obtido em um sistema de abastecimento de água em São José do Rio Preto-SP onde foram detectados 44,4% de isolados resistentes à amoxicilina e 13,8% resistentes à ampicilina, 2,77% à cefepime, 8,33% para o imipenem e 1,38% à gentamicina. Entretanto, neste trabalho não houve resistência para cefepime e gentamicina. Já na localidade de Mmabatho, província noroeste da África do Sul, em diferentes fontes de água de consumo, demonstrou que todos os isolados testados foram resistentes à tetraciclina (5% - 95%), ampicilina (10% - 80%), Cloranfenicol (5% - 80%). Destes antibacterianos, apenas a ampicilina foi utilizada no atual estudo, o que comprova também a veracidade descrita nesta presente pesquisa^{26,27}.

Para resultados em água de consumo, é possível encontrar valores que confrontam com os descritos anteriormente. Em 2014, uma pesquisa realizada em Maringá-PR sobre a resistência bacteriana como consequência do uso inadequado de antibióticos, analisou as atividades de ciprofloxacina e estreptomicina em diferentes concentrações para análise de resistência de coliformes e *E. coli* em água de consumo. Em concentrações de 2 mg/L a 6 mg/L de ciprofloxacina observou-se uma prevalência elevada entre 20,9% e 9% para *E. coli* e concentrações intermédias (8 mg/L a 40 mg/L) valores entre 3,6% e 1,9%. Concentrações acima de 60 mg/L mostrou redução quase total das bactérias de um total de

7812 colônias e destas 262 eram de *E. coli*. Em comparação a este estudo, o presente trabalho utilizou ciprofloxacina 5µg e foi possível observar halos de inibição intermediários em apenas 10% dos isolados e nenhum halo de inibição resistente¹⁷.

Por sua vez, Carvalho (2013) que também coletou água de consumo para análise de resistência bacteriana, detectou percentuais maiores de resistência à penicilina, aztreonam, amoxicilina e cefoxitina, enquanto que à cefepime, ciprofloxacina e gentamicina apresentaram baixos percentuais de isolados resistentes. Dentre os antibacterianos utilizados no presente estudo, os isolados foram mais resistentes à penicilina, sensíveis à ciprofloxacina e um baixo percentual de resistência à gentamicina e cefepime.²⁸

Em nível mundial, as enterobactérias possuem alta resistência para ampicilina, tendo em vista a prevalência de diferentes genes promotores destas resistências a nível molecular²⁹. E a má qualidade de ambientes hídricos contaminados por bactérias que se mostram resistentes aos antimicrobianos não é um problema de saúde pública recente. A água não só dissemina essas bactérias resistentes entre as populações humanas, mas também permite que genes de resistência sejam introduzidos em outras bactérias ambientais e no ecossistema, alterando assim a sua potabilidade e microbiota ambiental^{30,31}.

A elevada quantidade de farmácias e drogarias (aproximadamente 82.204 no Brasil), número superior que a OMS recomenda, é um

outro fator que contribui para o índice de resistência bacteriana através do uso inadequado dos antibacterianos, bem como nas vendas sem a prescrição médica o que dificulta as inspeções pelos agentes sanitários. O erro nas prescrições dos antimicrobianos quanto as suas administrações põe em risco a segurança de muitos pacientes e também contribui para a resistência microbiana^{32,33}.

CONCLUSÃO

Baseando-se nos fatores estudados, conclui-se que a população residente na área da RESEX de Tracuateua, localizada no estado do Pará, apresentam no aspecto geral, condições precárias de habitação, renda e nível de escolaridade baixo, assim como deficiência na infraestrutura do saneamento básico. Ressalta-se ainda que a manipulação da água no domicílio e práticas higiênicas e sanitárias inadequadas favorece a contaminação da água de consumo nos domicílios, sendo considerada imprópria para o consumo, de acordo com a legislação brasileira, devido presença de Coliformes Totais e *Escherichia coli*. Por fim, o perfil de resistência dos isolados de *E. coli* de amostras de água de consumo e de rio (superficial) aos antimicrobianos, constitui-se em risco à saúde pública, uma vez que o ambiente, em particular o aquático, está servindo de depósito e disseminador de linhagens de bactérias resistentes a diferentes antibióticos.

Profile of antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolated from drinking water and Extractive Reserve – Tracuateua RESEX - PARÁ

ABSTRACT

Water quality is a determining factor for the maintenance of public health and its preservation is the relevant attribution of VIGIAGUA. In Brazil, Ordinance No. 9214 of December 12, 2011 of the Ministry of Health, establishes standards for the potability of water in which it must be free of total coliforms and *Escherichia coli*. Gastrointestinal infections from bacterial microorganisms such as diarrheogenic strains of *Escherichia coli* constitute a serious health problem still today and what determined the objective of this work was the resistance to the antibacterial class of the beta-lactams of the *E. coli*. To consume water and water in the communities around the Estuarine Estuary of Tracuateua, State of Pará. To consolidate this data, water samples were collected in two periods (June / 2016 and August / 2016) and later sent to the Laboratory Of Environmental Microbiology of the Federal University of Pará, to investigate the sanitary indicators, following the isolation and identification of *E. coli* and test of sensitivity profile to antibacterials. Twenty isolates of *E. coli* from each sampling period were randomly selected. It was possible to observe in the results of the analysis that in both drinking water and water, there was presence of *E. coli* and concomitantly bacterial resistance in some antibacterials tested, among them, there was a higher percentage of bacterial resistance to the antibacterial ampicillin. While in the 40 isolates, there was bacterial sensitivity to ceftriaxone, sulfazotrim, gentamicin and cefepime. Based on these results and according to the current legislation in the country, it is highlighted that the water quality was unfit for consumption due to the presence of *E. coli*, which is considered the main sanitary indicator, as well as, river water . The isolates of *E. coli* showed resistance profile to different antibacterials, revealing risks of the circulation of resistant strains in the aquatic environment.

Key - words: Water; *Escherichia coli*; Bacterial resistance

REFERÊNCIAS

1. Yamaguchi MU, Cortez LER, Ottoni LCC, Oyama J. Qualidade microbiológica da água para consumo humano em instituição de ensino de Maringá-PR. *O mundo da Saúde*, São Paulo. 2013; 37(3): 312-320.
2. BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria Nº 2.914, de 12 de Dezembro de 2011. Brasília: M.S, 2011.
3. Nascimento ED. Resistência bacteriana em reservatórios do semiárido brasileiro: Caracterização, ações para vigilância ambiental, prevenção e educação em saúde. Natal (RN): Universidade Federal do Rio Grande do Norte; 2016. 238 p.
4. Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Manual de controle da qualidade da água para técnicos que trabalham em ETAS / Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde. Brasília : Funasa, 2014.
5. Araújo MFFA, Nascimento VSF, Sant'Anna EME, et al. Doenças de veiculação hídrica:

- conhecendo e prevenindo. Vol único. Natal: EDUFRN, 2013.
6. World Health Organization. Guidelines for drinking-water quality 2nd ed. Surveillance and control of community supplies. Vol. 3. Geneva: WHO, 1997.
 7. Dantas AKD, Souza C, Ferreira MS, et al. Qualidade microbiológica da água de bebedouros destinada ao consumo humano. Rev Biociências, UNITAU. Vol. 16, n. 2. 2010.
 8. Fernandes LL, Gois RV. Avaliação das principais metodologias aplicadas às análises microbiológicas de água para consumo humano voltado para a detecção de coliformes totais e termotolerantes. Rev Cient da Facul de Educa e Meio Ambiente. 2015 jul-dez; 6(2):49-64.
 9. Flores AMPC, Melo CB. Principais bactérias causadoras de doenças de origem alimentar. Rev Bras Med Vet, Brasília. 2015 jan-mar; 37(1): 65-72.
 10. Mittelstaedt S, Carvalho VM. *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) O157: H7-revisão. Rev Inst Ciênc Saúde, São Paulo. 2006 jul-set; 24(3): 175-82.
 11. Souza CO, Melo TRB, Melo CSB, et al. *Escherichia coli* enteropatogênica: uma categoria diarreio gênica versátil. Rev Pan-Amaz Saúde, Ananindeua, Pará, Brasil. 2016; 7(2): 79-91.
 12. Amisano G, Fonasero S, Migliaretti G, et al. Diarrheagenic *Escherichia coli* in acute gastroenteritis in infants in North-West Italy. New Microbiologica, Italy; 2011 apr-aug; 34, 45-51.
 13. Costa CMS. Caracterização molecular de amostras de *Escherichia coli* carreadoras dos genes stx isoladas de bovinos nos Estados de Rondônia e do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro (RJ): Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Fundação Oswaldo Cruz, Departamento de Ciências Biológicas, Departamento de Saneamento e Saúde Ambiental; 2013. 100 p.
 14. Marinho CAM. Resistência a antibióticos em *Enterococcus* spp. e *Escherichia coli* de equinodermes: um problema ambiental e de saúde pública. Vila Real, Portugal: Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro; 2013. 109 p.
 15. August GR, Superti S, Zavascki AP. Prevalência de produção de beta-lactamases de espectro estendido em bacteremias por *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*. *Scientia Medica*, Porto Alegre. 2010; 17(40): 192-196.
 16. Schito GC, Pesce A, Debbia EA, Marchese A. The beta-lactamase problem: new therapeutic options. J Chemother., 1995; 7 Suppl 1:5-8
 17. Goll AS, Faria MGGI. Resistência bacteriana como consequência do uso inadequado de antibióticos. BJSCR, Maringá-PR. 2014; 7(1): 69-72.
 18. Regitano JB, Leal RMP. Comportamento e impacto ambiental de antibióticos usados na produção animal brasileira. Rev Bra Ciên do Solo, São Paulo. 2010; 34(3): 601-616.
 19. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. Guia Nacional de Coleta e Prevenção de Amostras: água, sedimento, comunidades

- aquáticas e efluentes líquidos. São Paulo: CETESB; Brasília: ANA, 2011. 32p.
20. American Public Health Association. *Standard Methods for the Examination of Water and Wasterwater*. Washington: APHA, 2005.
 21. Winn JWC. et al. Koneman Diagnóstico Microbiológico: Texto e Atlas Colorido. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 1691p.
 22. BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Manual Prático de Análise de Água. 4ª ed. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 2013.
 23. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-Difusão: Norma Aprovada – 8ª ed. Brasília: MS/ANVISA, 2003.
 24. Koczura R, Mockraka J, Ablonka E, et al. Antimicrobial resistance of integron-harboring *Escherichia coli* isolates from clinical samples, waste water treatment plant and river water. *Science of the Total Environment*. 2012; 414: 680-685.
 25. Pastone APW. Análise da resistência a antimicrobianos e determinação dos grupos filogenéticos em isolados de *Escherichia coli* de origem ambiental, humana e animal, Porto Alegre, RS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2014. 66 p.
 26. Pereira LO. Perfil de resistência aos antimicrobianos em coliformes isolados do Sistema Municipal de Abastecimento de Água de São Jose do Rio Preto-SP, São Paulo: Universidade Estadual Paulista; 2013. 83 p.
 27. Kinge CNW, Ateba CN, Kawadza DT. Antibiotic resistance profiles of *Escherichia coli* isolated from different water sources in the Mmabatho locality, north-west province, South Africa, *S Afr*. 2010; 106(1/2): 6-14.
 28. Carvalho BMF. Qualidade hídrica e perfil de resistência de bactérias heterotróficas em águas de nascentes sobre diferentes usos do solo, na microbacia do ribeirão José Pereira (Itajubá – MG), Minas Gerais: Universidade Federal de Itajubá; 2015. 92 p.
 29. Mosquito S, Ruiz J, Bauer JL, Ochoa TJ. Mecanismos moleculares de resistencia antibiótica en *Escherichia coli* asociadas a diarrea. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2011;28(4):648-56.
 30. Baqueiro F, Martínez JL, Cantón R. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Current Opinion in Biotechnology*. 2008, 19:260–265.
 31. Araújo JG, Alves EMG, Bechtluft MP. Perfil de DNA plasmidial em bactérias resistentes a antibióticos isoladas do Ribeirão Paciência – Pará de Minas – MG. *Rev Digital FAPAN, Pará de Minas*, 2009;1(1):282-292.
 32. Mota LM, Vilar FC, Dias LB, et al. Uso racional de antibióticos. *Medicina (Ribeirão Preto)*. São Paulo. 2010; 43(2): 72-164.
 33. Franco JMPL, Menezes CDA, Cabral FRF et al. Resistência bacteriana e o papel do farmacêutico frente ao uso irracional de antimicrobianos: revisão integrativa. *Rev e-Ciênc*. 2015; 3(2):57-65.

