

**IDENTIFICAÇÃO E PERFIL DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS DE  
BACTÉRIAS ISOLADAS DE DIFERENTES AMOSTRAS PROVENIENTES DO  
ATERRO CONTROLADO DA CIDADE DE CAMPOS DOS GOYTACAZES- RJ**

**MARIA LUIZA RIBEIRO DA COSTA SERAFIM**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES/RJ**

**JULHO - 2013**

**IDENTIFICAÇÃO E PERFIL DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS DE  
BACTÉRIAS ISOLADAS DE DIFERENTES AMOSTRAS PROVENIENTES DO  
ATERRO CONTROLADO DA CIDADE DE CAMPOS DOS GOYTACAZES- RJ**

**MARIA LUIZA RIBEIRO DA COSTA SERAFIM**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal na área de Doenças Infectocontagiosas e Parasitárias dos animais, do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense.

**ORIENTADOR: OLNEY VIEIRA DA MOTTA**

**Campos dos Goytacazes – RJ**

**Julho de 2013**

## **FICHA CATALOGRÁFICA**

Preparada pela Biblioteca do **CCTA / UENF** 102/2013

Serafim, Maria Luiza

Identificação e perfil de resistência a antimicrobianos de bactérias isoladas de diferentes amostras provenientes do aterro controlado da cidade de Campos dos Goytacazes / Nome completo. – 2013.

147 f. : il.

Orientador: Olney Vieira da Mota

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Campos dos Goytacazes, RJ, 2013.

Bibliografia: f. 101 – 114.

1. Resíduos 2. Micro-organismos 3. Resistência bacteriana 4. mecA  
I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. II. Título.

CDD – 614.57

**PESQUISA DO PERFIL DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS DE  
ESTIRPES BACTERIANAS ISOLADAS DO CHORUME, DE INDIVÍDUOS E DE  
ANIMAIS FREQUÊNTADORES DO ATERRO CONTROLADO DA CIDADE DE  
CAMPOS DOS GOYTACAZES-RJ**

MARIA LUIZA RIBEIRO DA COSTA SERAFIM

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal na área de Doenças Infectocontagiosas e Parasitárias dos animais, do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense.

Comissão Examinadora:

---

Prof. Marcio Manhães Folly (PhD., Medicina Veterinária)- UENF

---

Prof. João Carlos de Aquino Almeida (Doutor, Ciências Biológicas)- UENF

---

Prof<sup>a</sup>. Regina Célia de Souza Campos Fernandes (Doutora, Medicina)- FMC

---

Prof. Olney Vieira da Motta (Doutor, Biociências e Biotecnologia)- UENF

Orientador

Pr

## **Agradecimentos**

Agradeço a Deus, em primeiro lugar, pela saúde que tenho, pois sem saúde nada é possível.

Agradeço a minha família que sempre me apóia me ajuda e me compreende, em especial a minha mãe que sofreu e sorriu junto comigo em todos os momentos.

Agradeço ao meu orientador Professor Dr. Olney Vieira da Motta, pelos ensinamentos passados e pela compreensão em momentos difíceis ao longo dessa minha jornada.

Agradeço as médicas veterinárias Renata Lins, Maria Fabíola Rangel e Marina Blume pelo auxílio nas coletas e nas análises laboratoriais, sem elas a pesquisa não seria completa.

Agradeço as Técnicas de nível superior do Laboratório de Sanidade Animal – LSA, CCTA/UENF, Gina Nunes e Maria de Lourdes Bernadino por todo auxílio prestado.

Agradeço a Luciana Mathias e a Luiz Eckardt pelas dicas e pela boa vontade que tiveram ao me ajudar, me dando conselhos e dicas para enriquecer meu trabalho.

Agradeço aos meus amigos que me aturaram nos momentos de crise (risos) e me deram forças para continuar.

Agradeço as fontes de fomento pela auxílio financeiro.

Enfim, agradeço a todos que de alguma forma colaboraram para este trabalho.

**“Creio que a ciência e a paz triunfarão da ignorância e da guerra, que os povos  
chegarão a um acordo não para destruir, mas para construir, e que  
o futuro pertencerá aos que mais tiverem trabalhado para aliviar o sofrimento  
humano”**

**Pasteur**

## RESUMO

As doenças de caráter zoonótico ocupam um grande espaço dentro da cadeia de agravos que representam sérios riscos para a saúde coletiva. Entre os problemas enfrentados pela classe médica está o controle de entrada de micro-organismos patogênicos no ambiente hospitalar provenientes da comunidade em geral. A dificuldade de controle dos micro-organismos multirresistentes vai além dos ambientes hospitalares, pois muitos já estão disseminados no meio-ambiente, e inclusive, colonizam os indivíduos e seus animais. Vários locais, entre eles os lixões ou vazadouros, podem favorecer a troca genética entre micro-organismos resistentes a fármacos, como o *Staphylococcus aureus* resistente a Meticilina (MRSA). Este trabalho teve como objetivos isolar bactérias provenientes de amostras coletadas do chorume e de animais e pessoas que trabalhavam no Aterro Controlado da CODIN, em Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro. Ao todo foram coletadas 28 amostras de humanos atuantes como catadores de materiais recicláveis e de 14 animais domésticos frequentadores do aterro e de animais que mantinham contato com esses catadores. Após a identificação dos micro-organismos por técnicas de rotina laboratorial e os perfis de resistência e suscetibilidade das cepas foram testados por antibiogramas pelo método de difusão em disco na presença de 11 fármacos. As cepas de *Staphylococcus* spp. que apresentaram resistência fenotípica a oxacilina foram submetidas a análise molecular, foram feitas PCR de 12 cepas, sendo encontrado a presença do gene *mecA* em 11 cepas. Foram identificadas 187 cepas bacterianas, dessas 47 pertencem ao gênero *Staphylococcus* spp., 114 pertencem a família Enterobacteriaceae e 26 são bastonetes Gram negativos não fermentadores.

PALAVRAS-CHAVE: Resíduos, micro-organismos, resistência bacteriana, *mecA*.

## ABSTRACT

Zoonotic diseases occupy a large space within the chain of diseases that pose serious risks to health. Among the problems faced by the medical profession is the input control pathogenic microorganisms in the hospital environment from the wider community. The difficulty of controlling microorganisms multiresistant goes beyond the hospital environment, as many are already widespread in the environment, and even colonize individuals and their animals. Several sites, including landfills or dumps, can favor genetic exchange between micro-organisms resistant to drugs such as *S. aureus* resistant to methicillin (MRSA). This study aimed to isolate bacteria from samples of manure and animals and people who worked in the Landfill CODIN, in Campos, Rio de Janeiro. Altogether 28 samples were collected from humans acting as collectors of recyclable materials and 14 pets goes landfill and animals that were in contact with these scavengers. After the identification of micro-organisms by routine laboratory techniques and profiles of resistance and susceptibility of the strains were tested for antibiotic susceptibility by the disk diffusion method in the presence of 11 drugs. The samples of *Staphylococcus* spp. that showed phenotypic resistance to oacillin were subjected to molecular analysis were performed PCR of 12 strains, and found the presence of the *mecA* gene in 11 strains. Was identified 187 bacterial strains, 47 of these belong to the genus *Staphylococcus* spp., 114 belong to the family *Enterobacteriaceae* and 26 are non-fermenting Gram-negative rods.

KEYWORDS: waste, microorganisms, bacterial resistance, *mecA*.

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                           |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1: Diagrama das vias de acesso dos agentes patogênicos através dos resíduos sólidos.....                                                                                           | 24 |
| Figura 2: Localização espacial do aterro controlado da CODIN– delimitado em vermelho, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro.....                                                          | 45 |
| Figura 3: Coordenadas espaciais (Longitude e Latitude) do Aterro Controlado da CODIN.....                                                                                                 | 46 |
| Figura 4: Visão panorâmica do aterro controlado de Campos dos Goytacazes-RJ, com a presença de animais domésticos se alimentando no local.....                                            | 47 |
| Figura 5: Presença de animais de estimação se alimentando na área do aterro controlado de Campos dos Goytacazes-RJ e ao fundo, a lagoa que serve de fonte de água para estes animais..... | 47 |
| Figura 6: Chorume acumulado, de coloração amarronzada e proveniente do aterro controlado de Campos dos Goytacazes-RJ.....                                                                 | 48 |
| Figura 7: Deposição de lixo e presença de urubus que funcionam como vetores, e ao fundo a lagoa.....                                                                                      | 49 |
| Figura 8: Locais demarcados para coleta do chorume.....                                                                                                                                   | 50 |
| Figura 9: Realização da coleta de chorume em local demarcado.....                                                                                                                         | 51 |
| Figura 10: Coleta de suabe oral sendo realizada em felino.....                                                                                                                            | 56 |
| Figura 11: Coleta de suabe nasal sendo realizada em cão.....                                                                                                                              | 56 |
| Figura 12: Coleta de suabe nasal sendo realizada em catadora de material reciclável.....                                                                                                  | 57 |
| Figura 13: Coleta de suabe nasal sendo realizada em catadora de material reciclável.....                                                                                                  | 58 |

Figura 14: Resultados do Gel de agarose por eletroforese: amplificação de genes mecA de Staphylococcus isolados de suabe nasal de humanos.....83

Figura 15: Resultados do Gel de agarose por eletroforese: amplificação de genes mecA de Staphylococcus isolados de suabe nasal de cães.....83

Figura 16: Material hospitalar desenterrado com resto de material biológico...86

Figura 17: Material hospitalar desenterrado com resto de material biológico...86

## LISTA DE QUADROS

|                                                                                                                 |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Quadro 1: Ordem crescente de resistência microbiana no ambiente.....                                            | 22. |
| Quadro 2: Principais patógenos entéricos e sistêmicos e principais patógenos oportunistas.....                  | 30  |
| Quadro 3: Classe dos antibióticos e os diversos mecanismos de resistência envolvidos.....                       | 40  |
| Quadro 4: Marcador molecular utilizado para amplificação do gene <i>mecA</i> .....                              | 62  |
| Quadro 5: Local de isolamento, identificação do micro-organismo e quantidade de cepas isoladas.....             | 65  |
| Quadro 6: Local de isolamento, identificação do micro-organismo e quantidade de cepas isoladas.....             | 66  |
| Quadro 7: Local de isolamento, identificação do micro-organismo e quantidade de cepas isoladas.....             | 67  |
| Quadro 8: Identificação do micro-organismo, estação em que ocorreu a coleta e quantidade de cepas isoladas..... | 69  |
| Quadro 9: Identificação do micro-organismo, estação em que ocorreu a coleta e quantidade de cepas isoladas..... | 70  |
| Quadro 10: Quantidade de cepas de <i>E. coli</i> e <i>Proteus vulgaris</i> isolados.....                        | 88  |
| Quadro 11: Espécie de <i>Proteus</i> isolado e quantidade de cepas.....                                         | 88  |
| Quadro 12: Espécie de <i>Enterobacter</i> isolada e quantidade de cepas.....                                    | 89  |

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Antibióticos utilizados nos testes de antibiograma para avaliação do perfil de resistência fenotípica de bactérias Gram positivas e negativas.....59

Tabela 2: Porcentagem de *Staphylococcus spp.* sensíveis (S), intermediários (I) e resistentes (R) a cada antibacteriano testado.....72

Tabela 3: Porcentagem de *Enterobacteriaceae* sensíveis (S), intermediários (I) e resistentes (R) a cada antibacteriano testado.....73

Tabela 4: Porcentagem de BGNNF sensíveis (S), intermediários (I) e resistentes (R) a cada antibacteriano testado.....74

## LISTA DE GRÁFICOS

|                                                                                                                                                 |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Gráfico 1: Prevalência de Enterobacteriaceae e BGNNF no chorume de acordo com a estação do ano.....                                             | 71 |
| Gráfico 2: Perfil de susceptibilidade das amostras de Staphylococcus spp. de origem animal aos antimicrobianos testados.....                    | 75 |
| Gráfico 3: Perfil de susceptibilidade (em porcentagem) das amostras de Enterobacteriaceae de origem animal aos antimicrobianos testados.....    | 76 |
| Gráfico 4: Perfil de susceptibilidade (em porcentagem) das amostras de BGNNF de origem animal aos antimicrobianos testados.....                 | 77 |
| Gráfico 5: Perfil de susceptibilidade (em porcentagem) das amostras de Staphylococcus de origem humana aos antimicrobianos testados.....        | 78 |
| Gráfico 6: Perfil de susceptibilidade (em porcentagem) das amostras de Enterobacteriaceae de origem humana aos antimicrobianos testados.....    | 79 |
| Gráfico 7: Perfil de susceptibilidade (em porcentagem) das amostras de BGNNF de origem humana aos antimicrobianos testados.....                 | 80 |
| Gráfico 8: Perfil de susceptibilidade (em porcentagem) das amostras de Enterobacteriaceae isoladas do chorume aos antimicrobianos testados..... | 81 |
| Gráfico 9: Perfil de susceptibilidade (em porcentagem) das amostras de BGNNF isoladas do chorume aos antimicrobianos testados.....              | 82 |

## LISTA DE ORGANOGRAMAS

|                                                                                                 |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Organograma 1: metodologia empregada para identificação dos Staphylococcus.....                 | 53 |
| Organograma 2: metodologia empregada para Identificação Família Enterobacteriaceae e BGNNF..... | 54 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

|                  |                                                        |
|------------------|--------------------------------------------------------|
| ATCC             | <i>“American type culture collection”</i>              |
| AMH              | Agar Mueller Hinton                                    |
| ANVISA           | Agência Nacional de Vigilância Sanitária               |
| BGNF             | Bastonetes Gram-negativos não fermentadores de glicose |
| BHI              | <i>“Brain Heart Infusion”</i>                          |
| CH <sub>4</sub>  | Metano                                                 |
| CLSI             | <i>“Clinical and Laboratory Standards Institute”</i>   |
| CO <sub>2</sub>  | Dióxido de Carbono                                     |
| DNA              | Ácido desoxirribonucleico                              |
| EPI              | Equipamentos de Proteção Individual                    |
| ESBL             | Beta-lactamases de Espectro Estendido                  |
| H <sub>2</sub> S | Ácido sulfídrico                                       |
| MecA             | Gene que codifica resistência à meticilina/oxacilina   |
| MRSA             | <i>“Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus”</i>   |
| OMS              | Organização Mundial de Saúde                           |
| PBP              | <i>“Penicillin-Binding Protein”</i>                    |
| PCR              | Reação em Cadeia da Polimerase                         |
| RSS              | Resíduos Serviço de Saúde                              |
| RSU              | Resíduos Sólidos Urbanos                               |
| SCCmec           | <i>“Staphylococcal Cassette Chromosome mec”</i>        |

|              |                                                                                                                                   |
|--------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| SCN          | <i>Staphylococcus</i> Coagulase Negativa                                                                                          |
| SDS          | Dodecil Sulfato de Sódio                                                                                                          |
| UFC          | Unidades Formadoras de Colônia                                                                                                    |
| VP           | Prova de Voges-Proskauer                                                                                                          |
| AMO          | Amoxicilina                                                                                                                       |
| AMI          | Amicacina                                                                                                                         |
| ATM          | Aztreonam                                                                                                                         |
| CEP/ISECENSA | Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos dos Institutos Superiores de Ensino do Centro Educacional Nossa Senhora Auxiliadora |
| CFL          | Cefalotina                                                                                                                        |
| CIM          | Concentração Inibitória Mínima                                                                                                    |
| CFO          | Cefoxitina                                                                                                                        |
| CIP          | Ciprofloxacina                                                                                                                    |
| CLI          | Clindamicina                                                                                                                      |
| CLO          | Cloranfenicol                                                                                                                     |
| CPM          | Cefepime                                                                                                                          |
| CTX          | Cefotaxima                                                                                                                        |
| BEM          | Eosina Azul de Metileno                                                                                                           |
| GEN          | Gentamicina                                                                                                                       |
| HIV          | Vírus da Imunodeficiência Humana                                                                                                  |

|         |                                                                         |
|---------|-------------------------------------------------------------------------|
| IBGE    | Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística                         |
| IPM     | Imipenem                                                                |
| MER     | Meropenem                                                               |
| MI      | Mililitros                                                              |
| OXA     | Oxacilina                                                               |
| PNSB    | Pesquisa Nacional de Saneamento Básico                                  |
| PEN     | Penicilina G                                                            |
| SIM     | Sulfito Indol Motilidade                                                |
| SUT     | Sulfazotrim                                                             |
| TET     | Tetraciclina                                                            |
| TOB     | Tobramicina                                                             |
| TSA     | Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos                               |
| VAN     | Vancomicina                                                             |
| CA-MRSA | <i>Staphylococcus aureus</i> meticilina resistente da comunidade        |
| HA-MRSA | <i>Staphylococcus aureus</i> meticilina resistente de origem hospitalar |
| SIG     | “ <i>Staphylococcus intermedius</i> group”                              |
| VRE     | <i>Enterococcus</i> resistente à vancomicina                            |
| VanA    | Gene que codifica resistência a Vancomicina                             |
| VRSA    | <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a Vancomicina                   |
| SCP     | <i>Staphylococcus</i> coagulase positivo                                |

## SUMÁRIO

|                                                                      |           |
|----------------------------------------------------------------------|-----------|
| Resumo.....                                                          | vi        |
| Abstract.....                                                        | vii       |
| Lista de Figuras.....                                                | viii      |
| Lista de Quadros.....                                                | ix        |
| Lista de Tabelas.....                                                | x         |
| Lista de Gráficos.....                                               | xi        |
| Lista de Organogramas.....                                           | xii       |
| Lista de Abreviaturas.....                                           | xiii      |
| Sumário.....                                                         | xiv       |
| <b>1-Introdução.....</b>                                             | <b>15</b> |
| <b>2- Justificativa.....</b>                                         | <b>17</b> |
| <b>3- Objetivos.....</b>                                             | <b>18</b> |
| 3.1- Objetivos gerais.....                                           | 18        |
| 3.2- Objetivos específicos.....                                      | 18        |
| <b>4- Revisão de Literatura.....</b>                                 | <b>19</b> |
| 4.1- Resíduos.....                                                   | 19        |
| 4.2- Zoonoses e Saúde Pública.....                                   | 23        |
| 4.3- Micro-organismos .....                                          | 25        |
| 4.3.1- Microbiota normal do corpo humano.....                        | 25        |
| 4.4- Bactérias patogênicas de interesse médico.....                  | 25        |
| 4.4.1- <i>Staphylococcus</i> .....                                   | 25        |
| 4.4.1.1- <i>Staphylococcus</i> coagulase-positivo.....               | 27        |
| 4.4.1.2- <i>Staphylococcus</i> coagulase-negativo.....               | 28        |
| 4.4.2- Enterobactérias.....                                          | 29        |
| 4.4.2.1- Principais gêneros da família Enterobacteriaceae.....       | 30        |
| 4.4.3- Bastonetes Gram negativos não fermentadores.....              | 37        |
| 4.5- Resistência Bacteriana.....                                     | 38        |
| 4.5.5.1- Mecanismos de resistência de <i>Staphylococcus</i> spp..... | 40        |
| 4.5.5.2- Mecanismos de resistência das bactérias Gram-negativas..... | 42        |

|                                                                                                                                                      |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.6- Fatores de risco para emergência de resistência bacteriana aos antimicrobianos.....                                                             | 43        |
| <b>5- Materiais e Métodos.....</b>                                                                                                                   | <b>44</b> |
| 5.1- Local de Estudo.....                                                                                                                            | 44        |
| 5.2- Amostras do Chorume.....                                                                                                                        | 50        |
| 5.3- Amostras de Animais.....                                                                                                                        | 55        |
| 5.4- Amostras de Humanos.....                                                                                                                        | 57        |
| 5.5- Testes de Resistência frente ao uso de antimicrobianos.....                                                                                     | 58        |
| 5.6- Análise Molecular – PCR das cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> que apresentaram resistência fenotípica resistentes à meticilina (MARSA)..... | 60        |
| 5.7- Análises Estatísticas.....                                                                                                                      | 62        |
| <b>6- Resultados.....</b>                                                                                                                            | <b>63</b> |
| 6.1-Identificação das Cepas.....                                                                                                                     | 63        |
| 6.1.1- Amostras de Humanos.....                                                                                                                      | 63        |
| 6.1.2- Amostras de Animais.....                                                                                                                      | 64        |
| 6.1.3- Amostras do Chorume.....                                                                                                                      | 67        |
| 6.2- Perfil Fenotípico de Resistência.....                                                                                                           | 72        |
| 6.2.1- <i>Staphylococcus</i> spp.....                                                                                                                | 72        |
| 6.2.2- Família <i>Enterobacteriaceae</i> .....                                                                                                       | 73        |
| 6.2.3- Bastonetes GRAM negativos não fermentadores.....                                                                                              | 74        |
| 6.2.4- Perfil de Susceptibilidade aos antimicrobianos por grupos de amostras.....                                                                    | 75        |
| 6.3- Perfil Genotípico de Resistência das cepas de <i>Staphylococcus</i> spp. à oxacilina.....                                                       | 82        |
| <b>7- Discussão.....</b>                                                                                                                             | <b>84</b> |
| 7.1- Espécies bacterianas encontradas.....                                                                                                           | 87        |
| 7.2- Perfil de resistência aos antimicrobianos.....                                                                                                  | 90        |
| 7.2.1- <i>Staphylococcus</i> spp.....                                                                                                                | 91        |
| 7.2.1.1- Análise Molecular - PCR.....                                                                                                                | 92        |
| 7.2.2- <i>Enterobacteriaceae</i> .....                                                                                                               | 95        |
| 7.2.3- Bastonetes GRAM negativos não fermentadores.....                                                                                              | 96        |
| <b>8- Conclusão.....</b>                                                                                                                             | <b>98</b> |
| <b>9- Considerações finais.....</b>                                                                                                                  | <b>99</b> |

|                                                   |            |
|---------------------------------------------------|------------|
| <b>10- Referências.....</b>                       | <b>100</b> |
| <b>11- APÊNDICE I.....</b>                        | <b>114</b> |
| II- Artigo Submetido.....                         | 114        |
| II-Quadro Geral.....                              | 139        |
| III- Questionário aplicado à população-alvo.....  | 142        |
| IX- Termo de consentimento livre esclarecido..... | 123        |

## 1- Introdução

Enquanto as cidades vêm se expandindo, a ocupação das áreas rurais é reduzida e, conseqüentemente o crescimento populacional cresce mais rápido do que a infraestrutura urbana. A densidade populacional das cidades e seu crescimento desordenado, aliado ao aumento do uso de produtos descartáveis, sintéticos e o incentivo ao consumismo desenfreado são fatores que vem contribuindo para o aumento dos problemas sociais e ambientais com relação aos resíduos gerados pela população.

Pesquisadores, ambientalistas e autoridades governamentais vêm buscando métodos de gestão dos resíduos sólidos urbanos e dos resíduos de serviço de saúde, para que causem menos danos ao serem descartados. Atualmente, no Brasil, a maior porcentagem desses resíduos vai para aterros sanitários, aterros controlados, lixões ou vazadouros. Os produtos gerados pela decomposição dos resíduos não sofrem tratamento e conseqüentemente contaminam o solo, o lençol freático e todo o ambiente ao seu entorno, e essa situação se reflete nos setores envolvidos com as questões ambientais, de saneamento e de saúde pública.

Os locais onde os resíduos são descartados são altamente insalubres e pela grande quantidade de material orgânico viabilizam o crescimento e a manutenção de micro-organismos, alguns podem ser altamente patogênicos, possuírem caráter zoonótico e apresentarem perfil de resistência a diversas classes de antimicrobianos. Além disso, como os micro-organismos presentes nesses locais são oriundos de diversas fontes geradoras dos resíduos, suas características são muito variadas não existindo um padrão de bactérias específicas encontradas.

Esses tipos de ecossistemas são atrativos para vetores e o contato direto da população e dos animais com os micro-organismos presentes nesses ambientes aumenta o risco de infecções, principalmente nos indivíduos imunocomprometidos, crianças, idosos, pessoas com carência alimentar e usuários de drogas. Neste contexto, a presença de animais, em aterros controlados e lixões, constituem um agravante, incluindo os riscos intrínsecos,

que eventualmente desempenham o papel de vetores, aumentando o risco de zoonoses, em especial quando os animais envolvidos são, eventualmente, destinados para a alimentação da população local.

As zoonoses são um problema principalmente quando os programas na área de saúde pública são deficientes e de menor prioridade das autoridades governamentais. Os locais onde existe alta concentração de animais (principalmente caninos, felinos, bovinos, equinos, caprinos, aves e suínos) e humanos e, que recebem alta carga poluidora, são perfeitos para disseminação destas doenças.

Além de toda essa problemática, ainda existe a preocupação com o perfil de resistência das bactérias presentes nos líquidos residuais em decomposição nos aterros ou lixões. Essas bactérias podem ser oriundas de diferentes fontes, podendo sofrer pressão seletiva e seleção natural levando-as a apresentarem multirresistência, inclusive aos antimicrobianos de interesse clínico.

Considerando que o chorume pode carrear e veicular micro-organismos provenientes de diversas fontes geradoras de resíduos (resíduos sólidos urbanos e resíduos de serviço de saúde) também existe a possibilidade de patógenos desenvolverem-se nos resíduos sólidos, o que torna necessário pesquisar a incidência de outros micro-organismos que podem afetar a saúde pública, levando-se em consideração, inclusive, patógenos que apresentam multirresistência. Estes últimos constituem dados importantes para a epidemiologia das infecções na clínica médica, nas infecções hospitalares e na população de micro-organismos circulantes entre comunidades que estão adquirindo cada vez mais resistência por meio do uso indiscriminado de antibióticos.



## **2- Justificativa**

Os resíduos sólidos urbanos são um componente importante na avaliação do perfil epidemiológico e de agravos em uma comunidade, exercendo influência, ao lado de outros fatores, sobre a incidência das doenças (CUSSIOL, 2005). Segundo BARROS (1996), do ponto de vista sanitário, não se pode afirmar que o resíduo urbano seja causa direta de doenças. No entanto, está comprovado o seu papel na transmissão de doenças provocadas por parasitos e micro-organismos que vivem nos componentes presentes nos resíduos, além de encontrarem abrigo e fontes de alimento suficiente para sua sobrevivência.

Esta pesquisa foi realizada em um aterro controlado que está situado na região periurbana do município de Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro (Brasil). Este local foi escolhido justamente devido a sua proximidade a uma escola infantil, residências, a existência dos catadores de materiais recicláveis e diferentes espécies de animais, e uma lagoa dentro dos limites da área do aterro.

Devido a essa proximidade entre a população e os animais com os resíduos urbanos é de suma importância conhecer as cepas bacterianas presentes neste aterro e seus perfis de resistência aos antimicrobianos para melhor entender o potencial de riscos e a epidemiologia das doenças as quais estão susceptíveis os indivíduos que convivem neste local.

### **3- Objetivos**

#### **3.1- Gerais**

Identificar bactérias de interesse sanitário e zoonótico presentes nos líquidos residuais (chorume) oriundos da decomposição dos Resíduos Sólidos do aterro controlado do bairro CODIN em Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, nos catadores de material reciclável e nos seus respectivos animais de estimação.

#### **3.2- Específicos**

- Isolar e identificar cepas bacterianas presentes no chorume do aterro controlado da CODIN;

- Isolar e identificar as cepas bacterianas colonizadoras da mucosa nasal dos catadores de material reciclável atuantes neste aterro;

- Isolar e identificar as cepas bacterianas colonizadoras das mucosas (oral, nasal) e cloaca dos animais frequentadores do mesmo aterro.

- Avaliar as bactérias clinicamente relevantes, como as representantes da família *Enterobacteriaceae*, bastonetes Gram-negativos não fermentadores (BGNNF), cocos Gram-positivos do gênero *Staphylococcus* spp., além do perfil multirresistente destas bactérias;

- Investigar no chorume do aterro controlado os perfis de resistência de micro-organismos isolados de amostras coletadas de pontos previamente demarcados;

- Investigar a resistência fenotípica bacteriana através de Testes de Sensibilidade aos Antimicrobianos (TSA) pelo método de disco difusão em Agar - Kirby-Bauer, onde foram testados antibióticos de última geração, inclusive de uso em ambientes hospitalares;

- Analisar o perfil genotípico de *Staphylococcus* spp. isolados das diferentes fontes investigadas;

- Aplicação de um questionário (em anexo) aos sujeitos envolvidos na pesquisa com perguntas consideradas relevantes para o estudo.

## 4- Revisão de Literatura

### 4.1- Resíduos

O contínuo crescimento populacional tem sido um dos grandes responsáveis pelos problemas ambientais e de saúde pública neste século. Uma parte significativa desse problema está associada aos resíduos sólidos, produzidos diariamente nos grandes centros urbanos. Cada brasileiro produz em média 1,1 kg de lixo/dia, o que representa uma quantidade de 259.547 toneladas de resíduos sólidos por dia. Todo esse resíduo precisa ser disposto em algum local, e as formas de disposição final podem variar, sendo os mais comuns no Brasil os vazadouros, também conhecidos como lixões e os aterros (sanitários e controlados) (PACHECO, 2004; IBGE, 2008).

Segundo dados do IBGE, 2008, dos 5.564 municípios brasileiros, 5.562 contam com serviço de manejo de resíduos sólidos. Dentre estes 2.810 dispõem seus resíduos em vazadouros (lixões a céu aberto) sem nenhum critério de segurança e proteção ambiental; 14 dispõem em vazadouros em áreas alagadas ou alagáveis; 1.254 em aterros controlados; 1.540 em aterros sanitários; 211 utilizam unidade de compostagem de resíduos orgânicos; 643 possuem unidades de triagem de resíduos recicláveis; 34 possuem unidades de tratamento por incineração e 134 possuem outras formas de disposição (IBGE, 2008) \*.

A destinação imprópria dos resíduos sólidos acarreta impactos negativos no ambiente e nas condições sanitárias da população, comprometendo o local onde são depositados como solo, subsolo, corpos d'água e aquíferos, sem contar que sem fiscalização esses locais acabam sendo frequentados por catadores de materiais recicláveis que buscam uma fonte de renda, que, por sua vez, acabam colocando suas vidas em risco ao entrar em contato direto com estes resíduos (LIBÂNEO, 2002).

*\*Nota: O município pode apresentar mais de um tipo de unidade de destino dos resíduos sólidos domiciliares e/ou públicos e mais de uma unidade de destino do mesmo tipo, caso haja destinação também para outro município (IBGE, 2008).*

Em todo o país, aproximadamente 26,8% dos municípios que possuem serviço de manejo de resíduos sólidos, existe a presença de catadores nas unidades de disposição final de resíduos. A maior quantidade está nas regiões Centro-Oeste e Nordeste: 46% e 43%, respectivamente, destacando-se também os municípios do estado do Mato Grosso do Sul (57,7% que tem conhecimento da existência de catadores) e de Goiás (52,8%), na região Centro-Oeste, e, na região Nordeste, os municípios do estado de Pernambuco (67%), Alagoas (64%) e Ceará (60%) (IBGE, 2008).

Os aterros podem ser classificados conforme a forma de disposição do lixo (LIMA, 1995):

- aterros comuns (lixões) – o lixo é apenas descartado no solo, a céu aberto, sem qualquer tratamento. São também denominados lixões, lixeiras, vazadouros, etc. Este método de disposição é o mais prejudicial devido aos enormes problemas ambientais, sanitários e sociais, contaminando e poluindo o solo, o ar, as águas, além de atrair e proporcionar a proliferação de vetores causadores de doenças.
- aterros controlados – nestes não há a impermeabilização do solo e não é prevista a implantação de sistema de captação de gases e efluentes. O lixo depositado recebe uma cobertura diária de material inerte, o que não resolve os problemas de poluição, constituindo ainda assim risco para o ambiente, para as águas subterrâneas e para população.
- aterros sanitários – são aqueles executados segundo os critérios e normas de segurança ambiental, legislativa e técnica atendendo aos padrões de segurança pré-estabelecidos.

Os aterros controlados e os lixões possuem um potencial elevado de poluição do solo e da água, pois as chuvas que lixiviam através dos resíduos dissolvem e carregam todos os tipos de contaminantes orgânicos e inorgânicos que podem causar contaminação do lençol freático, se não forem inertizadas pelo solo através dos processos de filtração, absorção, biodegradação e precipitação química. Há muita dificuldade em quantificar a presença de metais pesados em lixões e aterros controlados devido à inexistência de controle dos materiais depositados nesses locais (AZEVEDO & DALMOLIN, 2004). Nos aterros, os

resíduos passam por processos físicos, químicos e biológicos de decomposição, gerando uma fração gasosa (composta principalmente pelos gases CO<sub>2</sub> e CH<sub>4</sub>) e uma líquida conhecida como chorume (ou percolato) (LO, 1996; CHRISTENSEN *et al.*, 2001). O chorume é um líquido viscoso, de cor escura e odor nauseante, que percola, carregado pelo excesso de água da chuva, dentre a camada de resíduos. Normalmente, apresenta elevada concentração de compostos orgânicos e inorgânicos, viscosidade, densidade e condutividade elétrica comparativamente superior a da água, grande variabilidade composicional e elevado potencial poluente (PACHECO, 2004).

Em geral, a decomposição dos resíduos dura em média 15 anos até a sua estabilização final e os seus produtos refletem diretamente na atividade microbiológica (AL-MUZAINI *et al.*, 1995). A composição do chorume varia consideravelmente dependendo dos resíduos que são depositados, de fatores climáticos e ambientais, como o regime pluviométrico, temperatura, umidade relativa e a geologia do aterro. Fatores como a idade do aterro, a constituição dos resíduos dispostos e a tecnologia de aterramento influenciam diretamente na variedade composicional deste chorume. Assim, não é possível estabelecer uma composição fixa para o chorume (PACHECO, 2004). Os micro-organismos mais comumente encontrados no chorume, além das bactérias metanogênicas e acetogênicas, são espécies patogênicas como coliformes fecais, bactérias redutoras e desnitrificantes (CHRISTENSEN *et al.*, 2001). Os parâmetros microbiológicos, normalmente utilizados para o seu descarte são os mesmos indicadores de contaminação ambiental, usados para avaliar a qualidade das águas, partindo-se do pressuposto de que há uma relação semi-qualitativa entre bactérias entéricas e a presença de micro-organismos (BASTOS *et al.*, 2000). E, mesmo após parar de receber lixo, o aterro continua a produzir chorume por cerca de 50 anos (AL-MUZAINI *et al.*, 1995). Nesse período, a ação das bactérias metanogênicas passa a ser quase exclusiva, e a população de bactérias acetogênicas cai acentuadamente (LO, 1996; PACHECO, 2004).

A presença de bactérias em regiões contaminadas com chorume é elevada se comparada a outros poluentes em geral (NASCIMENTO *et al.*, 2009). Análises microbiológicas de amostras de chorume mostram uma quantidade de coliformes

totais da ordem de  $10^4$  UFC g<sup>-1</sup> (unidades formadoras de colônia por grama de amostra).

Estudos realizados por Takayanagui (1993) revelaram patógenos em condições de viabilidade por até 21 semanas durante o processo de decomposição de material orgânico, incluído os RSS. Durante esses estudos, foi verificado o desenvolvimento de bactérias mesófilas (65.450.00 unidades em 1kg de resíduos), esporuladas (2.211.000 unidades em 1kg de resíduos), termófilas (8.427.000 unidades em 1kg de resíduos), fungos (500.000 unidades em 1kg de resíduos) e helmintos (428 ovos em 1kg de resíduos) (TONUCI, 2006).

Segundo o Ministério da Saúde (2000), a ordem crescente de resistência microbiana no ambiente é descrita da seguinte forma, ilustrado no quadro 1.

**Esporos Bacterianos**

(*Bacillus subtilis*, *Clostridium sporogenes*)

**Micobactérias**

(*Mycobacterium tuberculosis*, subsp. *bovis*)

**Vírus não lipídico**

(*Poliovirus*, *Coxsackievirus*, *Rhinovirus*)

**Fungos**

(*Trichophyton* spp., *Cryptococcus* spp., *Candida* spp.)

**Bactérias Vegetativas**

(*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella choleraesuis*)

**Vírus lipídico**

(Herpes simples, Citomegalovirus, Vírus hepatite B e HIV)

Quadro 1: Ordem crescente de resistência microbiana no ambiente (TONUCI, 2006 *apud* Ministério da Saúde, 2000).

## 4.2- Zoonoses e Saúde Pública

O significado etimológico da palavra zoonose é “doença animal” e sua definição segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) é mais abrangente: “Doenças ou infecções naturalmente transmissíveis entre animais vertebrados e destes para os seres humanos”.

Existem mais de 200 doenças transmissíveis que se enquadram na definição de zoonoses proposta pela OMS. Os agentes podem ser bactérias, fungos, protozoários, helmintos, vírus e artrópodes.

O conhecimento dos reservatórios extra-humanos desses patógenos é essencial para a compreensão da epidemiologia e controle das doenças, que possuem alta incidência em infecções em humanos, principalmente em imunocomprometidos.

As zoonoses são tipicamente endêmicas e ocorrem através de focos naturais. No entanto, mudanças no ecossistema e eventos climáticos (catástrofes) podem promover epidemias em uma determinada área geográfica. Por razões práticas, a vigilância dos agentes zoonóticos muitas vezes depende da identificação dos casos em humanos e a vigilância nos hospedeiros naturais pode ser difícil devido à complexidade ecológica destas zoonoses. Por esse motivo, equipes multidisciplinares de ambientalistas, médicos, médicos veterinários e epidemiologistas, precisam estar em constante interação, estudando surtos e epidemias. Uma tendência observada nas zoonoses, e que têm fortes relações ambientais, consiste no estudo da geografia e no ecossistema local (CHILDS *et al.*1998).

Compreender os ciclos de vida dos patógenos auxilia na prevenção de surtos das doenças zoonóticas permitindo a realização de atividades de controle destinadas à infecção humana. Esforços no controle são importantes porque a maioria das zoonoses não é passível de erradicação, exceto talvez aquelas em áreas onde os animais reservatórios são alvos de vacinação, como por exemplo, a raiva (CHILDS *et al.*1998, CDC, 2007).

Alguns desses micro-organismos causadores de doenças zoonóticas são habitantes normais do ambiente. As variedades saprófitas que habitam o solo,

água, vegetação, ou qualquer reservatório que possa fornecer substratos e nutrientes, sob condições adequadas (umidade, nutrientes, temperatura e pH ótimos), podem aumentar ou se tornarem patógenos oportunistas. Através de diversos mecanismos, esses organismos podem contaminar os animais, que por sua vez, contaminam a população (CHILDS *et al.* 1998, CDC, 2007).

Locais como lixões abrigam comunidades desses micro-organismos e os riscos oriundos da disposição inadequada dos resíduos são distintos, dos quais se pode destacar, a proliferação de vetores, disseminação de doenças, contaminação do solo, da água e do ar (LICHTVEL, *et al.*, 1990).

As vias de contaminação nos ambientes poluídos por resíduos podem ser diretas e indiretas (Figura 1). No caso da via direta é importante destacar que animais podem servir de alimento para a população sendo um fator agravante, pois estes animais mantêm contato direto com os resíduos e se alimentam destes, podendo ocorrer bioacumulação de contaminantes. A fauna e a flora aquáticas também podem acumular substâncias químicas presentes na carga do chorume ou dos resíduos industriais e de serviços de saúde lançados nos corpos d'água superficiais e no solo (LIBÂNEO, 2002).

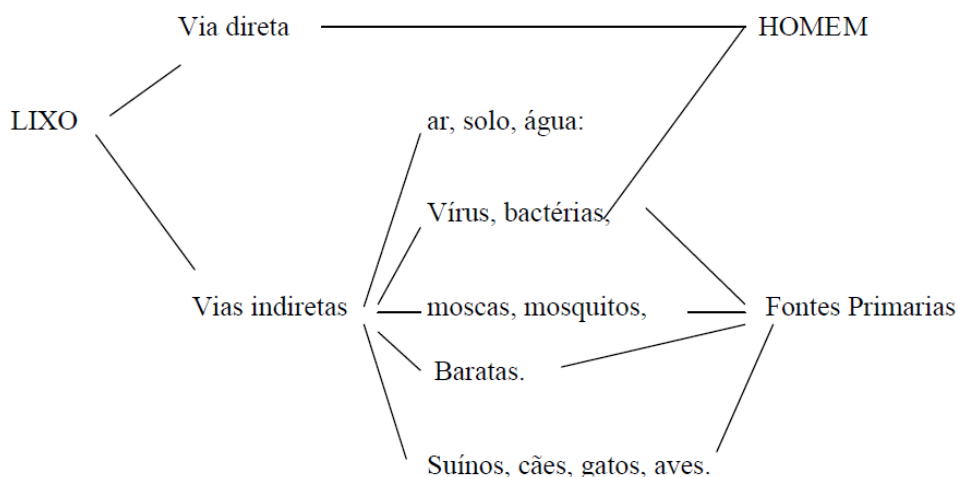


Figura 1: Diagrama das vias de acesso dos agentes patogênicos através dos resíduos sólidos. Fonte TONUCCI, 2006.

#### 4.3- Micro-organismos

#### **4.3.1- Microbiota normal do corpo humano**

Toda a variedade de micro-organismos encontrados no corpo humano em qualquer sítio anatômico é denominada microbiota normal. Algumas bactérias são tipicamente encontradas em locais anatômicos particulares enquanto outras podem estar presentes ocasionalmente ou apenas serem encontradas em determinadas fases da vida do hospedeiro (TRABULSI, 2004). Embora inúmeros micro-organismos sejam constituintes da microbiota normal do corpo humano, alguns podem causar doenças infecciosas, que podem ser adquiridas tanto no ambiente comum quanto no ambiente hospitalar. A estas doenças infecciosas adquiridas em ambientes hospitalares dá-se o nome de nosocomiais e são responsáveis por grandes índices de mortalidade e morbidade e por esse motivo tem despertado um grande interesse da área médica (PESSOA, 2011).

Apesar de o avanço tecnológico proporcionar benefícios bastante significativos para facilitar o diagnóstico e o tratamento de pacientes hospitalizados, o uso de terapia antimicrobiana de amplo espectro e novas técnicas de cateterização e outras inovações cirúrgicas representam procedimentos bastante invasivos e agressivos que acabaram se tornando uma das principais causas do aumento da incidência de infecções por micro-organismos multirresistentes (BURTON & ENGELKIRK, 2005). De acordo com SOUZA & FIGUEIREDO (2008), cerca de 70% dos isolados de *Staphylococcus aureus* de infecções nosocomiais nos principais hospitais brasileiros são resistentes à meticilina, denominados M.R.S.A.

#### **4.4- Bactérias patogênicas de interesse médico**

##### **4.4.1 *Staphylococcus***

O *Staphylococcus* (do grego “*staphyle*” = cacho de uvas, e “*cocos*” = grão) foi descrito pela primeira vez em 1880 pelo cirurgião escocês Alexandre Ogston, em pus de abscessos cirúrgicos, e atualmente é um dos micro-organismos mais comumente encontrado em infecções piogênicas em todo o mundo (PONTES, 2009).

Os *Staphylococcus* são cocos Gram positivos, oxidase negativo e catalase-positivos, com exceção das espécies *Staphylococcus aureus* subsp. *Anaerobius* e *S. saccharolyticus*, que são catalase negativos. Possuem aproximadamente 0,5 a 1,5 µm de diâmetro, são imóveis, não esporulados e geralmente não encapsulados. As células bacterianas podem apresentar-se em diversas formas, que vão desde isolados, aos pares, em pequenas cadeias, ou agrupados em forma de cachos. Esse gênero é composto por 43 espécies, sendo o *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* a espécie mais conhecida e frequentemente associada a uma variedade de infecções de caráter oportunista em seres humanos e animais. Também se destacam, patologicamente, as espécies, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus* e *S. haemolyticus* (QUINN, 2011; PESSOA, 2011).

As bactérias pertencentes ao gênero *Staphylococcus* são patógenos humanos amplamente distribuídos na natureza, cerca de 70% da microbiota normal da pele e mucosas de mamíferos e aves são compostas por *Staphylococcus* e dentre esses, a maioria são os *Staphylococcus* coagulase-negativo que possuem baixa virulência, comparados com o *S. aureus*. Eles também são encontrados nas mucosas do trato respiratório superior e inferior, do trato urogenital e como transientes no trato digestivo. Os locais de transporte dos *Staphylococcus* patogênicos são geralmente as membranas mucosas e as áreas úmidas da pele, tais como na região perineal e nas axilas. As narinas são os principais sítios de transporte de *S. aureus* em animais e humanos, e, aproximadamente, 20% das pessoas são portadores nasais permanentes deste organismo (QUINN, 2011, REDEL *et al.*, 2013).

Os *Staphylococcus* são divididos em dois grandes grupos, tendo como base sua habilidade de coagular o plasma de coelho através da produção da enzima coagulase: *Staphylococcus* coagulase positivos e *Staphylococcus* coagulase negativos. sendo esta divisão um indicador de patogenicidade (KONEMAM *et al.*, 2008, PESSOA 2011).

Entre os coagulase positivos, o *S. aureus* representa a espécie mais envolvida em infecções humanas, tanto de origem comunitária quanto hospitalar. As espécies coagulase negativas, denominadas como SCN, têm merecido

atenção especial, pois, são consideradas importantes causadoras de infecção, particularmente no ambiente hospitalar, além da emergência de cepas resistentes a múltiplos antibióticos. (PESSOA, 2011; PONTES, 2009).

#### 4.4.1.1-Staphylococcus coagulase-positivo

Existem inúmeras espécies de *Staphylococcus* coagulase positivo, dentre essas, o *S. aureus* é a espécie mais virulenta e que possui maior potencial patogênico. Entre as espécies de coagulase positivo estão *S. intermedius*, *S. pseudointermedius*, *S. hyicus*, *S. chleiferi* subsp. *Coagulans* e *S. delphini* (HOLT *et al.*, 1994).

O *S. aureus* coloniza a pele e mucosas de indivíduos saudáveis, porém em certas condições pode causar uma variedade de processos infecciosos, desde infecções cutâneas superficiais como foliculite, impetigo, furúnculos e abscesso até infecções invasivas como bacteremias, endocardite, pneumonias e meningites. Além disso, causam síndromes clínicas relacionadas à produção de toxinas, incluindo intoxicação alimentar, síndrome da pele escaldada e síndrome do choque tóxico estafilocócico (NASCIMENTO, 2009).

Este micro-organismo é frequentemente isolado em incisões cirúrgicas, as quais podem funcionar como foco para o desenvolvimento de infecções sistêmicas. A ocorrência de endocardites, osteomielites, meningite e formação de abscessos metastáticos em vários órgãos, após bacteremia por *S. aureus* é comumente relatado, muitas infecções causadas por esta bactéria ocorrem como complicações de procedimentos invasivos (KONEMAN *et al.*, 2008; LANCELOTTI, 2006).

O *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) é uma importante causa mundial de infecções nosocomiais desde que foi descrita pela primeira vez há cinco décadas após a introdução das penicilinas e dos  $\beta$ -lactâmicos na prática clínica. Durante este período surgiram variantes das cepas de MRSA que adquiriram o cassete cromossômico *mec* (SCC*mec*) que carrega o elemento *mecA* que é o determinante da resistência à meticilina. A grande maioria dos isolados de MRSA, em todo o mundo pertence a um número limitado de clones, alguns dos quais estão associados epidemias globais (HOLDEN *et al.*, 2013; TRABULSI, 2004).

Nos últimos 40 anos, as infecções por MRSA vêm tornando-se endêmicas na maioria dos hospitais dos EUA e de todo o mundo, acometendo, com raras

exceções, os pacientes com fatores de risco. No entanto, mais recentemente, as infecções por MRSA também foram descritas em pacientes sem fatores de risco estabelecidos e que foram adquiridas na comunidade, ou seja, fora das dependências hospitalares, sendo estas infecções denominadas como adquiridas na comunidade (HOLDEN *et al.*, 2013; SOUZA & FIGUEIREDO, 2008).

#### **4.4.1.2- *Staphylococcus coagulase-negativo***

Os *Staphylococcus coagulase-negativos* (SCN) foram considerados durante muito tempo micro-organismos comensais e não patogênicos e sua patogenicidade só foi reconhecida e compreendida há algumas décadas atrás. O aumento da incidência de infecções causadas por estas bactérias pode ser atribuído à sua afinidade particular para os materiais sintéticos que são utilizados na medicina atual (NASCIMENTO, 2009, PONTES, 2009).

A utilização crescente de dispositivos protéticos, cateteres intravenosos e outras tecnologias invasivas em pacientes graves e imunossuprimidos tornou os *Staphylococcus coagulase-negativos* importantes patógenos de origem nosocomial, elevando consideravelmente a taxa de morbidade e as complicações médicas. Entre as espécies de SCN, as que têm sido mais isoladas de infecções humanas, especialmente de bacteremias e infecções relacionadas a dispositivos médicos, são *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. saprophyticus*, *S. warneri*, *S. lentus* e *S. simulans* (NASCIMENTO, 2009).

Os *Staphylococcus coagulase-negativos* vêm adquirindo resistência a diversos antibióticos, já sendo descritas cepas resistentes à vancomicina. Até 1975, os *Staphylococcus coagulase-negativo* eram agrupados como *Staphylococcus albus* ou *S. epidermidis*, distinguido do *S. aureus* pela sua incapacidade de coagular o plasma sanguíneo. Baseado nesta característica e na sua pouca virulência os SCN foram muitas vezes referidos como *Staphylococcus* apatogênicos (NASCIMENTO, 2009 e EIFF *et al.*, 2001). Atualmente existem, classificadas, 32 espécies de estafilococos coagulase-negativos, onde cerca de 20 espécies são encontrados em seres humanos, enquanto que os restantes são agentes patogênicos não humanos. Há poucas décadas atrás, a importância de

*Staphylococcus* coagulase-negativo como agente patogênico humano (predominantemente nosocomial) tem sido reconhecida. No período de 1990 a 1995, o programa *National Nosocomial Infection Surveillance* (NNIS) informou que *Staphylococcus* coagulase-negativo forao agente causador de 11% de todas infecções nosocomiais, tornando-o o terceiro micro-organismo causador de infecção nosocomial mais isolado equiparando-se ao *S. aureus* (EIFF *et al.*, 2001).

#### 4.4.2- Enterobactérias

As bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae* são bastonetes Gram-negativos de até 3 mm de comprimento, fermentam a glicose entre outros açúcares, são oxidase negativa e catalase positiva, anaeróbios facultativos e não-formadoras de esporos, crescem bem em agar MacConkey, pois não são inibidos pelos sais biliares presentes no meio. A família contém mais de 40 gêneros e mais de 180 espécies. Constituem os principais componentes da flora intestinal humana normal, sendo relativamente incomum em outros locais do organismo (QUINN, 2011; PESSOA 2011; MURRAY *et al.* 2000).

As enterobactérias podem ser agrupadas em três categorias: agentes patogênicos, patógenos oportunistas e agentes não patogênicos. Aqueles que não têm importância patogênica para animais e humanos, tais como *Hafnia* e *Erwinia* podem ser isolados de fezes, do ambiente e podem contaminar amostras clínicas. Patógenos oportunistas são aqueles que podem causar, ocasionalmente, doença clínica em diferentes locais. Os principais agentes patogênicos, são responsáveis por doenças entéricas e sistêmicas e até infecções hospitalares, são *E. coli*, *Klebsiella* sp., *Proteus* sp., *Enterobacter* sp. e *Serratia marcescens*, representam 80% de todos os bastonetes Gram-negativos e 50% de todas as bacteremias observadas clinicamente (QUINN, 2011; PESSOA 2009; MURRAY *et al.* 2000) (Quadro 2).

| Principais patógenos entéricos e sistêmicos |
|---------------------------------------------|
| <i>Escherichia coli</i>                     |

|                                                                                                      |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Salmonella serotypes</i><br><i>Yersinia</i> sp.                                                   |
| <b>Principais patógenos oportunistas</b>                                                             |
| <i>Proteus</i> sp.<br><i>Enterobacter</i> sp.<br><i>Klebsiella</i> sp.<br><i>Serratia marcescens</i> |

Quadro 2: Principais patógenos entéricos e sistêmicos e principais patógenos oportunistas. Fonte: QUINN, 2011.

#### 4.4.2.1 Principais gêneros da família *Enterobacteriaceae*

##### ***Citrobacter* spp.**

O gênero *Citrobacter* compreende as espécies *C. freundii*, *C. diversus* e *C. amalonaticus*.

São bastonetes, que ocorrem isoladamente ou aos pares, com aproximadamente 1,0 µm de diâmetro e 2,0-6,0 µm de comprimento, não possuem cápsula e são móveis por flagelos peritríqueos. São anaeróbios facultativos, com metabolismo respiratório e fermentativo, fermentam glicose com produção de ácido e gás. No teste de Vermelho de Metila (VM) são positivos e no de Voges-Proskauer (VP) são negativos. A maioria das amostras de *Citrobacter freundii* produz H<sub>2</sub>S (TRABULSI, 2004; HOLT *et al.*, 1994).

Ocorrem nas fezes de humanos e animais, provavelmente como habitantes anormais. Frequentemente isolado de espécimes clínicas como patógenos oportunistas. *Citrobacter diversus* pode causar meningite neonatal, sendo encontrado no solo, água, esgoto e alimentos (HOLT *et al.*, 1994).

##### ***Edwardsiella* spp.**

São bastonetes pequenos, medindo em média 1µm de diâmetro. Geralmente são móveis por flagelos peritríquios. Apresentam temperatura ótima de crescimento de 37°C, exceto *E. ictaluri*, que tem preferência por temperaturas mais baixas. Ocorrem mais frequentemente no intestino de animais de sangue frio como peixes e répteis e no ambiente onde eles habitam, particularmente em

águas doces, mas também podem ocorrer em animais de sangue quente e raramente é patogênico para seres humanos (HOLT *et al.*,1994).

Desde 2001, a espécie *Edwardsiella tarda* vem chamando atenção para enfermidades transmitidas através da ingestão de alimentos (DOYLE, 2001).

### ***Enterobacter* spp.**

O gênero *Enterobacter* é composto por várias espécies, e aquelas que possuem maior importância com relação à saúde pública são *E. cloacae*, *E. sakazakii*, *E. aerogenes* e *E. gergoviae* que são patógenos oportunistas em feridas, queimaduras, infecções do trato urinário e causam, ocasionalmente, septicemias e meningite (HOLT *et al.*,1994).

*Enterobacter* spp. são bastonetes com dimensões entre 06-1,0 µm x 1,2-3,0 µm, móveis por flagelos peritríquios, anaeróbios facultativos, fermentam glicose com produção de ácido e gás. Os sorotipos possuem em sua maioria reação positiva no teste Voges Proskauer e Citrato de Simmons, sendo negativos no teste Vermelho de Metila e lisina positiva, com exceção de *Enterobacter gergoviae* (HOLT *et al.*,1994). São espécies amplamente distribuídas na natureza, ocorrendo em água doce, solo, esgoto, plantas, vegetais, animais e fezes de seres humanos.

### ***Escherichia* spp.**

O gênero *Escherichia* compreende as espécies *Escherichia coli*, *E. blattae*, *E. fergusonii*, *E. hermannii* e *E. vulneris*. A *E. coli* a espécie de maior importância prática (TRABULSI, 2004).

São bastonetes, podendo ocorrer de forma isolada ou aos pares, apresentam 1,1-1,5 µm x 2,0-6,0 µm. São anaeróbios facultativos, sendo na sua maioria móveis por flagelos peritríquios. Muitas cepas possuem cápsulas ou microcápsulas (HOLT *et al.*,1994).

*E. coli* é um bacilo Gram-negativo, anaeróbio facultativo, possuindo exigências nutricionais simples. É encontrado no solo, na água e na microbiota de quase todos os animais de sangue quente, incluindo os seres humanos (DEPIZZOL, 2006).

A colonização do trato intestinal dos mamíferos por *E. coli* ocorre logo após o nascimento a partir de fontes ambientais, sendo esse micro-organismo um dos principais constituintes da flora intestinal. A maioria das cepas de *E. coli* são consideradas comensais têm de baixa virulência, mas pode causar infecções oportunistas em locais extra-intestinais tais como no trato urinário. As cepas de *E. coli* que produzem doença extra-intestinal frequentemente colonizam o trato intestinal de pessoas e animais hígidos. Cepas que causam enterocolite normalmente não fazem parte dessa flora normal e causam infecção através do contato direto com animais clinicamente ou subcl clinicamente infectados, ou através da ingestão de alimentos e/ou água contaminada. Estirpes patogênicas de *E. coli* possuem fatores de virulência, que permitem colonizar as superfícies de mucosas e com isso causar doença (DEPIZZOL, 2006).

Os fatores que predispõem ao desenvolvimento da doença clínica incluem a idade, estado imunológico, natureza da dieta e forte exposição. As cepas patogênicas têm sido isoladas de diversos sítios do corpo humano, podendo causar pneumonias, meningites e infecções intestinais. Como parte da microbiota humana, esses micro-organismos 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 graves em todos os grupos etários (QUINN, 2011; MERCK, 2010; DOYLE, 2001).

*E. coli* é também a maior causa de infecções urinárias e nosocomiais incluindo septicemia e meningite. Outras espécies, exceto *E. blattae*, são raramente identificadas como patógenos oportunistas, usualmente associados com infecções em feridas (HOLT *et al.*, 1994).

### ***Hafnia* spp.**

São microrganismos com aproximadamente 1,0 µm de diâmetro e 2,0-5,0 µm de comprimento. São móveis por flagelos peritríqueos, mas algumas cepas podem ser imóveis, são quimiorganotróficos. A maioria das estirpes utiliza citrato, acetato e malonato como única fonte de carbono. Fermentam a glicose

produzindo ácido e gás, reduzem nitrato em nitrito. É positivo no teste de vermelho de metila (HOLT *et al.*, 1994).

Ocorrem nas fezes de humanos e animais, incluindo pássaros, água de esgoto, solo, água doce e produtos de origem animal. São patógenos oportunistas para o homem e podem estar presentes no sangue, urina ou feridas infeccionadas em pacientes com estado de saúde debilitado ou imunodeprimidos (JANDA & ABBOTT, 2006: HOLT *et al.*, 1994).

### ***Klebsiella* spp.**

Este gênero compreende as espécies *Klebsiella pneumoniae*, *K. pneumoniae* subespécie *pneumoniae*, *K. oxytoca*, *K. terrigena*, dentre outras.

São bastonetes curtos medindo 0,3 µm de diâmetro e 0,6-6,0 µm de comprimento, podem apresentar-se sozinhos ou aos pares. São anaeróbios facultativos, fermentam a glicose com produção de ácido e gás, positivos no teste Voges Proskauer, hidrolisam a uréia e produzem ornitina descaborexilase (HOLT *et al.*, 1994).

Este gênero compreende as espécies *Klebsiella pneumoniae*, *K. pneumoniae* subespécie *pneumoniae*, *K. oxytoca*, *K. terrigena*, dentre outras.

São bastonetes curtos medindo 0,3 µm de diâmetro e 0,6-6,0 µm de comprimento e podem apresentar-se sozinhos ou aos pares. São anaeróbios facultativos, fermentam glicose com produção de ácido e gás, positivos no teste Voges Proskauer, hidrolisam a uréia e produzem ornitina descarboxilase (HOLT *et al.*, 1994).

*Klebsiella pneumoniae* é normalmente encontrada no trato intestinal dos seres humanos e de animais, porém em menor número que *E. coli*. *Klebsiella oxytoca* também faz parte do trato intestinal dos seres humanos e animais, podendo ser isolada de vários processos patológicos e também em ambientes aquáticos e com plantas. São patógenos oportunistas que podem causar bacteremia, pneumonia, infecções do trato urinário e outras infecções ao homem. Frequentemente causam infecções nosocomiais urológicas em neonatais, pacientes geriátricos e em tratamento intensivo (HOLT *et al.*, 1994).

A importância da *Klebsiella* spp. como agente patogênico vem crescendo nos últimos anos equiparando-se a *E. coli* no que se refere à saúde coletiva (MENEZES *et al.*, 2008; PETERSON, 2006).

### ***Morganella* spp.**

São bastonetes retos, medindo 0,6-0,7 µm de diâmetro e 1,0-1,7 µm de comprimento. São anaeróbios facultativos, móveis por flagelos peritríqueos, positivos para o teste do indol e vermelho de metila e não produzem H<sub>2</sub>S (HOLT *et al.*, 1994). Ocorrem em fezes de humanos, cães, outros mamíferos e répteis. São micro-organismos oportunistas, isolados de bacteremias, do trato respiratório, feridas e infecções do trato urinário. Produzem urease e fenilalanina desaminase e fermentam glicose e manose com produção de ácido (HOLT, *et al.*, 1994).

### ***Proteus* spp.**

O gênero *Proteus* inclui as espécies *P. mirabilis*, *P. myxofaciens*, *P. penneri* e *P. vulgaris* (HOLT *et al.*, 1994). São bastonetes curtos, com 0,4-0,8 µm de diâmetro e 1,0-3,0 µm de comprimento. São móveis por flagelos peritríqueos, anaeróbios facultativos, são lactose e lisina descarboxilase negativas e hidrolisam a ureia, exceto o *P. penneri* que pode ou não hidrolisar. Entre as espécies ocorrem variações nos testes de indol, Voges-Proskauer e Citrato de Simmons e produção de H<sub>2</sub>S (HOLT *et al.*, 1994).

Ocorrem no intestino dos seres humanos e em um grande número de animais, no solo, em águas poluídas com dejetos e resíduos. Há relatos do isolamento de *P. myxofaciens* em larvas de insetos. São patógenos de humanos causando infecções no trato urinário, em lesões e frequentemente causam septicemias em pacientes queimados (HOLT *et al.*, 1994).

### ***Providencia* spp.**

Esse gênero possui cinco espécies: *P. alcalifaciens*, *P. heimbachae*, *P. rettgeri*, *P. rustigianii* e *P. stuartii*. Podem ser isolados de casos de diarreias em

seres humanos, infecções do trato urinário, feridas, queimaduras e bacteremias e, também já foram isolados de pinguins, sendo, portanto, patogênicos para os seres humanos (HOLT *et al.*, 1994).

### ***Salmonella* spp.**

As espécies de *Salmonella* spp. são agentes frequentes de surtos de enfermidades transmitidas por alimentos. Por serem micro-organismos entéricos, podem estar presentes no intestino de animais de sangue quente e, mais raramente, também nos de sangue frio (FRANCO & LANDGRAF, 2008). Resistem bem às temperaturas de refrigeração, no entanto, o congelamento provoca uma redução significativa de sua população, mas nunca sua destruição completa.

Em função de sua capacidade de disseminação no meio ambiente, podem ser isoladas de diversos locais como: águas doces superficiais, costa marítima, carnes de animais, pescados, verduras, ovos, etc. e, conseqüentemente, de diversas matérias primas alimentares. Podem ainda ser veiculadas pelo próprio ser humano, neste caso na condição de portador assintomático. Salmonelas são causa de febre tifóide, infecções entéricas, gastroenterites e septicemias (HOLT *et al.*, 1994).

O gênero *Salmonella* está agrupado em apenas duas espécies, *S. enterica* e a *S. bongori* que são divididos em cinco subespécies sendo mais de 2000 sorovares no total e a maioria classificada como *S. enterica* (HOLT *et al.*, 1994).

Apresenta-se como bastonetes curtos Gram-negativos não formadores de esporos e são fermentadores de glicose, produzindo ácido e gás. Somente duas espécies são móveis, com flagelos peritríquios, são anaeróbios facultativos. Geralmente, formam colônias com 2-4 mm de diâmetro (QUINN, 2011).

Crescem em temperaturas de 5 a 47°C (ótima: 37°C), e em pH maior que 4,9 (*Salmonella* Typhi e *Salmonella* Paratyphi) ou maior que 4,0 (outras espécies), são urease negativo, Citrato de Simmons positivo e lisina descarboxilase positiva (QUINN, 2011).

### ***Serratia* spp.**

O gênero *Serratia* compreende inúmeras espécies, sendo a espécie *Serratia marcescens* o patógeno mais importante.

São bastonetes com 0,5-0,8µm de diâmetro, anaeróbios facultativos, usualmente são móveis por flagelos peritríqueos. A maioria das espécies é lisina e ornitina descarboxilase positiva, não produz H<sub>2</sub>S, não hidrolisa a uréia, é DNase positivo e Citrato de Simmons positivo.

Ocorrem em espécimes clínicas do ser humano, solo, água, superfícies de plantas e outros ambientes, trato digestivo de ratos e insetos. *S. marcescens* é um proeminente patógeno oportunista hospitalar, causa septicemia e doenças do trato urinário. Várias outras espécies podem estar envolvidas em bacteremias e podem ser isoladas de escarros sem significado clínico. Causam ainda mastite em vacas e outras infecções animais (HOLT *et al.*, 1994).

### ***Shigella* spp.**

O gênero é composto pelas seguintes espécies: *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii* e *S. sonnei*. São bastonetes curtos, imóveis e anaeróbios facultativos. Produzem indol, são negativos nos testes de Voges-Proskauer e Citrato de Simmons e positivos no teste de Vermelho de Metila (HOLT *et al.*, 1994). São patógenos intestinais do homem e de outros primatas e causa de disenteria bacilar (HOLT *et al.*, 1994).

### ***Yersinia* spp.**

Existem mais de 10 espécies de *Yersinia*, mas apenas *Y. pestis*, *Y. enterocolitica* e *Y. pseudotuberculosis* são patogênicos para animais e seres humanos. Espécies de *Yersinia* são não-fermentadores de lactose e o seu crescimento tende a ser menos rápido do que os outros membros da família *Enterobacteriaceae*.

A espécie *Yersinia pseudotuberculosis* é patogênica para muitos animais, causando adenite mesentérica, diarreia crônica e septicemias (QUINN, 2011).

A *Y. enterocolitica* não faz parte da flora normal humana, mas tem sido frequentemente isolada de fezes, feridas, escarro e linfonodos mesentéricos de seres humanos, causando infecções similares aos animais e ao homem. Sua

presença associada a alimentos e água contaminados representa um risco potencial para a saúde pública. (HOLT *et al.*, 1994).

A manifestação clínica da infecção é distinta nas diferentes faixas etárias, predominando a enterocolite com diarreia (MURRAY *et al.*, 2000).

Ambas espécies são encontradas em animais como porcos, pássaros, esquilos, gatos e cachorros. Somente a *Y. enterocolitica* foi detectada no meio ambiente (lagos, tanques) e alimentos (carnes, sorvetes e leite) (JAY, 1992).

#### 4.4.3- Bastonetes Gram negativos não fermentadores

Os BGNNF são bastonetes ou cocobacilos Gram negativos não fermentadores de glicose, sendo a glicose utilizada somente através da via oxidativa, são bactérias aeróbias, não esporuladas. São micro-organismos oportunistas de vegetais e animais e possuem mínimas exigências nutricionais, além de serem termotolerantes. Os BGNNF de maior interesse clínico são *Acinetobacter* spp., *Alcaligenes* spp., *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas* spp., *Stenotrophomonas* spp., *Moraxella* spp., entre outras (VILELA, 2009, KONEMAN *et al.*, 2008).

Dentre os Gram negativos não fermentadores, o gênero *Pseudomonas* é o mais frequente causador de infecções. As bactérias do grupo são patógenos de plantas e somente algumas espécies estão associadas a doenças nos seres humanos e animais. A *Pseudomonas* é considerada um micro-organismo oportunista e geralmente é causadora de infecções em pacientes internados, principalmente em Unidades de Terapia Intensiva, tem a capacidade de formar biofilmes, o que contribui para sua sobrevivência e replicação em tecidos humanos, dispositivos médicos e no ambiente. As manifestações clínicas mais prevalentes são pneumonias, infecções associadas a cateteres, infecções do trato urinário entre outras. A caracterização desse grupo de bactérias é de grande importância nos casos de infecção hospitalar, pois apresentam elevada resistência a vários antibióticos (VILELA, 2009, KONEMAN *et al.*, 2008).

#### 4.5- Resistência Bacteriana

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 depois, 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 e em 1950, atingia 50% e, em 1959, era cerca de 80% nos hospitais americanos (BAUER *et al.*, 1960, SOUZA *et al.*,

2005). Outros antibióticos foram 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.

A emergência de germes multirresistentes é consequência natural da pressão seletiva resultante do uso abusivo dos antimicrobianos, sendo um problema cada vez mais preocupante (FUCHS, 2004). Um micro-organismo é considerado resistente a um determinado antimicrobiano quando a concentração inibitória mínima (MIC) definida *in vitro* não pode ser obtida no plasma do paciente (JACOBY, 2008; FUCHS, 2004; TAVARES, 2002).

As bactérias têm apresentado significativa resistência aos antimicrobianos de primeira escolha e aos de amplo espectro como nos casos, *Klebsiella* spp., *Escherichia coli* e *Enterobacter* spp. produtores de beta-lactamase de espectro estendido (ESBL) ou que apresentam resistência às cefalosporinas de terceira geração, *Staphylococcus aureus* metilina resistente (MRSA), *Enterococcus* spp. resistentes à vancomicina, *Acinetobacter* spp. sensível somente aos carbapenêmicos, *Pseudomonas* spp. resistentes à aminoglicosídeos, carbapenêmicos e/ou cefalosporinas (CLSI, 2011; CONLY, 2002; HARBARTH *et al.*, 2001).

Muitos mecanismos de resistência bacteriana têm sido descritos na literatura (Quadro 2). 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) 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; KAYE *et al.*, 2004; MUTO *et al.*, 2003, VERONESI, 1991).

A resistência fisiológica ocorre em condições especiais de crescimento bacteriano, como os biofilmes, onde ocorre adesão das bactérias nas superfícies, dificultando a penetração dos antimicrobianos e originando um ambiente propício para que ocorram trocas genéticas entre os micro-organismos (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 (TENOVER, 2006; FUCHS, 2004; SHLAES *et al.*, 1997;). Os mecanismos de resistência adquirida são variados e incluem alterações nos receptores dos fármacos, da permeabilidade da membrana celular, eliminação do fármaco por bomba de efluxo e inativação de fármacos (LIM & WEBB, 2005; CRAIG, 2004). As bombas de efluxo possuem um papel crucial na eliminação de substâncias nocivas que penetram na célula bacteriana, contribuindo para a sobrevivência dos micro-organismos em locais contaminados tornando-os adaptados e resistentes a diversos produtos químicos e antimicrobianos (KAYE *et al.*, 2004). Estes mecanismos geralmente agem sinergicamente para produzir um fenótipo resistente quando somente um mecanismo simples não seria suficiente. Além disso, a 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; KAYE *et al.*, 2004, VERONESI, 1991).

| <b>Antibióticos</b>                                                                                                         | <b>Mecanismo de resistência envolvido</b> |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|
| Betalactâmicos: penicilinas, cefalosporinas, carbapênicos<br>Aminoglicosídeos<br>Cloranfenicol                              | Inativação enzimática                     |
| Betalactâmicos (proteínas ligadoras de penicilinas)<br>Aminoglicosídeos (proteínas ribossômicas)<br>Quinolonas (DNA girase) | Alteração do sítio de ação                |

|                                                                   |                              |
|-------------------------------------------------------------------|------------------------------|
| Macrolídeos (RNA ribossômico)                                     |                              |
| Aminoglicosídeos<br>Quinolonas<br>Betalactâmicos<br>Cloranfenicol | Diminuição da permeabilidade |
| Quinolonas<br>Tetraciclínas                                       | Promoção de efluxo           |

Quadro 3: Classe dos antibióticos e os diversos mecanismos de resistência envolvidos.

#### 4.5.5.1- Mecanismo de resistência do *Staphylococcus spp.*

A resistência dos *S. aureus* aos antimicrobianos pode ser codificada cromossomicamente ou mediada por plasmídeos.

A maioria dos estafilococos contém um determinado número de plasmídeos, alguns dos quais podem ser transferidos por conjugação entre espécies diferentes (por exemplo, um SCN com outro ou com um *S. aureus*). Este é um importante mecanismo para a transferência de genes de resistência a antibióticos, especialmente para aminoglicosídeos e beta-lactâmicos (HOLDEN *et al.*, 2013; SOUZA *et al.*, 2005).

*Staphylococcus aureus* possui três mecanismos distintos de resistência à meticilina: a) hiperprodução de betalactamases; b) presença de uma proteína ligadora de penicilina (PBP *protein binding penicilin*) alterada denominada PBP 2a; c) modificações na capacidade de ligação das PBPs. Três mecanismos podem estar presentes numa mesma amostra, inclusive interagindo entre si (HOLDEN *et al.*, 2013; SOUZA *et al.*, 2005).

*Staphylococcus aureus* possui cinco PBPs. As PBPs são enzimas que catalisam a etapa terminal da síntese da parede bacteriana e se localizam na membrana celular da bactéria. As PBP 1, 2 e 3 são essenciais e têm alta afinidade (sítios-alvo) com os antibióticos beta-lactâmicos, unindo-se a esses por ligações covalentes. A resistência à meticilina em estafilococos é devida à produção de uma PBP adicional, anômala, denominada PBP 2a, que apresenta baixa afinidade com os antibióticos beta-lactâmicos. Esta proteína alterada é

codificada por um gene cromossômico denominado *mecA*, que é responsável pela resistência intrínseca dos estafilococos meticilina resistentes (MRSA) a todos os antibióticos beta-lactâmicos (MUTO *et al.*, 2003; CHAMBERS, 1997).

A frequência de *S. aureus* resistente à oxacilina (meticilina) varia conforme a região ou o hospital analisado. Na cidade do Rio de Janeiro (Brasil), no ano de 1998, a resistência à oxacilina foi de 27% entre amostras de *S. aureus* isoladas em um hospital (sem serviço de emergência), enquanto em outro hospital (com serviço de emergência) atingiu 58% (SOUZA *et al.*, 2005). Desde a década de 1970, os MRSA tornaram-se a principal causa de infecções hospitalares no mundo. A vancomicina era o único antibiótico efetivo contra os mesmos, mas, nos últimos anos já foram descritos *Staphylococcus aureus* com resistência à vancomicina e à teicoplanina. Tais estafilococos receberam a sigla VISA (*Staphylococcus aureus* com resistência intermediária à vancomicina) e atualmente são denominados simplesmente de VRSA (*vancomycin resistant Staphylococcus aureus*). Seu mecanismo de resistência está associado a uma ativação da síntese da parede celular. Em virtude da produção elevada de componentes da parede celular (resíduos de mucopeptídeo) que reduzem a quantidade de antibiótico que chega ao seu local de ação (membrana citoplasmática), ocorre hiperprodução das proteínas ligadoras de penicilinas PBP2 e PBP2', espessamento da parede celular e aprisionamento dos farmacos (HOLDEN *et al.*, 2013; SOUZA *et al.*, 2005, VERONESI, 1991).

Já foram descritas cepas de *Staphylococcus* com resistência aos glicopeptídeos no Brasil. Registrou-se o isolamento de *Staphylococcus aureus* com resistência intermediária à vancomicina no Rio de Janeiro, em São Paulo e Porto Alegre e de estafilococos coagulase negativos resistentes à vancomicina e à teicoplanina em São Paulo (SOUZA *et al.*, 2005).

#### **4.5.5.2- Mecanismo de resistência das bactérias Gram-negativas**

As bactérias Gram-negativas possuem duas membranas externas e uma interna que é a membrana citoplasmática. A membrana externa das bactérias Gram-negativas evita que certos fármacos e antibióticos penetrem na célula, o que explica parcialmente a razão porque 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 hipotensão arterial. Por essa razão os lipopolissacarídeos são conhecidos frequentemente pelo nome de endotoxinas (MERCK, 2010, PESSOA, 2009).

A produção de betalactamases representa um importante mecanismo de resistência aos betalactâmicos. Estas são enzimas bacterianas que catalisam a hidrólise do anel betalactâmico, impossibilitando assim a sua atividade antimicrobiana. A resistência ao antimicrobiano betalactâmico irá depender da quantidade de enzima produzida, da habilidade dessa enzima em hidrolisar o antimicrobiano em questão e da velocidade com que o betalactâmico penetra na membrana externa (VERONESI, 1991).

As betalactamases nas bactérias Gram-negativas permanecem no espaço periplasmático, entre a membrana citoplasmática e a membrana externa, desta maneira, as enzimas se acumulam nesta região e os betalactâmicos devem atravessar este espaço para atingir seus receptores na membrana interna (VERONESI, 1991).

Os genes responsáveis pela produção das betalactamases podem estar localizados nos cromossomos, transpossomos ou plasmídeos. As enzimas produzidas nos transpossomos e plasmídeos podem ser transferidas horizontalmente entre diferentes espécies bacterianas, enquanto que as enzimas cromossômicas são transmitidas verticalmente. Por isso as betalactamases mediadas por plasmídeos e transposons representam um problema clínico maior, pois uma vez adquirido esse mecanismo de resistência, este pode sofrer disseminação tanto para amostras de uma mesma espécie, quanto para amostras de espécies diferentes. De acordo com VERONESI (1991), esse mecanismo de resistência é considerado um dos mais importantes entre as bactérias Gram-negativas, já sendo descritas mais de 340 betalactamases diferentes.

#### **4.6- Fatores de risco para emergência de resistência bacteriana aos antimicrobianos**

Múltiplos fatores de risco têm sido associados com a emergência e disseminação de germes multirresistentes em hospitais e na comunidade. Organismos resistentes podem ser introduzidos em uma população por transferência de pacientes de outras unidades de atendimento médico, levados do ambiente hospitalar para a comunidade e atualmente já se sabe que bactérias podem adquirir resistência na própria comunidade e podendo ser levadas para o ambiente hospitalar por parentes de pacientes internados e até pela equipe de assistência à saúde (médicos, enfermeiros, técnicos de enfermagem, entre outros profissionais da saúde). Cepas previamente sensíveis podem sofrer mutação espontânea em reservatórios com alta quantidade de micro-organismos, ou podem adquirir resistência através de transferência de material genético. A exposição a antimicrobianos exerce pressão seletiva sobre essas populações de micro-organismos e é fator decisivo para o crescimento das taxas de resistência (FRIDKIN *et al.*, 2002; SHLAES *et al.*, 1997; GOLDMANN & HUSKINS, 1997).

Padrões de prescrição de antimicrobianos têm sido associados à emergência de resistência. Entre eles citam-se prescrição excessiva sem evidências clínicas ou microbiológicas consistentes, uso de antimicrobianos de amplo espectro como profilaxia e tratamento empírico de infecções, prescrição de antibiótico profilático por tempo muito prolongado antes ou após cirurgia, associações de antimicrobianos incorretas ou desnecessárias, desconsideração de exames microbiológicos, tratamento de colonizações interpretadas como infecção, doses e duração de tratamentos inadequados (CDC, 2007; PATRICK *et al.*, 2004; MURTHY, 2001; SHLAES, 1997). Avanços no tratamento de câncer, transplantes e a própria AIDS têm gerado maior número de pacientes imunossuprimidos que requerem tratamento empírico e contribuem para pressão seletiva dos antimicrobianos (CDC, 2007; MURTHY, 2001; SHLAES, *et al.*, 1997; GOLDMANN & HUSKINS, 1997).

## **5- Materiais e Métodos**

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos dos Institutos Superiores de Ensino do Centro Educacional Nossa Senhora Auxiliadora (CEP/ISECENSA) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (CEUA/UENF) e aprovado institucionalmente entre os laboratórios envolvidos.

### 5.1-Local de Estudo

O Aterro Controlado CODIN está situado na cidade de Campos dos Goytacazes, Região Norte do Estado do Rio de Janeiro, no Distrito Industrial da CONDIN, Rua Santo Amaro, sem número, Bairro CODIN, próximo à estrada de acesso à localidade de Brejo Grande, distando 3,1 km em relação a BR-101. O aterro está situado em um bairro industrial, onde existem casas, postos de saúde e uma escola municipal (Figura 2 e 3). Nas adjacências do Aterro existe uma Unidade de Tratamento de Resíduos de Serviços de Saúde e dentro da área deste aterro existe uma lagoa. Foi possível observar que além da presença de catadores de materiais recicláveis, ainda existiam animais se alimentando do lixo e da vegetação, além da presença de vetores e uma lagoa.

Segundo o responsável técnico da empresa gestora, o local onde se localiza o Aterro CODIN começou a ser usado como lixão em 1994, até que no ano de 2004 foi transformado em aterro controlado pela empresa Vital Engenharia Ambiental S/A. O aterro recebe uma média de 260 toneladas de resíduos por dia.



Figura 2: Localização espacial do aterro controlado da CODIN – delimitado em vermelho, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro. Fonte: GOOGLE MAPS, 2012.

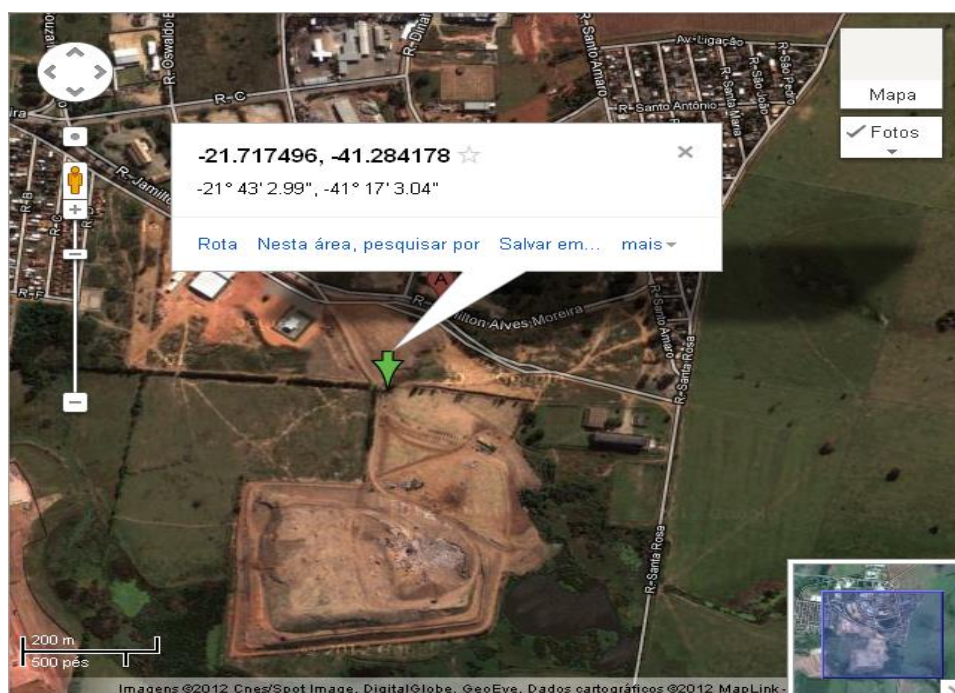


Figura 3: Coordenadas espaciais (Longitude e Latitude) do Aterro Controlado da CODIN. Fonte: GOOGLE MAPS, 2012.

O bairro vizinho ao aterro possui esgoto e água encanada, porém as casas mais humildes não têm acesso a esses serviços e utilizam água proveniente de poços superficiais, que são rasos e passíveis de contaminação pelo chorume lixiviado. Quanto aos resíduos líquidos, estes são eliminados em fossas sépticas construídas sem nenhum acompanhamento técnico, contribuindo para o aumento do índice de contaminação do lençol freático.

As figuras a seguir são fotografias obtidas no local objeto deste trabalho e formam o acervo de arquivos pessoais.



Figura 4: Visão panorâmica do aterro controlado de Campos dos Goytacazes-RJ, com a presença de animais domésticos se alimentando no local.



Figura 5: Presença de animais de estimação se alimentando na área do aterro controlado de Campos dos Goytacazes-RJ e ao fundo, a lagoa que serve de fonte de água para estes animais.



Figura 6: Chorume acumulado, de coloração amarronzada e proveniente do aterro controlado de Campos dos Goytacazes-RJ.



Figura 7: Deposição de lixo e presença de urubus que funcionam como vetores, e ao fundo a lagoa.

O contato com os catadores de materiais recicláveis foi estabelecido através de representantes da associação de moradores, técnicos e assistentes sociais responsáveis pela empresa gestora do aterro controlado da CODIN.

A coleta do chorume foi realizada através de data previamente agendada com o engenheiro responsável e técnico da empresa Vital Engenharia Ambiental S/A, que faz parte do grupo Queiroz Galvão.

As amostras de animais foram coletadas por médicos veterinários, sendo os proprietários devidamente esclarecidos sobre os procedimentos e os animais passaram por avaliação clínica.

As amostras de humanos foram coletadas por profissional da área da saúde humana, devidamente habilitado. Os voluntários foram esclarecidos sobre os procedimentos através de uma palestra informativa onde foram abordados temas relacionados ao descarte correto dos resíduos, saneamento básico, saúde, higiene, uso de EPIs, contaminação ambiental, lençol freático e zoonoses.

## 5.2- Amostras do Chorume

Foram realizadas quatro coletas, uma em cada estação do ano, a fim de estimar os efeitos das diferentes épocas do ano na presença e concentração das diferentes espécies bacterianas no chorume. Foram demarcados ainda, três pontos afastados onde as coletas foram realizadas, utilizando o critério da acessibilidade (pontos mais fáceis para chegar) e da maior quantidade de percolação de chorume (Figura 8).



Figura 8: Locais demarcados para coleta do chorume. Fonte: GOOGLE MAPS, 2012.

De cada ponto foi retirado, uma alíquota de 1mL, que foi introduzida em um tubo contendo 2 mL de água peptonada tamponada 1% (Merck, Alemanha), outra alíquota de 1 mL que foi colocada no tubo contendo 2 mL de caldo Brain Heart Infusion (BHI) acrescido de 7,5% NaCl (Acumedia, EUA) e uma alíquota de 5 mL que foi colocado, em um tubo tipo Falcon estéril vazio .

As coletas foram realizadas com os devidos equipamentos de proteção individuais (EPI's) e para retirada das alíquotas foram utilizadas pipetas volumétricas de vidro estéreis (Figura 9).



Figura 9: Realização da coleta de chorume em local demarcado.

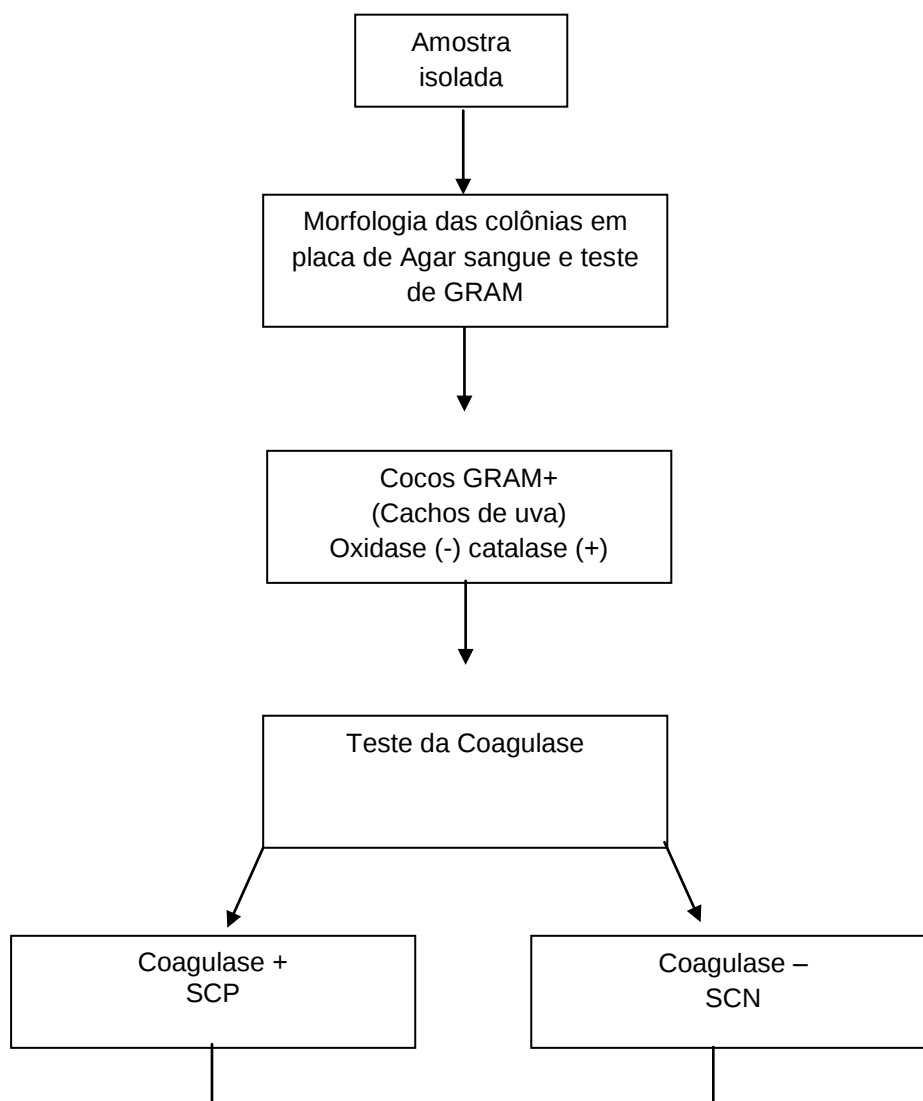
Em seguida, as amostras foram transportadas para o Laboratório de bacteriologia – LSA, CCTA/UENF, e processadas no setor de microbiologia. As amostras de chorume colocadas em água peptonada tamponada 1% (Merck, Alemanha) e caldo BHI (Acumedia, EUA) acrescido de 7,5% de NaCl foram incubadas diretamente na estufa (QUIMIS, Brasil) a 37°C por 24 horas, enquanto que o tubo contendo 5 mL de chorume foi fracionado dentro do fluxo laminar vertical (Pachane, Brasil) e assim distribuídos: i) 1 mL foi colocado em um tubo de 15mL tipo Falcon estéril e incubados a 37°C; ii) 1 mL foi adicionado em solução salina 0,85% para realizar diluições seriadas ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ ) e de cada uma destas diluições foram retirados 0,1 mL e inoculado em placas de Petri contendo agar sangue (Acumedia, EUA) suplementado com 5% de sangue estéril desfibrinado de carneiro e incubados a 37° por 24h; iii) 1mL de chorume foi colocado em um tubo tipo Falcon contendo 2 mL de caldo Rappaport-Vassiliadis (Acumedia, EUA) e mantido a 42°C em banho-maria por 24 horas (QUIMIS, Brasil).

Após o período de incubação foi verificado o crescimento bacteriano através da turvação no meio de cultura líquido contido nos tubos. Os tubos que apresentaram crescimento positivo foram centrifugados (HERMELE, Alemanha) a 4000  $xg$  por 10 minutos e os tubos que não obtiverem crescimento positivo permaneceram por mais 24h a 37°C. Depois de centrifugados, o sobrenadante foi devidamente descartado e com o auxílio de uma alça de platina o precipitado foi inoculado em placas de Petri contendo os seguintes meios de isolamento: Agar sangue (Acumedia, EUA) suplementado com 5% de sangue estéril desfibrinado de carneiro, Agar MacConkey (Acumedia, EUA), Agar Mannitol Salt Agar Base (Himedia, Índia) e Agar Hektoen Entérico (Acumedia, EUA).

As colônias foram isoladas de acordo com a morfologia e características nas placas de Petri. Após o isolamento, com as colônias puras foi realizado a coloração de Gram (Laborclin, Brasil), os testes da catalase (Peróxido de Hidrogênio a 3%), do citocromo oxidase (Fluka Chemika, Suíça) e todos os testes bioquímicos-fisiológicos necessários para identificação bacteriana, segundo as metodologias propostas por Koneman e Bergey's Manual e ANVISA (organogramas 1 e 2).

Em casos de dúvida as classificações foram confirmadas pelo uso de kits miniaturizados, Api ID32 Staph (Biomeriéux, França) para bactérias Gram positivas, Api 20E (Biomeriéux, França) para bactérias da família *Enterobacteriaceae* e Api 32GN (Biomeriéux, França) para bactérias Gram negativas, com leitura automatizada pelo equipamento MiniApi (Biomeriéux, França) Métodos de identificação por kits padronizados têm sido usados por diferentes autores e tem reconhecimento internacional, sendo amplamente empregados (MOREIRA *et al.*, 2005) Para a identificação das espécies da família *Enterobacteriaceae* e os Bastonetes Gram negativos não fermentadores e os *Staphylococcus* spp. seguiu-se a metodologia proposta segundo Koneman e Bergey's Manual e ANVISA.

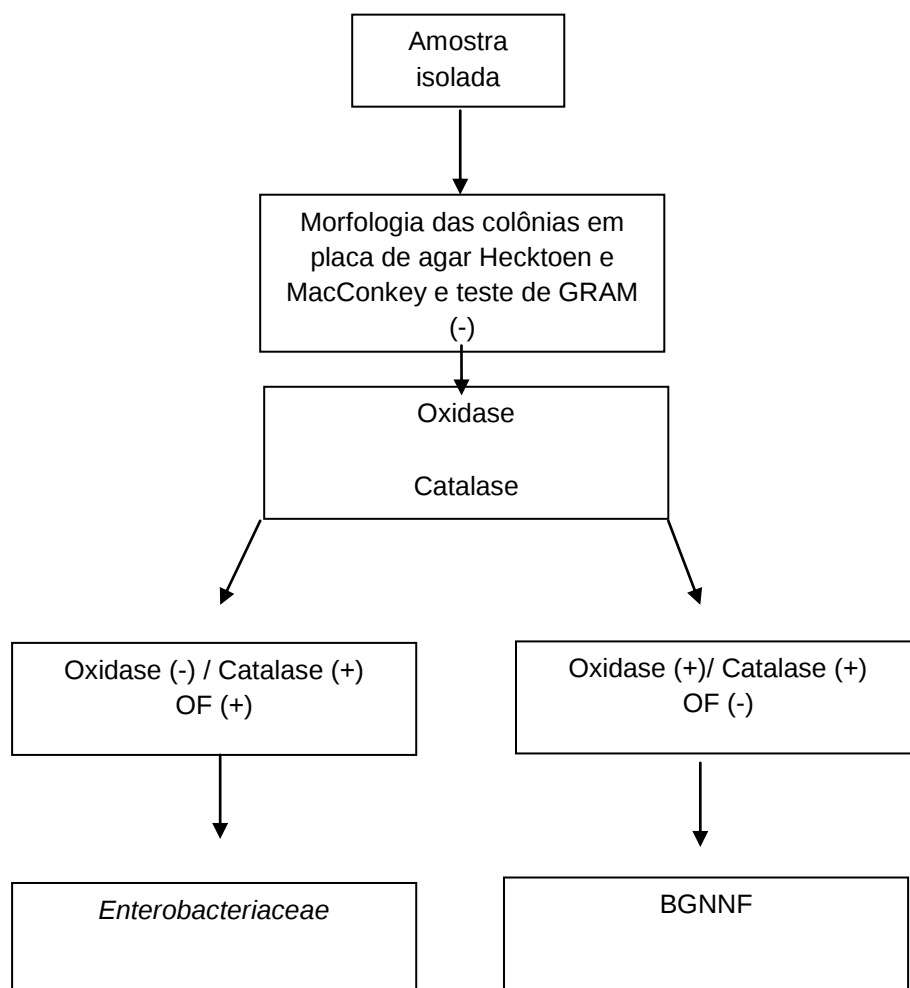
#### -Identificação dos *Staphylococcus*

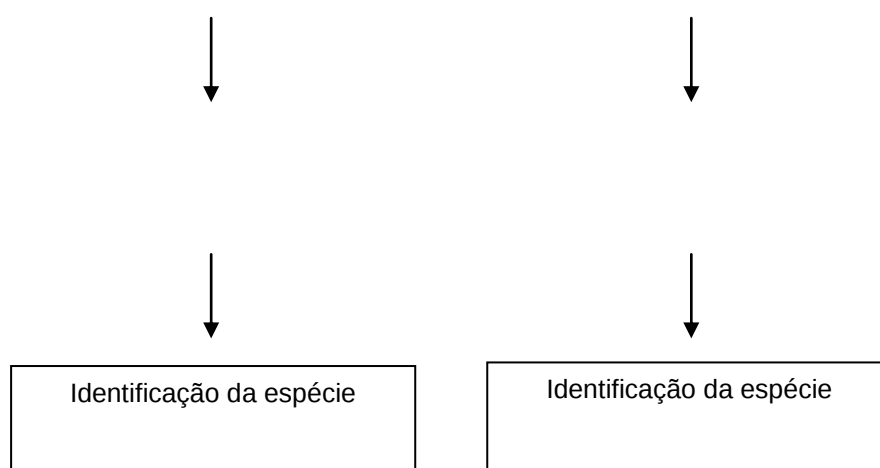


Organograma 1: metodologia empregada para identificação dos *Staphylococcus*.

\*Realização de API em casos duvidosos

**-Identificação Família *Enterobacteriaceae* e BGNNF**





Organograma 2: metodologia empregada para Identificação Família *Enterobacteriaceae* e BGNNF.

### 5.3- Amostras de Animais

Nos animais (caninos, felinos e aves) foram realizadas algumas avaliações clínicas, por médicos veterinários colaboradores, onde não foi observada a presença de lesões cutâneas, sendo as condições clínicas dos animais consideradas satisfatórias. Após a inspeção clínica foram coletadas amostras das cavidades mucosas dos animais com o auxílio de suabes estéreis Cary Blair (Copan, Itália): nasal em cães (n=10), oral nos felinos (n=1) e cloaca nas aves (n=3), sendo, portanto, coletados dois suabes, um para cultura de bactérias Gram positivas e outro para cultura de bactérias Gram negativas.

No laboratório, os suabes para cultura de Gram positivas foram acondicionados em tubos contendo caldo de enriquecimento BHI (Acumedia, EUA), acrescido de 7,5% NaCl para *Staphylococcus* spp. e o outro foi incubado a 37°C em estufa (QUIMIS, Brasil). Após incubação dos tubos a 37°C por 24 h, o material foi semeado em Agar sangue (Acumedia, EUA) suplementado com 5% de sangue estéril desfibrinado de carneiro, Agar MacConkey (Acumedia, EUA), Agar Hektoen Entéric (Acumedia, EUA) e incubados novamente por 24 horas.

Após crescimento foram visualizadas as colônias e suas características morfológicas bem como as características morfotintoriais. Para tal, as colônias

foram coradas pelo método de Gram (Laborclin, Brasil) e submetidas aos testes de Catalase (Peróxido de Hidrogênio a 3%) e oxidase (Fluka Chemika, Suíça) e todos os testes bioquímicos necessários para sua identificação. O prosseguimento nas análises das amostras seguiu o padrão de identificação bioquímico-fisiológico convencionais, e posteriormente os isolados bacterianos foram classificados ao nível de espécie, conforme descrito anteriormente.



Figura 10: Coleta de suabe oral sendo realizada em felino.



Figura 11: Coleta de suabe nasal sendo realizada em cão.

#### 5.4- Amostras de Humanos

As amostras foram coletadas, por profissionais capacitados com o auxílio de suabes estéreis Cary Blair (Copan, Itália), das cavidades nasais de cada indivíduo (Figuras 12 e 13), onde foram coletados dois suabes, um para cultura de bactérias Gram positivas e outro para cultura de bactérias Gram negativas.

No laboratório, os suabes para cultura de Gram positivas foram acondicionados em tubos contendo caldo de enriquecimento BHI (Acumedia, EUA), acrescido de 7,5% NaCl para *Staphylococcus* spp. e o outro foi incubado a 37°C. Após incubação dos tubos a 37°C por 24 h, o material foi semeado em Agar sangue (Acumedia, EUA) suplementado com 5% de sangue estéril desfibrinado de carneiro, Agar MacConkey (Acumedia, EUA), Agar Hecktoen Entérico (Acumedia, EUA) e incubados novamente por 24 horas.



Figura 12: Coleta de suabe nasal sendo realizada em catadora de material reciclável.



Figura 13: Coleta de suabe nasal sendo realizada em catadora de material reciclável.

No laboratório a metodologia utilizada foi igual a realizada com as amostras de animais seguindo o padrão de identificação bioquímico-fisiológico convencionais. Posteriormente os isolados bacterianos foram classificados ao nível de espécie, conforme descrito anteriormente.

### 5.5- Testes de resistência frente ao uso de antimicrobianos

As bactérias Gram-positivas e Gram-negativas foram testadas frente a diferentes antibacterianos. Para tal, o teste de Kirby-Bauer foi realizado conforme citado por OWENS & WATTS (1987) e preconizado pelo *CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE* (CLSI), 2011 e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para a pesquisa de susceptibilidade a antibióticos.

Para a realização do antibiograma, colônias recém-cultivadas (18-24hs) das bactérias isoladas e já identificadas foram inoculadas em solução salina estéril (NaCl 0,85%) e o valor da densidade óptica foi ajustado para 0,5 na escala de McFarland (grau de turbidimetria que equivale a aproximadamente  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL) de acordo com a leitura no aparelho DENSIMAT (bioMérieux, França). Em seguida, uma alíquota de 100 µL do inóculo de cada bactéria foi semeada com auxílio de um suabe estéril em placas contendo Agar Mueller Hinton (Merck, Alemanha). Após breve período para a secagem do inóculo sobre a superfície do Agar, foram distribuídos os discos de antibióticos (Multidisco, Laborclin, Brasil). Os antibióticos foram escolhidos de acordo com a preconização do CLSI, 2011 e o esquema foi realizado de acordo com a tabela 1..

Tabela 1: Antibióticos utilizados nos testes de antibiograma para avaliação do perfil de resistência fenotípica de bactérias Gram positivas e negativas.

| HUMANOS/ ANIMAIS/ CHORUME |       |                                                    |
|---------------------------|-------|----------------------------------------------------|
| <i>Enterobacteriaceae</i> | BGNNF | Cocos Gram-positivos<br><i>Staphylococcus</i> spp. |

|                          |                          |                          |
|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Amicacina (AMI), 30µg    | Amicacina (AMI), 30µg    | Amoxicilina (AMO), 10µg  |
| Amoxicilina (AMO), 10µg  | Amoxicilina (AMO), 10µg  | Ampicilina (AMP), 10µg   |
| Aztreonam (ATM), 30µg    | Aztreonam (ATM), 30µg    | Cefalotina (CFL), 30µg   |
| Cefotaxima (CTX), 30µg   | Cefepime (CPM), 30µg     | Clindamicina (CLI), 2µg  |
| Ceftriaxona (CRO), 30µg  | Cefotaxima (CTX), 30µg   | Eritromicina (ERI), 15µg |
| Cefoxitina (CFO), 30µg   | Ceftriaxona (CRO), 30µg  | Gentamicina (GEN), 10µg  |
| Gentamicina (GEN), 10µg  | Gentamicina (GEN), 10µg  | Oxacilina (OXA), 1µg     |
| Imipenem (IPM), 10µg     | Imipenem (IPM), 10µg     | Penicilina G (PEN), 10U  |
| Meropenem (MER), 10µg    | Meropenem (MER), 10µg    | Sulfazotrim (SUL), 25µg  |
| Tetraciclina (TET), 30µg | Tetraciclina (TET), 30µg | Tetraciclina (TET), 30µg |
| Tobramicina (TOB), 10µg  | Tobramicina (TOB), 10µg  | Vancomicina (VAN), 30µg  |

Para garantia da qualidade dos experimentos foram utilizadas linhagens de referência, cujos perfis de susceptibilidade aos antimicrobianos são conhecidos. Foram incluídas, como controle de qualidade: *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923, *P. aeruginosa* ATCC 27853 e *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978.

## 5.6- Análise Molecular – PCR das cepas de *Staphylococcus* spp. que apresentaram resistência fenotípica à oxacilina

As cepas identificadas como *Staphylococcus* spp. e que apresentaram resistência ao antibiótico oxacilina tiveram o seu DNA extraído utilizando o kit ILUSTRA™ BACTERIA GENOMICPREP MINI SPIN KIT (Healthcare, GE) seguindo as recomendações do fabricante com algumas modificações. Para garantia da qualidade dos experimentos foram utilizadas as seguintes linhagens de referência: *Salmonella enteritidis* ATCC13076 como controle negativo e *S. aureus* ATCC33591 (MRSA) como controle positivo. O seguinte protocolo foi seguido:

### 1º Passo: Coleta da Amostra

- 1) Pegar 3 mL de cultura bacteriana
- 2) Centrifugar por 30 segundos a 16.000 x g e após descartar o sobrenadante;

## **2º Passo: Lise Bacteriana**

- 3) Adicionar 40 µl de tampão lisozima e homogeneizar em vortex;
- 4) Adicionar 10 µl de lisozima (10 mg/ml) e homogeneizar em vortex;
- 5) Deixar 5 minutos em temperatura ambiente, homogeneizar em vortex e centrifugar por mais 5 segundos a 1000 x g;
- 6) Deixar 5 minutos em temperatura ambiente, após centrifugar 5 segundos a 1000 x g;
- 7) Adicionar 10 µl de proteinase K (10 mg/mL) diluído em PBS, homogeneizar em vortex e centrifugar 5 segundos a 1000 x g;
- 8) Deixar 7 minutos a 55°C, homogeneizar em vortex e centrifugar 5 segundos a 1000 x g;
- 9) Deixar 8 minutos a 55°C e centrifugar 5 segundos a 1000 x g;

## **3º Passo: Remoção do RNA**

- 10) Adicionar 5µl de RNase A, homogeneizar em vortex e centrifugar 5 segundos a 1000 x g;
- 11) Deixar 15 minutos a T°C ambiente.

## **4º Passo: Purificação das amostras:**

- 12) Adicionar 500µl do tampão de lise tipo 4 e homogeneizar em vortex;
- 13) Deixar 5 minutos em T°C ambiente, homogeneizar em vortex e centrifugar 5 segundos a 1000 x g;
- 14) Deixar 5 minutos a T°C ambiente;
- 15) Transferir o sobrenadante para a mini coluna (*Collection tube*);
- 16) Centrifugar a 11000 x g por 1 minuto e descartar o que ficou na mini coluna (*Collection tube*).

## **5º Passo: Lavagem e Secagem das Amostras**

- 17) Adicionar 500µl de tampão de lise tipo 4;
- 18) Centrifugar a 11000 x g por 1 minuto e descartar o restante;

- 19) Adicionar 500 µl de tampão de lavagem tipo 6;
- 20) Centrifugar a 16000 x g por 3 minutos;
- 21) Transferir a mini coluna para um novo tubo livre de DNase;

#### 6º Passo: Eluição

- 22) Adicionar 200µl do tampão de eluição tipo 5 pré-aquecido a 70°C;
- 23) Incubar a T°C ambiente por 1 minuto;
- 24) Centrifugar a 11000 x g por 1 minuto;
- 25) Guardar o tubo contendo o DNA purificado a -20°C.

Para a reação de PCR foram utilizados os primers GMECAR-1 e GMECAR-2 (quadro 4) e o marcador de peso molecular (Ladder- Ludwig Biotec ) de 100pb.

| Região | Primer                  | Sequência (5' a 3')  | Localização no Gene | Tamanho do produto amplificado (pb) |
|--------|-------------------------|----------------------|---------------------|-------------------------------------|
| MEC    | <i>mecA</i><br>GMECAR-1 | ACTGCTATCCACCCTCAAAC | 1182-1201           | 163                                 |
|        | GMECAR-2                | CTGGGTGAAGTTGTAATCGG | 1325-1344           |                                     |

Quadro 4: Marcador molecular utilizado para amplificação do gene *mecA*.

#### 5.7- Análises Estatísticas

Foi realizada análise estatística descritiva das principais variáveis. A prevalência de cepas resistentes, sensíveis e intermediárias e a divisão por grupos de bactérias e por tipos de amostra (de humanos, de animais e do chorume) foram demonstradas em valores percentuais.

## **6- Resultados**

Foram identificadas 187 cepas bacterianas, coletadas entre os anos de 2011 e 2012 no município de Campos dos Goytacazes - RJ, onde, 47 dos isolados foram de bactérias Gram positivas do gênero *Staphylococcus* spp. e 140 cepas de bactérias Gram negativas, onde 26 foram bastonetes GRAM negativos não fermentadores e 114 foram bactérias da Família *Enterobacteriaceae*.

### **6.1-Identificação das Cepas**

A avaliação genotípica das cepas de *Staphylococcus* spp. de origem humana que apresentaram resistência fenotípica a Oxacilina foi feita através de análise molecular que foram conduzidas a partir do primer específico para o gene *mecA* empregando a técnica de PCR de acordo com a metodologia empregada por MEHROTRA, 2000.

Foram utilizadas três tipos de amostras, de humanos, animais e do Chorume.

#### **6.1.1- Amostras de Humanos**

As bactérias foram isoladas da mucosa nasal de 28 catadores de materiais recicláveis atuantes no Aterro Controlado da CODIN.

Isolaram-se 26 cepas de *Staphylococcus* spp. 32 cepas de *Enterobacteriaceae* e 5 cepas de BGNMF.

- *Staphylococcus* spp.

Nem de todos os suabes coletados isolaram-se cepas de *Staphylococcus* spp.

Dos *Staphylococcus* coagulase positivos foram identificados 3 cepas de *S. aureus*, 3 cepas de *S. intermedius/pseudointermedius* e uma cepa de *S. hycus*.

Dos *Staphylococcus* coagulase negativos foram identificadas uma cepa de *S. epidermidis*, duas cepas de *S. hominis*, duas cepas de *S. saprophyticus*, uma cepa de *S. simulans*, uma cepa de *S. capitis*, uma cepa de *S. lentus* e 11 de SCN spp.

-*Enterobacteriaceae*

Dos suabes coletados obtiveram-se 100% de isolados, alguns suabes tiveram mais de um tipo de bactéria isolada.

Foram isoladas as seguintes espécies bacterianas: uma cepa de *Edwardsiella* sp., 6 cepas de *Escherichia coli*, uma cepa de *Escherichia vulneris*, uma cepa de *Enterobacter hormaechei*, uma cepa de *Enterobacter taylora*, uma cepa de *Enterobacter cloacae*, uma cepa de *Enterobacter aerogenes*, uma cepa de *Klebsiella pneumoniae*, 4 cepas de *Pantoea agglomerans*, 7 cepas de *Proteus myxofaciens*, 4 cepas de *Proteus penneri*, uma cepa de *Proteus vulgaris* e 3 cepas de *Proteus mirabilis*.

-Bastonetes GRAM negativos não fermentadores

Nem todos os suabes coletados tiveram isolamento de BGNMF.

Foram isoladas as seguintes bactérias: duas cepas de *Acinetobacter baumannii* e 3 cepas de *Pseudomonas stutzeri*.

### **6.1.2- Amostras de Animais**

Foram coletadas amostras de 14 animais, as cepas foram isoladas de animais domésticos, alguns que frequentavam o Aterro junto com seus donos e também animais domésticos que têm contato direto com os catadores e com os outros animais que frequentavam o aterro.

As amostras foram coletadas dos seguintes sítios anatômicos, cães- suabe nasal, gatos- suabe oral, aves- suabe da cloaca.

Isolou-se 21 cepas de *Staphylococcus* spp. 29 cepas de *Enterobacteriaceae* e 12 cepas de BGNNF.

### **-*Staphylococcus* spp.**

Nos suabes coletados foram obtidos 100% de isolados, sendo que alguns suabes tiveram mais de um tipo de bactéria isolada.

Dos *Staphylococcus* coagulase positivos foram identificados duas cepas de *S. aureus*, 3 cepas de *S. intermedius/pseudointermedius*, uma cepa de *S. schleiferii* e uma cepa de *S. delphini*. Dos *Staphylococcus* coagulase negativos foram identificadas uma cepa de *S. sciuri*, uma cepa de *S. lentus* e 12 cepas de SCN.

Das 21 cepas isoladas 15 foram obtidas de suabe nasal de cães, 5 foram obtidas de cloaca de aves e uma foi obtida de suabe oral de gato. Sendo o n para essas amostras de: nasal- cão (n=10), oral- felino (n=1) e cloaca- aves (n=3).

| Sítio de Isolamento | Micro-organismo isolado                | Quantidade (n=21) |
|---------------------|----------------------------------------|-------------------|
| Nasal/Cão           | <i>S. aureus</i>                       | (2/21) cepas      |
| Nasal/Cão           | <i>S.intermedius/pseudointermedius</i> | (2/21) cepas      |
| Cloaca/Ave          | <i>S.intermedius/pseudointermedius</i> | (1/21) cepa       |
| Nasal/Cão           | <i>S. schleiferii</i>                  | (1/21) cepa       |
| Nasal/Cão           | <i>S. delphini</i>                     | (1/21) cepa       |
| Nasal/Cão           | <i>S. sciuri</i>                       | (1/21) cepa       |
| Nasal/Cão           | <i>S. lentus</i>                       | (1/21) cepa       |
| Nasal/Cão           | SCN spp.                               | (7/21) cepas      |
| Oral/Gato           | SCN spp.                               | (1/21) cepa       |

|            |          |              |
|------------|----------|--------------|
| Cloaca/Ave | SCN spp. | (4/21) cepas |
|------------|----------|--------------|

Quadro 5: Local de isolamento, identificação do micro-organismo e quantidade de cepas isoladas.

### **-Enterobacteriaceae**

Nos suabes coletados foram obtidos 100% de isolados, sendo que alguns suabes tiveram mais de um tipo de bactéria isolada.

Foram isoladas as seguintes espécies bacterianas: uma cepa de *Cedeceae* spp., duas cepas de *Citrobacter amalonaticus*, duas cepas de *Edwardsiella* sp., uma cepa de *Escherichia coli*, 3 cepas de *Enterobacter* sp, uma cepa de *Enterobacter cloacae*, uma cepa de *Enterobacter taylorae*, uma cepa de *Enterobacter intermedius*, uma cepa de *Enterobacter aminigenus*, uma cepa de *Erwinia* sp., duas cepas de *Hafnia alvei*, duas cepas de *Klebsiella* sp., duas cepas de *Morganella morganii*, uma cepa de *Proteus myxofaciens*, duas cepas de *Proteus vulgaris*, uma cepa de *Proteus mirabilis*, 3 cepas de *Pantoea* sp., uma cepa de *Providencia* sp. e uma cepa de *Shigella* sp..

| Sítio de Isolamento | Micro-organismo isolado         | Quantidade (n=29) |
|---------------------|---------------------------------|-------------------|
| Oral/Gato           | <i>Klebsiella</i> sp.           | (1/29) cepa       |
| Oral/Gato           | <i>Enterobacter intermedius</i> | (1/29) cepa       |
| Cloaca/Ave          | <i>Citrobacter amalonaticus</i> | (1/29) cepa       |
| Cloaca/Ave          | <i>Morganella morganii</i>      | (1/29) cepa       |
| Cloaca/Ave          | <i>Providencia</i> sp.          | (1/29) cepa       |
| Nasal/Cão           | <i>Cedeceae</i>                 | (1/29) cepa       |
| Nasal/Cão           | <i>Citrobacter amalonaticus</i> | (1/29) cepas      |
| Nasal/Cão           | <i>Edwardsiella</i> sp.         | (2/29) cepas      |
| Nasal/Cão           | <i>Escherichia coli</i>         | (1/29) cepa       |
| Nasal/Cão           | <i>Enterobacter</i> sp.         | (3/29) cepas      |
| Nasal/Cão           | <i>Enterobacter cloacae</i>     | (1/29) cepa       |
| Nasal/Cão           | <i>Enterobacter taylorae</i>    | (1/29) cepa       |
| Nasal/Cão           | <i>Enterobacter amnigenus</i>   | (1/29) cepa       |
| Nasal/Cão           | <i>Erwinia</i> sp.              | (1/29) cepa       |
| Nasal/Cão           | <i>Hafnia alvei</i> ,           | (2/29) cepas      |

|           |                            |              |
|-----------|----------------------------|--------------|
| Nasal/Cão | <i>Klebsiella</i> sp.      | (1/29) cepa  |
| Nasal/Cão | <i>Morganella morganii</i> | (1/29) cepa  |
| Nasal/Cão | <i>Proteus myxofaciens</i> | (1/29) cepa  |
| Nasal/Cão | <i>Proteus vulgaris</i>    | (2/29) cepas |
| Nasal/Cão | <i>Proteus mirabilis</i>   | (1/29) cepa  |
| Nasal/Cão | <i>Pantoea</i> sp.         | (3/29) cepas |
| Nasal/Cão | <i>Shigella</i> sp.        | (1/29) cepa  |

Quadro 6: Local de isolamento, identificação do micro-organismo e quantidade de cepas isoladas de animais.

### **-Bastonetes GRAM negativos não fermentadores**

Nem todos os suabes coletados tiveram isolamento de BGNNF. Foram isoladas as seguintes bactérias: uma cepa de *Acinetobacter baumannii*, 7 cepas de *Alcaligenes denitrificans*, duas cepas de *Pseudomonas alcaligenes* e duas cepas de *Pseudomonas putida*.

| Sítio de Isolamento | Micro-organismo isolado          | Quantidade (n=12) |
|---------------------|----------------------------------|-------------------|
| Oral/Gato           | <i>Pseudomonas putida</i>        | (1/12) cepa       |
| Cloaca/ave          | <i>Alcaligenes denitrificans</i> | (2/12) cepas      |
| Nasal/Cão           | <i>Pseudomonas putida</i>        | (1/12) cepa       |
| Nasal/Cão           | <i>Acinetobacter baumannii</i>   | (1/12) cepa       |
| Nasal/Cão           | <i>Alcaligenes denitrificans</i> | (5/12) cepas      |
| Nasal/Cão           | <i>Pseudomonas alcaligenes</i>   | (2/12) cepas      |

Quadro 7: Local de isolamento, identificação do micro-organismo e quantidade de cepas isoladas.

### **6.1.3- Amostras do Chorume**

Foram realizadas quatro coletas de Chorume no Aterro Controlado da CODIN, 62 cepas bacterianas foram isoladas e identificadas, 53 cepas de bactérias pertencentes à Família *Enterobacteriaceae* e 9 cepas de BGNNF nenhum crescimento de *Staphylococcus* spp. em amostras oriundas do chorume.

As bactérias isoladas foram obtidas de três locais diferentes demarcados na área do aterro controlado. As coletas foram realizadas nas quatro épocas diferentes do ano. A primeira coleta de chorume foi realizada em 01 de junho de 2011, onde foram isoladas e identificadas 18 espécies bacterianas. A segunda coleta do chorume foi realizada em 03 de novembro de 2011, onde foram isoladas e identificadas 13 espécies bacterianas. A terceira coleta do chorume foi realizada em 02 de dezembro de 2011, onde foram isoladas e identificadas 17 espécies bacterianas e a quarta coleta do chorume foi realizada em 29 de fevereiro de 2012, onde foram identificadas 14 espécies bacterianas. A frequência de cada espécie isolada por período de coleta encontra-se no gráfico 1.

Os gêneros e as espécies identificadas foram:

#### **-Enterobacteriaceae**

Foram isoladas as seguintes espécies bacterianas: 5 cepas de *Citrobacter amalonaticus*, uma cepa de *Citrobacter freundii*, duas cepas de *Edwardsiella* sp., 3 cepas de *Edwardsiella tarda*, 4 cepas de *Escherichia coli*, uma cepa de *Enterobacter* spp., uma cepa de *Enterobacter amnigenus*, duas cepas de *Enterobacter cloacae*, uma cepa de *Enterobacter taylorae*, uma cepa de *Enterobacter ictaluri*, uma cepa de *Enterobacter aerogenes*, uma cepa de *Enterobacter gergoviae*, uma cepa de *Ewingella americana*, uma cepa de *Klebsiella terrigena*, uma cepa de *Leminorella richardii*, 5 cepas de *Morganella morganii*, duas cepas de *Proteus myxofaciens*, 8 cepas de *Proteus vulgaris*, 5 cepas de *Proteus mirabilis*, uma cepa de *Providencia* sp., duas cepas de *Providencia stuartii*, uma cepa de *Providencia alcalifaciens*, duas cepas de *Serratia* spp. e uma cepa de *Yersinia pseudotuberculosis* (Quadro 8).

| Espécie isolada                 | 1 <sup>a</sup> Coleta | 2 <sup>a</sup> Coleta | 3 <sup>a</sup> Coleta | 4 <sup>a</sup> Coleta |
|---------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| <i>Citrobacter amalonaticus</i> | 2                     | 1                     | 1                     | 1                     |
| <i>Citrobacter freundii</i>     | 0                     | 0                     | 0                     | 1                     |
| <i>Edwardsiella</i> sp.         | 0                     | 0                     | 2                     | 0                     |
| <i>Edwardsiella tarda</i>       | 1                     | 1                     | 1                     | 0                     |
| <i>Escherichia coli</i>         | 2                     | 1                     | 1                     | 0                     |
| <i>Enterobacter</i> sp.         | 0                     | 0                     | 0                     | 1                     |
| <i>Enterobacter amnigenus</i>   | 0                     | 0                     | 0                     | 1                     |
| <i>Enterobacter cloacae</i>     | 0                     | 0                     | 2                     | 0                     |
| <i>Enterobacter taylorae</i>    | 0                     | 1                     | 0                     | 0                     |
| <i>Enterobacter ictaluri</i>    | 0                     | 0                     | 0                     | 1                     |
| <i>Enterobacter aerogenes</i>   | 1                     | 0                     | 0                     | 0                     |
| <i>Enterobacter gergoviae</i>   | 0                     | 1                     | 0                     | 0                     |
| <i>Ewingella americana</i>      | 0                     | 0                     | 1                     | 0                     |

|                                    |   |   |   |   |
|------------------------------------|---|---|---|---|
| <i>Klebsiella terrigena</i>        | 1 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Leminorella richardii</i>       | 0 | 0 | 1 | 0 |
| <i>Morganella morganii</i>         | 1 | 0 | 2 | 2 |
| <i>Proteus myxofaciens</i>         | 1 | 0 | 0 | 1 |
| <i>Proteus vulgaris</i>            | 3 | 3 | 1 | 1 |
| <i>Proteus mirabilis</i>           | 2 | 3 | 0 | 0 |
| <i>Providencia</i> sp.             | 0 | 0 | 1 | 0 |
| <i>Providencia stuartii</i>        | 2 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Providencia alcalifaciens</i>   | 0 | 0 | 0 | 1 |
| <i>Serratia</i> spp.               | 0 | 0 | 1 | 1 |
| <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> | 0 | 1 | 0 | 0 |

Quadro 8: Identificação do micro-organismo, estação em que ocorreu a coleta e quantidade de cepas isoladas.

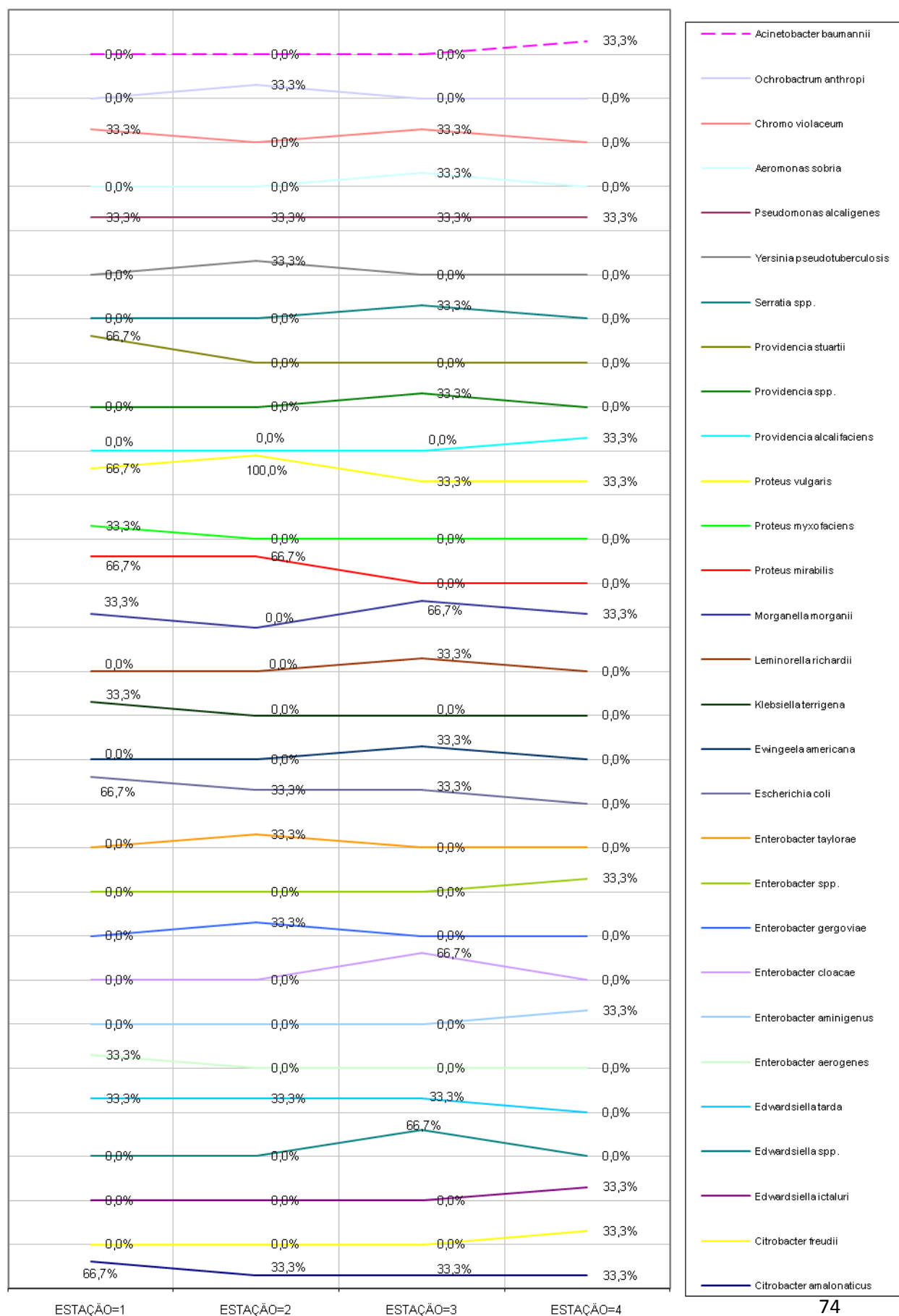
#### **-Bastonetes GRAM negativos não fermentadores**

Foram isoladas as seguintes bactérias: uma cepa de *Aeromonas sobria*, duas cepas de *Chromobacterium violaceum*, uma cepa de *Ochrobactrum anthropi*, duas cepas de *Pseudomonas alcaligenes* e duas cepas de *Pseudomonas putida* (Quadro 9).

| Espécie isolada                  | 1 <sup>a</sup> Coleta | 2 <sup>a</sup> Coleta | 3 <sup>a</sup> Coleta | 4 <sup>a</sup> Coleta |
|----------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| <i>Aeromonas sóbria</i>          | 0                     | 0                     | 1                     | 0                     |
| <i>Chromobacterium violaceum</i> | 1                     | 0                     | 1                     | 0                     |
| <i>Ochrobactrum anthropi</i>     | 0                     | 1                     | 0                     | 0                     |
| <i>Pseudomonas alcaligenes</i>   | 1                     | 0                     | 1                     | 1                     |
| <i>Pseudomonas putida</i>        | 0                     | 0                     | 0                     | 2                     |

Quadro 9: Identificação do micro-organismo, estação em que ocorreu a coleta e quantidade de cepas isoladas.





## 6.2- Perfil Fenotípico de Susceptibilidade

### 6.2.1- *Staphylococcus* spp.

Dos 47 isolados bacterianos de animais e humanos pertencentes ao gênero *Staphylococcus* sp. apenas uma cepa (2,1%) foi sensível a todos os antimicrobianos testados e 29 cepas (61,7%) foram resistentes a 3 ou mais antimicrobianos testados, demonstrando um padrão de multirresistência, também encontrado por PONTES, 2009 em *Staphylococcus* spp. isolados de moradores e animais residentes em comunidades carentes de Campos dos Goytacazes-RJ.

Os fármacos que se apresentaram menos eficazes foram amoxicilina com 17 cepas (36,2%) sensíveis, penicilina e ampicilina, ambas, com 20 cepas (42,6%) sensíveis. Os fármacos que se apresentaram mais eficazes foram a vancomicina com 47 cepas (100%) sensíveis, sulfazotrim com 46 das cepas (97,90%) sensíveis, gentamicina com 45 cepas (95,70%) sensíveis e cefalotina com 44 cepas (93,6%) sensíveis (tabela 2).

| ATB | S      | I      | R      |
|-----|--------|--------|--------|
| AMO | 36,20% | 0%     | 63,80% |
| AMP | 42,60% | 0%     | 57,40% |
| CFL | 93,60% | 2,10%  | 4,30%  |
| CLI | 72,30% | 14,90% | 12,80% |
| ERI | 63,90% | 17%    | 19,10% |
| GEN | 95,70% | 0%     | 4,30%  |
| OXA | 72,30% | 0%     | 27,70% |
| PEN | 42,60% | 0%     | 57,40% |
| SUT | 97,90% | 0%     | 2,10%  |
| TET | 48,90% | 2,20%  | 48,90% |
| VAN | 100%   | 0%     | 0%     |

Tabela 2: Porcentagem de *Staphylococcus* spp. sensíveis (S), intermediários (I) e resistentes (R) a cada antibacteriano testado.

### 6.2.2- Família *Enterobacteriaceae*

Das 114 cepas de *Enterobacteriaceae* isoladas, 11 (20,8%) foram sensíveis a todos os antibióticos testados e 7 (13,2%) das cepas apresentaram resistência a 3 ou mais antimicrobianos.

Os fármacos que se apresentaram menos eficazes foram a amoxicilina com 61 cepas (53,50%) sensíveis, a tetraciclina com 62 cepas (54,40%) sensíveis, e cefoxitina com 84 cepas (73,70%) sensíveis; os fármacos que se apresentaram mais eficazes foram o meropenem e o imipenem com 112 cepas (98,20%) sensíveis e o aztreonam com 112 das cepas (96,50%) sensíveis (tabela 3).

| ATB | S      | I     | R      |
|-----|--------|-------|--------|
| AMI | 91,20% | 3,50% | 5,30%  |
| AMO | 53,50% | 7,00% | 39,50% |
| ATM | 96,40% | 1,80% | 1,80%  |
| CFO | 73,70% | 9,30% | 17%    |
| CRO | 90,40% | 6,10% | 3,50%  |
| CTX | 93,90% | 3,50% | 2,60%  |
| GEN | 89,50% | 7,00% | 3,50%  |
| IPM | 98,20% | 0%    | 1,80%  |
| MER | 98,20% | 0,9%  | 0,9%   |
| TET | 54,40% | 6,10% | 39,50% |
| TOB | 92,10% | 4,40% | 3,50%  |

Tabela 3: Porcentagem de *Enterobacteriaceae* sensíveis (S), intermediários (I) e resistentes (R) a cada antibacteriano testado.

### 6.2.3- Bastonetes GRAM negativos não fermentadores

Das 26 cepas de BGNNF isoladas nenhuma foi sensível a todos os antibióticos testados.

Os fármacos que se apresentaram menos eficazes foram a amoxicilina com nenhuma cepa sensível, o aztreonam e a cefotaxima com 19 cepas (73%) sensíveis e a ceftriaxona com 20 cepas (77%) sensíveis. Os fármacos que se apresentaram mais eficazes foram o meropenem, o imipenem, a gentamicina e a tobramicina com 26 (100%) das cepas sensíveis aos fármacos testadas (tabela 4).

| ATB | S      | I     | R      |
|-----|--------|-------|--------|
| AMI | 88,50% | 0%    | 11,50% |
| AMO | 0%     | 0%    | 100%   |
| ATM | 73%    | 0%    | 27%    |
| CPM | 100%   | 0%    | 0%     |
| CRO | 77%    | 0%    | 23%    |
| CTX | 73%    | 0%    | 27%    |
| GEN | 100%   | 0%    | 0%     |
| IPM | 100%   | 0%    | 0%     |
| MER | 100%   | 0%    | 0%     |
| TET | 84,60% | 3,90% | 11,50% |
| TOB | 100%   | 0%    | 0%     |

Tabela 4: Porcentagem de BGNNF sensíveis (S), intermediários (I) e resistentes (R) a cada antibacteriano testado.

6.2.4- Perfil de Susceptibilidade aos antimicrobianos por grupos de amostras

Amostras de Animais

-*Staphylococcus spp.*

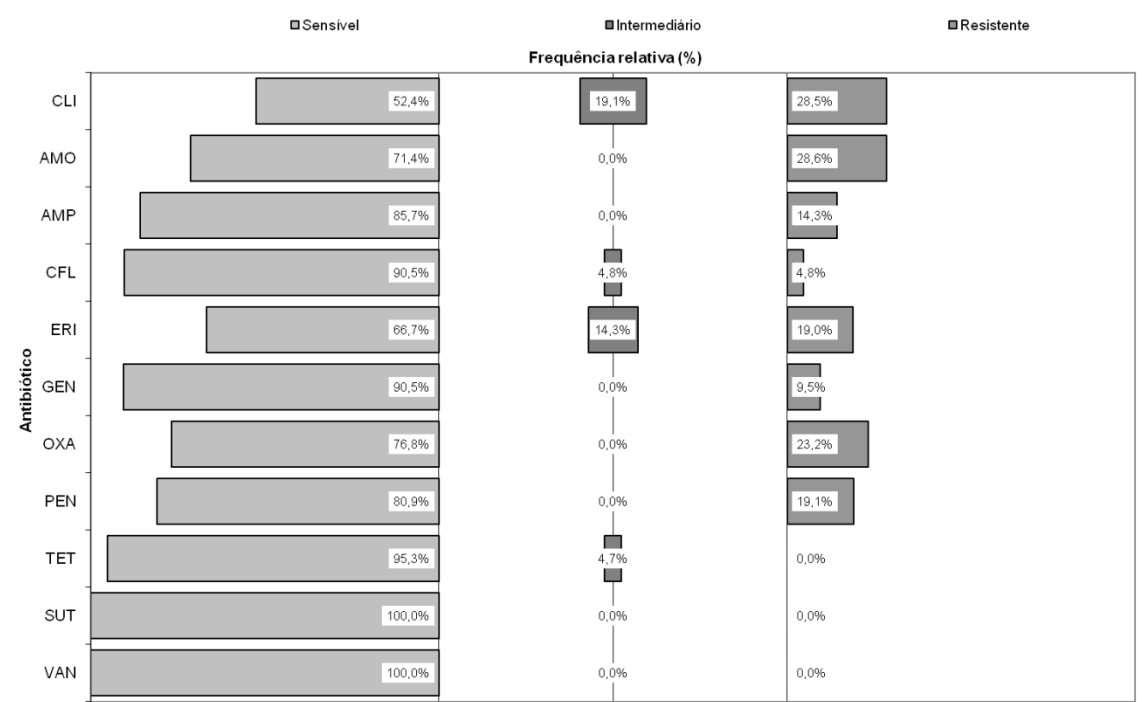


Gráfico 2: Perfil de susceptibilidade das amostras de *Staphylococcus spp.* de origem animal aos antimicrobianos testados.

## - Família *Enterobacteriaceae*

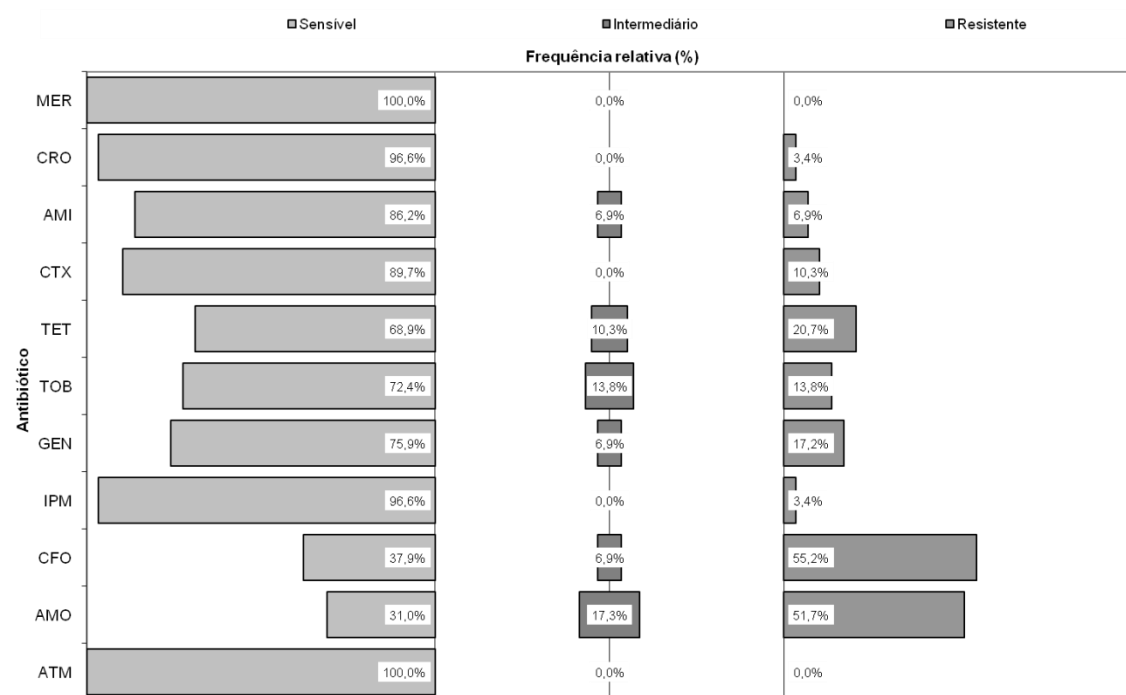


Gráfico 3: Perfil de susceptibilidade (em porcentagem) das amostras de *Enterobacteriaceae* de origem animal aos antimicrobianos testados.

**-Bastonetes GRAM negativos não fermentadores**

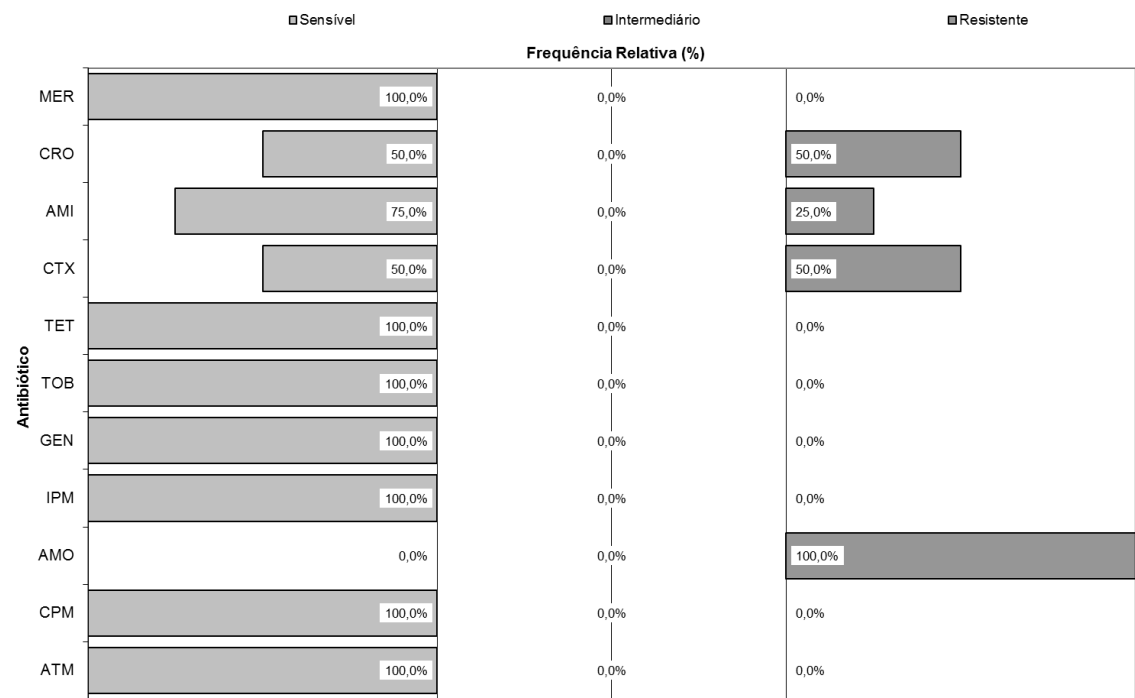


Gráfico 4: Perfil de susceptibilidade (em porcentagem) das amostras de BGNNF de origem animal aos antimicrobianos testados.

## Amostras de Humanos

### ***-Staphylococcus spp.***

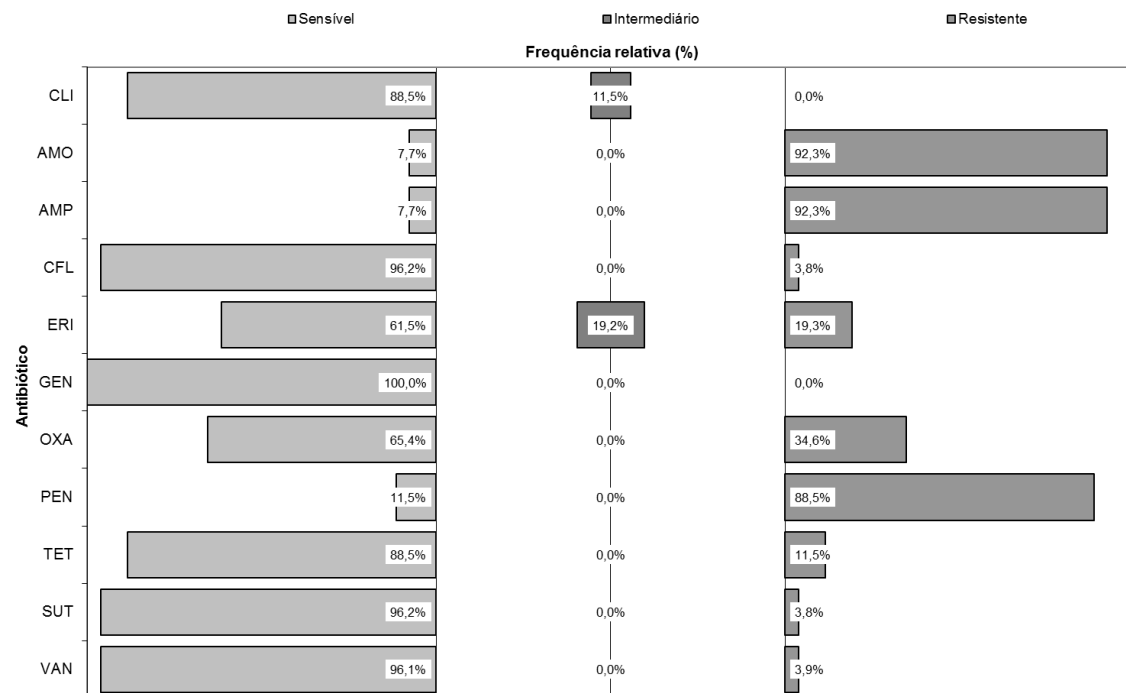


Gráfico 5: Perfil de susceptibilidade (em porcentagem) das amostras de *Staphylococcus* de origem humana aos antimicrobianos testados.

- Família *Enterobacteriaceae*

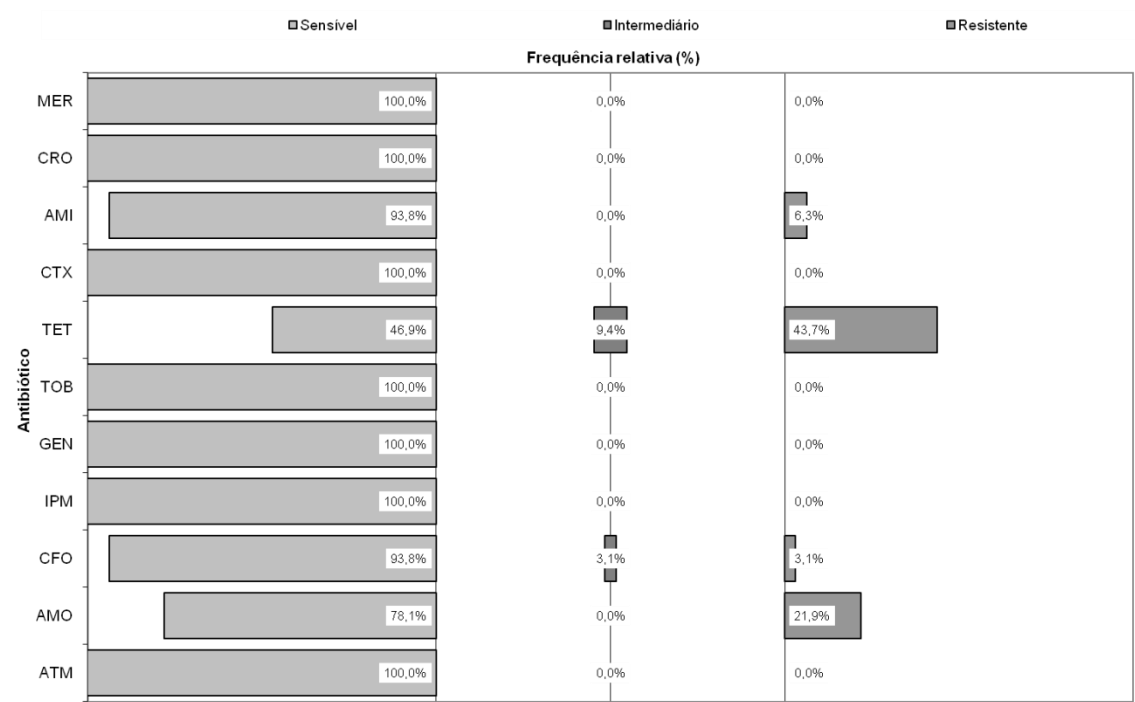


Gráfico 6: Perfil de susceptibilidade (em porcentagem) das amostras de *Enterobacteriaceae* de origem humana aos antimicrobianos testados.

**-Bastonetes GRAM negativos não fermentadores**

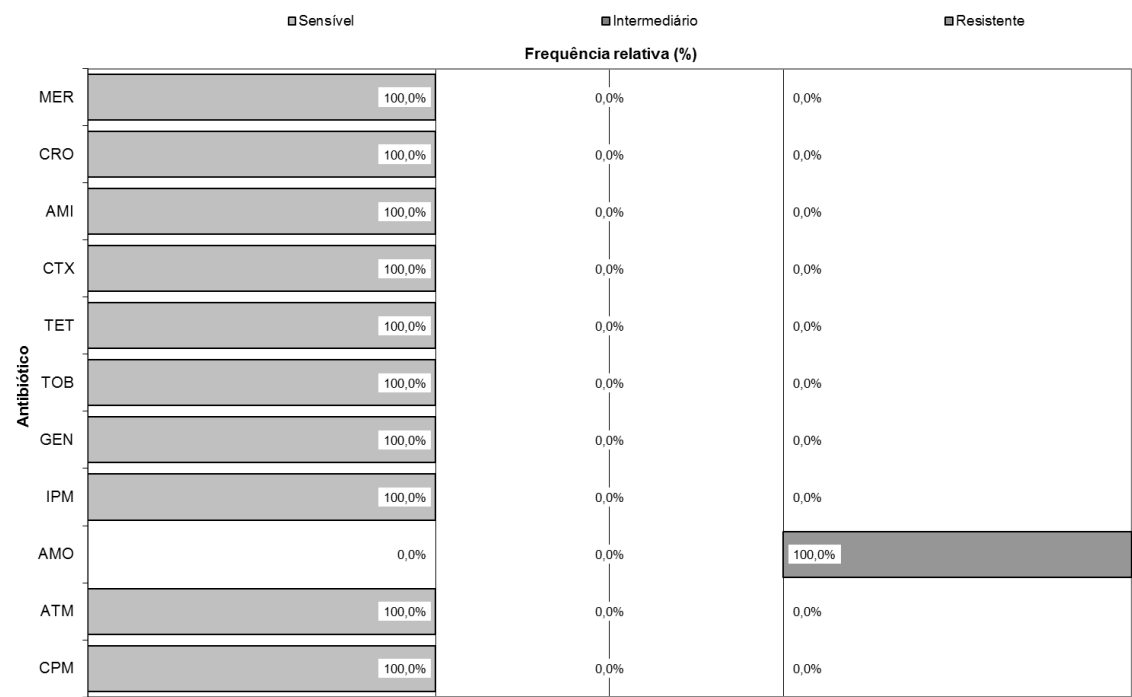


Gráfico 7: Perfil de susceptibilidade (em porcentagem) das amostras de BGNNF de origem humana aos antimicrobianos testados

## Amostras de Chorume

### - Família *Enterobacteriaceae*

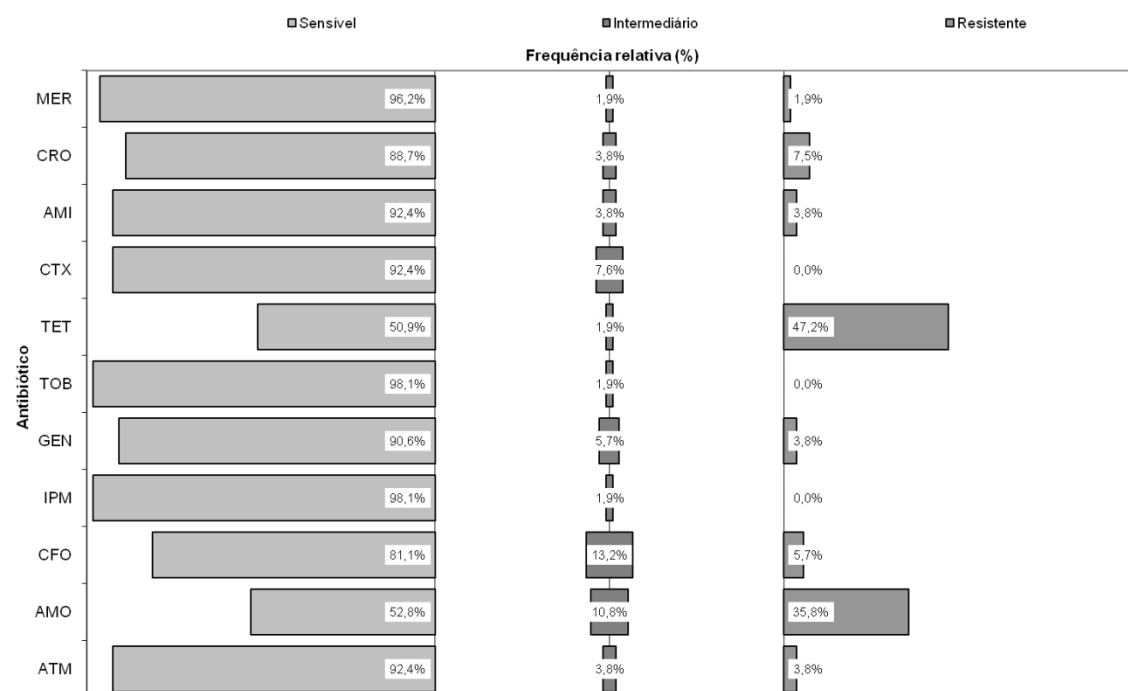


Gráfico 8: Perfil de susceptibilidade (em porcentagem) das amostras de *Enterobacteriaceae* isoladas do chorume aos antimicrobianos testados.

## -Bastonetes GRAM negativos não fermentadores

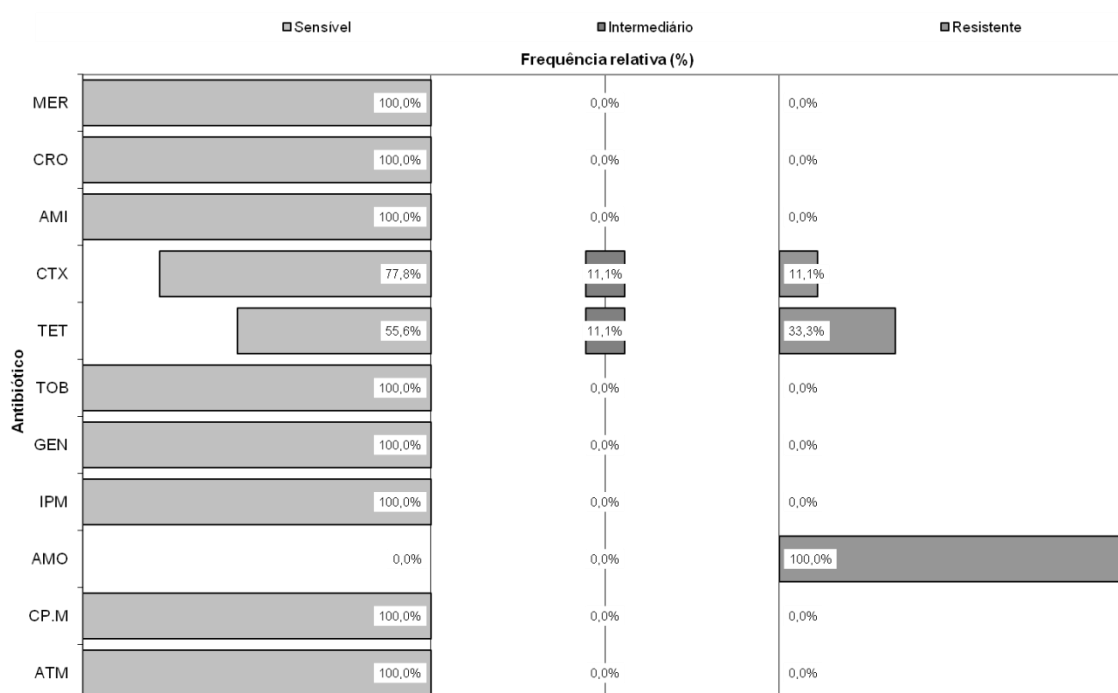


Gráfico 9: Perfil de susceptibilidade (em porcentagem) das amostras de BGNNF isoladas do chorume aos antimicrobianos testados.

### 6.3- Perfil Genotípico de Resistência das cepas de *Staphylococcus* spp. à oxacilina

As amostras que apresentaram resistência fenotípica à oxacilina, através da técnica de difusão em Agar (Kirby-Bauer), foram submetidas à análise molecular pela técnica de PCR para amplificação do gene *mecA*.

Neste estudo foram isoladas oito amostras, coletadas de humanos e quatro de animais (cães), que apresentaram resistência à oxacilina, e foram testadas por análise molecular. Dessas oito amostras sete de origem humana e quatro de origem animal foram positivas para presença do gene *mecA* que codifica a resistência à Meticilina (Figura 14 e 15). Desses *Staphylococcus* sp. de amostras humanas dois eram SCN, um *S. aureus*, dois *S. intermedius*, um *S. hominis* e um *S. saprophyticus*, e os *Staphylococcus* sp. de origem animal foram um *S. delphini*, um *S. lentus* e dois SCN.

O *S. Delphini* e o *S. lentus* coletados da cavidade nasal de cães foram positivo para a presença do gene *mecA*, sendo o primeiro caso de *S. lentus* e *S. delphini* com a presença do gene *mecA* coletados de cães.

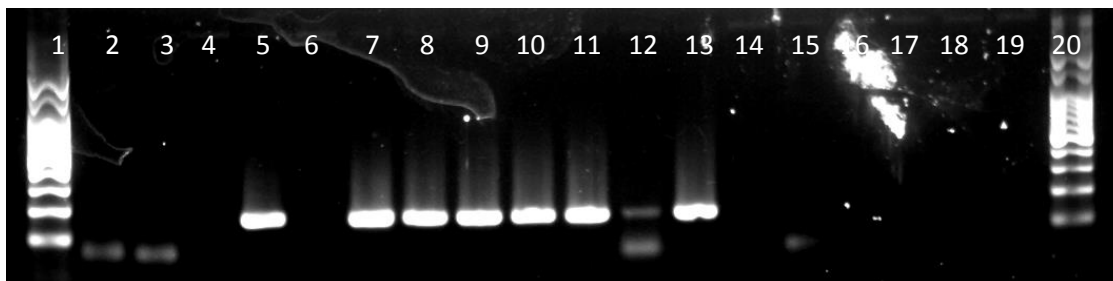


Figura 14: Resultados do Gel de agarose por eletroforese: amplificação de genes *mecA* de *Staphylococcus* isolados de suabe nasal de humanos. Identificação dos poços: Coluna 1 e 20 Ladder – marcador de peso molecular (100bp, Ludwig Biotech, Brazil); 2- controle negativo com H<sub>2</sub>O, sem DNA; 3- controle negativo com *Salmonella enteritidis* ATCC13076; 4- poço vazio; 5- *S. aureus* ATCC33591 controle positivo (163 pb); 6- poço vazio; 7- *S. intermedius* (amostra 13B); 8- *S. hominis* (amostra 15); 9- *S. intermedius* (amostra 17B); 10- SCN (amostra 14A); 11- SCN (amostra 19A); 12- *S. saprophyticus* (amostra 23); 13- *S. aureus* (amostra 23); 14- *S. epidermidis* (amostra 24); 15-19- poço vazio.



Figura 15: Resultados do Gel de agarose por eletroforese: amplificação de genes *mecA* de *Staphylococcus* isolados de suabe nasal de animais (cães). Identificação dos poços: Coluna 1 e 20- Ladder - marcador de peso molecular (100pb, Ludwig Biotech, Brazil); 2- controle com H<sub>2</sub>O, sem DNA; 3- controle negativo *Salmonella enteritidis* ATCC13076; 4- poço vazio; 5- *S. aureus* ATCC33591 controle positivo (163 pb); 6- poço vazio; 7- SCN (amostra ALIX 9c); 8- *S. delphini* SCN (amostra ALIX12); 9- poço vazio; 10- SCN (amostra ALIX 17b); 11- *S. lentus* (amostra ALIX 26); 12-19- poço vazio.

## 7- Discussão

O Aterro Controlado da CODIN está localizado em área periurbana da Cidade de Campos dos Goytacazes, é rodeado por residências humildes. A população vizinha ao aterro, em sua maioria, sobrevive com o trabalho de coleta de materiais recicláveis e muitos admitiram fazer uso de alimentos, vestuários e objetos encontrados no Aterro Controlado. Tendo em vista o grau socioeconômico da região onde o estudo foi realizado, os resultados observados podem refletir o padrão higiênico-sanitário dos indivíduos, dos animais e dos ambientes investigados.

A presença de bactérias consideradas contaminantes fecais colonizando a mucosa nasal dos catadores, a mucosa nasal e oral e cloaca dos animais e no chorume extraído do aterro, comprovam que o local é insalubre e com rica flora microbiana.

A colonização nasal por bactérias de importância clínica é desprovida de sintomas, ou seja, o indivíduo não desenvolve infecção. Os catadores de materiais recicláveis são expostos diariamente aos resíduos de diversas origens, o que aumenta as chances de serem colonizados por diversos tipos de micro-organismos com diferenciados padrões de resistência aos antimicrobianos. Segundo SANTOS e colaboradores (2007), essa colonização assintomática tem grande importância clínica, uma vez que, com as narinas colonizadas, os indivíduos contaminam as próprias mãos e passam a atuar como veículo de transferência de bactérias podendo causar infecções por contato. Assim, principalmente em hospitais, o hospedeiro assintomático pode ser um paciente, um visitante, ou mesmo um profissional de saúde. De acordo com DAVIS (2005) e REAGAN (1991) o carreamento nasal também contribui para a transmissão da bactéria por disseminação aérea.

No aterro os catadores não utilizam EPI'S, o que favorece a contaminação, principalmente durante a coleta, onde muitos aerossóis são formados durante o ato de revirar os resíduos e na hora do descarregamento destes pelos caminhões de coleta. Além da contaminação dos catadores junto aos resíduos, os animais presentes no local assumem um papel importante de transmissão, pois enquanto percorrem as pilhas de resíduos em busca de alimentos, podem acabar adquirindo, trocando e conseqüentemente carregando com eles diversas bactérias, muitas de caráter zoonótico.

Neste sentido, GARCIA & ZANETTI-RAMOS (2004) afirmam que tanto os resíduos de serviços de saúde quanto os domiciliares comuns representam risco para quem os manipula e entra em contato direto com eles e para a comunidade, que é indiretamente exposta por meio dos aerossóis e vetores. Estes autores também afirmam que os resíduos domiciliares perfurocortantes deveriam ser segregados e acondicionados de maneira adequada em recipientes rígidos e estanques, para evitar acidentes com os funcionários da coleta e eventuais catadores que atuem nos aterros dos municípios.

Durante a coleta do chorume foram encontrados resíduos perfurocortantes e hospitalares, o que põe a população atuante no local mais em risco (figura 16 e 17).



Figura 16: Material hospitalar desenterrado com resto de material biológico.



Figura 17: Material hospitalar desenterrado com resto de material biológico.

Considerando a questão dos riscos ao meio ambiente, à medida que os resíduos são tratados inadequadamente, sendo dispostos de qualquer maneira em depósitos a céu aberto ou em cursos d'água, eles possibilitam a contaminação de mananciais de água potável, e a disseminação de doenças por meio de vetores que se multiplicam nesses locais ou que fazem dos resíduos sua fonte de alimentação. LICHTVEL, *et al.*, 1990 afirmam a importância dos vetores na disseminação de doenças, principalmente porque em locais com grande diversidade de materiais e dejetos orgânicos, a quantidade de vetores atraídos é significativamente grande, o que aumenta ainda mais as chances de contaminação.

No aterro sanitário da CODIN, a grande quantidade de animais presentes no local chama atenção para as doenças zoonóticas, que geralmente, têm bastante prevalência em locais onde a população desconhece sobre esses tipos de doenças, tem baixo nível socioeconômico, falta de saneamento básico e falta de condições financeiras para comprar materiais de limpeza e higiene pessoal.

Foram observadas espécies caninas, bovinas, equinas, caprinas muitas aves, como *Coragyps atratus* (urubus), *Casmerodius albus* (garças), *Columba livia* (pombos) e *Caracara plancus* (Gaviões). Há de se ressaltar que esses animais frequentam o aterro e também outros locais na comunidade aumentando as chances de disseminação de bactérias tanto no local quanto na população, principalmente os cães e os gatos que mantêm contato direto com seus donos, inclusive com as crianças, que são mais propensas a adquirir doenças devido à imaturidade do sistema imunológico.

### **7.1- Espécies bacterianas encontradas**

Os micro-organismos isolados com mais frequência no estudo foram a *Escherichia coli* e *Proteus vulgaris* ambos com 11 cepas isoladas (quadro 10). O gênero mais encontrado foi *Proteus* sp. com 34 cepas isoladas, seguindo-se do *Enterobacter* sp. Com 19 cepas isoladas (quadro 11 e 12).

|                         | Local de Isolamento das cepas |         |         |
|-------------------------|-------------------------------|---------|---------|
| Micro-organismo         | Chorume                       | Animal  | Humano  |
| <i>Escherichia coli</i> | 4 cepas                       | 1 cepa  | 6 cepas |
| <i>Proteus vulgaris</i> | 8 cepas                       | 2 cepas | 1 cepa  |

Quadro 10: Quantidade de cepas de *E. coli* e *Proteus vulgaris* isolados e separados por origem.

|                            | Local de Isolamento das cepas |         |         |
|----------------------------|-------------------------------|---------|---------|
| Micro-organismo            | Chorume                       | Animal  | Humano  |
| <i>Proteus mirabilis.</i>  | 5 cepas                       | 1 cepa  | 3 cepas |
| <i>Proteus myxofaciens</i> | 2 cepas                       | 1 cepa  | 7 cepas |
| <i>Proteus penneri</i>     | -                             | -       | 4 cepas |
| <i>Proteus vulgaris</i>    | 8 cepas                       | 2 cepas | 1 cepa  |

Quadro 11: Espécie de *Proteus* isolado e quantidade de cepas isoladas e separadas por origem.

| Micro-organismo                 | Local de Isolamento das cepas |        |        |
|---------------------------------|-------------------------------|--------|--------|
|                                 | Chorume                       | Animal | Humano |
| <i>Enterobacter</i> sp.         | 1 cepa                        | 3 cepa | -      |
| <i>Enterobacter amnigenus</i>   | 1 cepa                        | 1 cepa | -      |
| <i>Enterobacter aerogenes</i>   | 1 cepa                        | -      | 1 cepa |
| <i>Enterobacter cloacae</i>     | 2 cepa                        | 1 cepa | 1 cepa |
| <i>Enterobacter intermedius</i> | -                             | 1 cepa | -      |
| <i>Enterobacter ictaluri</i>    | 1 cepa                        | -      | -      |
| <i>Enterobacter gergoviae</i>   | 1 cepa                        | -      | -      |
| <i>Enterobacter hormaechei</i>  | -                             | -      | 1 cepa |
| <i>Enterobacter taylorae</i>    | 1 cepa                        | 1 cepa | 1 cepa |

Quadro 12: Espécie de *Enterobacter* isolada e quantidade de cepas isoladas e separados por origem.

As estirpes bacterianas encontradas não seguiram um padrão no chorume, como já esperado. Isolou-se coliformes fecais, como a *Escherichia coli* e o *Enterobacter* sp. e muitas bactérias da família *Enterobacteriaceae*, como *Proteus* sp. que são bactérias amplamente disseminadas na natureza.

Embora bactérias do gênero *Staphylococcus* não tenham sido isoladas das amostras de chorume, coletadas e processadas pelas técnicas descritas neste trabalho, outros autores demonstraram a presença dessas bactérias em amostras de água e de resíduos provenientes de estação de tratamento de água de consumo. NASCIMENTO (2009) isolou 109 *Staphylococcus* coagulase negativos em Resíduos de Serviço de Saúde, que demonstraram um padrão de multirresistência, além de 40 cepas com resistência fenotípica à oxacilina.

Em 2011, NWABUEZE isolou *S. aureus* e *Escherichia coli* em amostras de água coletada de uma lagoa que recebe grandes quantidades de chorume na cidade de Asaba, Nigéria. OBIRE & AGUDA (2002) também conseguiram isolar, com a seguinte frequência, espécies bacterianas como *Bacillus* (26,08%), *Citrobacter* (4,35%), *Enterobacter* (4,35%), *E. coli* (4,35%), *Klebsiella* (4,35%), *Nieseria* (4,35%), *Pseudomonas* (4,35%), *Shigella* (4,35%), *Staphylococcus* (13,04%), o *Streptococcus* (26,08%) e *Vibrio* (4,35%) do chorume, na cidade de Port Harcourt, Nigéria.

## 7.2- Perfil de resistência aos antimicrobianos

MARTINEZ (2009) afirma que para compreender plenamente o desenvolvimento da resistência é necessário estudar as características bacterianas frente aos antimicrobianos, não apenas em ambientes hospitalares, mas também, no meio ambiente, em recursos naturais e locais poluídos.

Os lixões são ambientes propícios para ocorrer transferência de genes de resistência aos antibióticos entre as bactérias, pois há elevada concentração de nutrientes facilitando o desenvolvimento destas bactérias. Os nutrientes provavelmente têm uma influência indireta no processo de transferência de genes, pois, propiciam o aumento da densidade e da atividade metabólica das bactérias. A elevada concentração de bactérias nos resíduos (chorume) aumenta a possibilidade de transferência horizontal, uma vez que a probabilidade de uma bactéria doadora de genes resistentes encontrar outra bactéria receptora é maior (MARTINEZ, 2009).

Segundo WUNDER *et al.*, 2013, o aumento da utilização de antimicrobianos a sua biodisponibilidade levaram a mudanças nos ecossistemas poluídos. Diferentemente de metais pesados que desafiam todas as formas de vida os antimicrobianos selecionam cepas resistentes apresentando assim importância clínica, inclusive, quando as bactérias se apresentam sob a forma de biofilme, onde ocorre aumento da concentração inibitória mínima (CIM), enquanto que a CIM dos antimicrobianos apresentam valores menores contra cada espécie bacteriana em sua forma planctônica.

NOVO *et al.*, 2013 afirmaram que as características das comunidades microbianas são um dos fatores que podem determinar o potencial de resistência aos antibióticos, podendo promover a propagação de fatores de resistência, sendo assim necessário o conhecimento dessas comunidades para inferir as relações de espécies com o meio ambiente.

Em estudos realizados por HARNISZ (2013) observou-se grande incidência de bactérias resistentes à tetraciclina em corpos d'água que recebem efluentes oriundos de tratamento de esgoto. Isso corrobora com os resultados encontrados no presente estudo, onde também foi encontrada grande quantidade de cepas bacterianas apresentando resistência à tetraciclina. De acordo com Martinez (2009), a presença de resíduos de antimicrobianos, a grande quantidade de micro-organismos, a intensidade de trocas genéticas e mutações propiciam a resistência aos antimicrobianos.

#### **7.2.1-Staphylococcus spp.**

No presente estudo, os *Staphylococcus* spp. isolados dos resíduos apresentaram maior índice de resistência aos betalactâmicos, em particular à penicilina G (57,40%), que é uma penicilina natural, a amoxicilina (63,80%) e ampilina (57,40%) que são penicilinas semi-sintéticas e a tetraciclina (48,90%) que constitui outro grupo, chamado de grupo das tetraciclinas. Na região norte do estado do Rio de Janeiro a resistência desta espécie à penicilina e a outros fármacos, principalmente aos betalactâmicos foi constatada em amostras de animais domésticos no trabalho realizado por XIMENES *et al.*, (2007), inclusive de formigas de origem hospitalar sugerindo que bactérias do gênero com este perfil já se propagaram no ambiente dessa região do estado do Rio de Janeiro (MOREIRA *et al.*, 2005).

A vancomicina, uma droga da classe dos Glicopeptídeos, foi o fármaco mais eficaz, sendo todos os *Staphylococcus* sensíveis. Atualmente muitos *Staphylococcus aureus* vêm apresentando valores de CIM elevados e até mesmo resistência a este fármaco, sendo denominados VRSA. VIDAILLAC *et al.*, (2013) relataram que os MRSA são mais susceptíveis a mutações tornando-se VRSA ou

apresentando resistência intermediária a vancomicina. GARZONI & VERGIDIS (2013) observaram que resistência à vancomicina pode ocorrer por meio da transferência do gene *vanA* de *Enterococcus* resistentes à vancomicina (VRE) para MRSA.

Os resultados de resistência à penicilina e ampicilina assemelham-se aos encontrados por PONTES, 2009 que isolou *Staphylococcus* spp. de moradores de comunidades carentes da cidade de Campos dos Goytacazes-RJ, onde, observou-se que mais de 60% das cepas isoladas apresentaram resistência à penicilina e mais de 50 % apresentaram resistência à ampicilina.

Em 2009, VILELA, encontrou mais de 80% de resistência à penicilina em isolados de *Staphylococcus* spp. de infecções sistêmicas comunitárias. Esses resultados semelhantes reafirmam o padrão de resistência que esses micro-organismos vêm mantendo frente às penicilinas naturais e semi-sintéticas, isso decorre da ampla utilização desde a sua descoberta e ao uso indiscriminado de antimicrobianos pela classe médica. (VILELA, 2009).

Os resultados de sensibilidade à vancomicina assemelham-se aos de PONTES, 2009, que também encontrou 100% de sensibilidade, enquanto VILELA (2009) encontrou 94,44% de sensibilidade à vancomicina em isolados de *S. aureus* de infecções sistêmicas comunitárias.

#### **7.2.1.1- Análise Molecular- PCR**

De acordo com a literatura disponível, a crescente incidência de MRSA associado à comunidade (CA-MRSA) está se tornando um problema de saúde pública e de grande preocupação mundial (BANCROFT, 2007). As cepas de CA-MRSA foram originalmente isoladas em pacientes que não tiveram contato com o sistema de saúde e, posteriormente, estas cepas foram distinguidas daquelas isoladas de pessoas que têm contato com ambiente hospitalar MRSA (HA-MRSA).

No presente estudo foram detectadas a presença do gene *mecA* em onze cepas que apresentaram resistência fenotípica à oxacilina, enquanto que apenas em uma cepa resistente a este mesmo antibiótico não foi detectado a presença do

gene. O padrão de presença do gene por espécie de *Staphylococcus* coincide com vários achados na literatura. ROSA, *et al.*, (2009), SOARES *et al.*, (2007) também detectaram a presença do gene *mecA* em SCN, como *S. saprophyticus* e *S. hominis*. Um importante dado observado no presente trabalho foram *Staphylococcus* sp. positivos para o gene *mecA*, sendo que três eram SNC, um *S. aureus*, dois *S. intermedius/pseudointermedius*, um *S. hominis* e um *S. saprophyticus*., de origem humana. Os *Staphylococcus intermedius* (SIG) são compostos por três espécies de bactérias coagulase-positivos que incluem o *S. intermedius*, *S. pseudointermedius* e o *S. delphini*. O *S. pseudointermedius* é um importantes patógenos de pele nos cães, que ocasionalmente provocam infecções zoonóticas graves em seres humanos (KADLEC, 2012;. HATCH *et al*, 2012).

O *S. intermedius* foi identificado em cães, cloaca de aves e seres humanos. Sendo dois *S. intermedius* de origem humana positivos para a presença do gene *mecA*, um dos cães também apresentou *S. delphini*, também positivo para a presença do gene *mecA*, o que compreende o grupo SIG.

De acordo com Penna e cols. (2012) cães, com ou sem infecções tópicas, podem ser colonizados por SCN resistentes à meticilina. No presente trabalho *S. schleiferi* e *S. aureus* (MRSA) de origem animal não foram resistentes à meticilina, mas eles foram descritos por outros outros autores na região do estudo (Guardabassi *et al.*, 2004; Vieira-da-Motta *et al.*, 2001; Aires-de-Sousa *et al.*, 2007), que também demonstraram humanos e cães colonizados por estafilococos multirresistentes.

*Staphylococcus* coagulase-negativo constituem um componente importante da microbiota normal dos seres humanos, cães e gatos, daí serem os micro-organismos mais isolados e que vem apresentando maior resistência aos antimicrobianos (PENNA *et al.*, 2010; LILENBAUM *et al.*, 1998). A colonização nasal dos catadores por esses micro-organismos é um fator que sugere o grande trânsito de micro-organismos nessa população e confirma as precárias condições higiênico-sanitárias. Além de colonizarem a mucosa nasal dos catadores, esses micro-organismos apresentaram o gene *mecA*, o que torna mais agravante esse achado. LOEFFLER *et al.*, 2007 enfatiza a importância da observação do *S.*

*intermedius* tanto em animais quanto em humanos, pois eles vêm se tornando germes multirresistentes, sendo de suma importância seu controle para a Saúde Pública. Em 2007, BANCROFT confirmou a presença do gene *mecA*, prevalente nesta espécie bacteriana, em apenas uma cepa de *S. aureus*, sendo confirmado, portanto, uma cepa de MRSA de origem na comunidade.

Durante entrevista com os catadores para responderem ao questionário, estes relataram não ter contato próximo com pessoas que ficaram por muito tempo hospitalizadas, e também nunca passaram longos períodos de internações em hospitais, porém alguns são colonizados na mucosa nasal por *Staphylococcus* resistentes à meticilina, o que foi comprovado a presença do gene *mecA* através de análise molecular.

Segundo CARZONI (2013), o CA-MRSA tem uma distribuição mundial, mas a sua prevalência varia geograficamente e os surtos podem acontecer por diferentes clones bacterianos. Casos isolados de pequenos surtos causados por diferentes clones foram documentados em muitos países europeus. Além disso, CA-MRSA está se espalhando a partir da comunidade em hospitais, e a incidência de infecções por CA-MRSA em pacientes hospitalizados vem aumentando. Também tem sido relatada colonização por CA-MRSA na pecuária, com potencial de propagação humana (CARZONI, 2013).

Na a população em geral, a colonização por CA-MRSA é tipicamente não complicada, mas também podem causar doenças graves, como fasciíte ou pneumonia necrotizante (CARZONI, 2013).

*Staphylococcus aureus* é uma das principais causas de infecções hospitalares e na comunidade, e tem sido associado com taxas de mortalidade variando de 15,0% a 60,0%. A propagação clonal de cepas MRSA multirresistentes tem sido relatada entre hospitais geograficamente separados, e mesmo entre países diferentes estes clones MRSA pandêmicos já foram identificados. No entanto, apesar do grande conhecimento sobre a disseminação clonal de MRSA, pouco se sabe sobre a epidemiologia molecular das cepas de *Staphylococcus aureus* Sensíveis a Meticilina – MRSA (MUTO *et al.*, 2003)

A presença de bactérias, geneticamente resistentes aos antimicrobianos de primeira escolha, colonizando a mucosa dos catadores de resíduos merece

atenção, sendo necessária a observação de como essas bactérias começaram a colonizar a população em questão. Este resultado demonstra, pela primeira vez, o isolamento de *S. aureus* e SCN resistente à meticilina em trabalhadores pertencentes a esta ocupação na sociedade em geral. Tal fato pode sugerir que estes indivíduos podem ter adquirido esse micro-organismo, com essas características, no local de trabalho, embora tal achado não tenha sido investigado.

### **7.2.2- Enterobacteriaceae**

As enterobacteriaceas apresentaram maior índice de resistência à tetraciclina (47,20%) e à amoxicilina (35,80%).

Os antimicrobianos mais eficazes foram a tobramicina e a cefotaxima, onde nenhuma cepa apresentou resistência, seguindo-se do imipenem que apresentou 98,10% de sensibilidade. Segundo VERONESI (1991), as *Enterobacteriaceae* produzem beta-lactamases de espectro ampliado (ESBL) e essas enzimas podem conferir resistência a todos os beta-lactâmicos menos aos carbapenems. No presente estudo, as bactérias encontradas não apresentaram alto grau de resistência nem aos beta-lactâmicos nem ao carbapenêmicos. Tal perfil de sensibilidade a estes fármacos sugere que as bactérias presentes nesse ambiente não vêm sofrendo grande pressão seletiva e que o ambiente, provavelmente não recebe cargas consideráveis de resíduos destas drogas.

A resistência cruzada com amicacina foi um evento menos comum. Este aminoglicosídeo apresentou a melhor sensibilidade (92,40%) depois do imipenem, resultado compatível com o encontrado por outros autores (NOGUEIRA, 2005), porém, devido à sua elevada toxicidade, seu uso é bastante restrito, sendo os carbapenêmicos as drogas de escolha para infecções causadas por bactérias produtoras de ESBL (NOGUEIRA, 2005).

As amostras isoladas neste trabalho apresentaram baixa resistência às cefalosporinas de segunda e terceira geração que foram testadas. O anel beta-lactâmico das cefalosporinas difere um pouco daquele das penicilinas, porém as bactérias já desenvolveram beta-lactamases que são capazes de inativá-lo. O

agrupamento diferencial das cefalosporinas é mais comumente feito referente às gerações do medicamento, o que reflete seu contínuo desenvolvimento (PRAXEDES, 2012). Segundo VERONESI, 1991 os fármacos de 2ª geração são mais ativos contra seletos organismos Gram-negativos, como *Klebsiella* spp., *E. coli* e *Proteus* spp. A cefoxitina é ativa contra bactérias anaeróbias. Os fármacos de 3ª geração, como a ceftriaxona e ceftazidima são mais ativos contra bactérias Gram-negativas, neste estudo as cepas isoladas apresentaram significativa sensibilidade a esses fármacos, indo de encontro à afirmação do autor.

As aminopenicilinas (ampicilina e amoxicilina) foram desenvolvidas devido à necessidade de antimicrobianos com atividade contra bactérias Gram-negativas. As aminopenicilinas inicialmente foram efetivas contra *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *Shigella* spp., *Salmonella* spp., *Hemophilus* spp. e *Neisseria* spp. Algumas bactérias Gram-negativas, incluindo as *Enterobacteriaceae* são resistentes à penicilina devido à produção de beta-lactamase. Os inibidores de beta-lactamase (ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam) inibem um grupo de beta-lactamases de bactérias resistentes. Estes inibidores estão disponíveis como combinações de amoxicilina-clavulanato, ampicilina-sulbactam, ticarcilina-clavulanato e piperacilina-tazobactam (PRAXEDES, 2012).

Este autor também observou que todos os isolados, da microbiota de aves, apresentaram resistência a dois ou mais antimicrobianos com diferentes perfis às diferentes classes de medicamentos.

### **7.2.3- Bastonetes GRAM negativos não fermentadores**

Os bastonetes Gram-negativos não fermentadores apresentaram 100% de resistência à amoxicilina, comprovando a resistência natural a certas classes de antimicrobianos, como é o caso da resistência às penicilinas e aos beta-lactâmicos (VERONESI, 1991).

Os carbapenens têm boa ação sobre esses micro-organismos, principalmente o imipenem e o meropenem, porém com seu amplo uso na medicina algumas cepas já vêm apresentando resistência a esses antibióticos.

Na pesquisa não foi observada resistência significativa aos antimicrobianos em nenhuma cepa de bastonete Gram negativo não fermentador, inclusive nas *Pseudomonas* spp. e no *Acinetobacter baumannii*, que apresentam naturalmente resistência a algumas classes de antimicrobianos. GUARDABASSI & DALSGAARD (1999), após análise de uma estação de tratamento de esgotos não observaram uma prevalência significativa de *Acinetobacter* spp. resistente a antibióticos no esgoto bruto e nem no esgoto tratado, resultado semelhante ao encontrado no presente trabalho, onde as cepas de *Acinetobacter* não apresentaram multirresistência.

A colonização e as infecções bacterianas representam um dos maiores desafios para a humanidade devido à complexa problemática da resistência microbiana. Estudos epidemiológicos desenvolvidos por sociedades científicas, órgãos governamentais e grupos de pesquisa têm mostrado a relevância do conhecimento dos diversos parâmetros relacionados às chamadas infecções comunitárias e hospitalares, entre as quais a topografia dos processos, a faixa etária dos pacientes, a presença de comorbidades, internações (características das Instituições e tempo de internação, utilização de unidades de terapia intensiva e procedimentos invasivos), uso de antimicrobianos (profilático e terapêutico) e finalmente a disponibilidade e qualidade do suporte microbiológico (incluindo micro-organismos prevalentes e perfis de susceptibilidade aos antimicrobianos).

Contudo, no Brasil, a informalidade das discussões, pela carência de dados objetivos, cientificamente sustentados, tem estimulado o empirismo terapêutico e contribuído pouco para minimizar os problemas e retardar a resistência microbiana. Cabe a cada indivíduo contribuir para o conhecimento da sua realidade e buscar novas estratégias para que, de forma direta ou indireta, possa contribuir para uma melhor qualidade de vida e, até mesmo, a sobrevivência de muitos.

## 8- Conclusão

- Foram isoladas e identificadas bactérias de caráter patogênico, o que põe em risco a população que habita e trabalha no local onde a pesquisa foi desenvolvida.
- Sete cepas de *Staphylococcus* spp. de origem humana foram positivas para o gene *mecA*, e quatro cepas de origem animal também foram positivas para o gene *mecA*, o que tornam essas cepas mais perigosas, necessitando-se de mais pesquisas nas bactérias presentes naquele ambiente e também nas bactérias que colonizam os trabalhadores e animais que lá frequentam.
- Primeiro caso de *S. lentus* e *S. delphini* positivos para o gene *mecA* isolados da mucosa nasal de cães.
- A maioria das bactérias não apresentou perfil de resistência significativo aos antimicrobianos testados, sendo as penicilinas e tetraciclinas os menos eficazes.

## **9- Considerações finais**

É necessário investigar como os catadores e os animais se tornaram colonizados por cepas resistentes. Seria interessante também avaliar o grau de contaminação do local, através de análise da água da lagoa, e da água subterrânea, e assim quantificar os danos causados aquele ambiente e os riscos que a população corre.

O resultado deste estudo também enfatiza a importância dos programas de vigilância de resistência bacteriana aos antimicrobianos na orientação terapêutica empírica e, também, a importância da implementação de medidas de controle de infecção e racionalização do uso de antimicrobianos para evitar, ou ao menos desacelerar a disseminação de resistência aos antimicrobianos. 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 à 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.

É importante a realização de palestras explicativas e campanhas para a população explicando os riscos da utilização indiscriminada de antimicrobianos, a necessidade de utilização de EPI's durante a coleta de materiais recicláveis e também a importância dos hábitos de higiene pessoal.

Com relação à contaminação ambiental é necessário estudos para avaliar o grau de contaminação para serem tomadas medidas que diminuam os danos causados pela presença do aterro controlado, pois como não existe o tratamento do chorume, as águas subterrâneas são contaminadas, assim como todo aquele ambiente ao redor.

## 10- Referências

AIRES-DE-SOUSA M, PARENTE CE, VIEIRA-DA-MOTTA O, BONNA IC, SILVA DA, DE LENCASTRE H. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from buffalo, bovine, ovine, and caprine milk samples collected in Rio de Janeiro State, Brazil. **Appl Enviromental Microbiology**. V.73, nº12, p.3845-9, 2007.

AL-MUZAINI, S.; BEG, M.U.; MUSLMANI, K. Characterization of landfill leachates at waste disposal site in Kuwait. **Environmental International**. V. 21, nº4, p.399-405,1995.

AZEVEDO, A. C., DALMOLIN, R. S. D. **Solos e Ambiente: uma introdução**. Santa Maria: Ed Pallotti, 2004. 100 p.

BANCROFT, E.A. Antimicrobial Resistance It's Not Just for Hospitals. **The Journal of the American Medical Association**. V.298, nº 15, p.1083-4, 2007

BARROS, R.T.V.; **Resíduos Sólidos**. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, 1996.

BASTOS, R.K.X.;BEVILACQUA, P.D.; NASCIMENTO, E.L.;CARVALHO, M.R.G.; SILVA, V.C. II-057-Coliformes como indicadores da qualidade da água: alcance e limitações. In: Congresso Interamericano de Engenharia Sanitária E Ambiental, 27, 2000. Porto Alegre. **Anais**. Rio Grande do Sul: Associação Brasileira de Engenharia Sanitária Ambiental, 2000.

BAUER, A.; PERRY, D.; KIRBY W. Drug usage and antibiotic susceptibility of staphylococci. **The Journal of the American Medical Association**. V. 173, nº5, p.475-480, 1960.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Curso Básico de Controle de Infecção Hospitalar. Caderno C- Métodos de Proteção Anti-infecciosa. Brasília, 2000, p.103.

BURTON, G. R. W. & ENGELKIRK, P. G. Microbiologia para as ciências da saúde. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. ISBN: 85-277-1031-5.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Antimicrobial Resistance Among Surgical Patients. Disponível em: <[www.cdc.gov](http://www.cdc.gov)> Acesso em: 04 de fev. de 2012.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Disponível em: <<http://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/public-health-action-plan-combat-antimicrobial-resistance.pdf>> Acesso em: 08 de mai de 2012.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Emerging Infectious Diseases. Disponível em: <[www.cdc.gov/eid](http://www.cdc.gov/eid)>.V. 11, n. 6, p.988-989, 2007. Acesso em: 23 de fev. de 2012.

CHAMBERS, H. F. Methicilin resistance in Staphilococi: molecular and biochemical basais and Clinical implications. **Clinical Microbiology Reviews**, V.10, nº4, p.0781-791, 1997.

CHILDS, J.; SHOPE, E.R.; FISH, D.;MESLIN, X.F.; PETERS, J.C.; JOHNSON, K.; DEBESS E., DENNIS, D., JENKINS, S. Emerging Zoonoses. **Emerging Infectious Diseaes**. V.4, nº3, p.453-456, 1998.

CHRISTENSEN, T.; KJELDSSEN, P.; BJERG, P.L.; JENSEN, D.L.; CHRISTENSEN, J.B.; BAUN, A.; ALBRECHTSEN, H.; HERON, G. Biogeochemistry of landfill leachate plumes. **Applied Geochemistry**. V. 16, nº7, p.659-718, 2001.

CLSI - Clinical Laboratory Standards Institute. . Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-second informational supplement (M100-S22). Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania, USA; V. 32, nº 3, 2012.

COCHRAN, W. G. Técnicas de amostragem. Rio de Janeiro. Fundo de Cultura, 1955, 555p.

CONLY J.; Antimicrobial resistance in Canada. **Canadian Medical Association Journal**. V.167, nº8, p.885-891, 2002.

CRAIG W. A.; **Antibacterial Therapy**. In; Goldman & Ausiell, editor. Cecil Textbook of Medicine. 22 ed. Saunders: Copyright; 2004. p. 1853-926.

CUSSIOL, A. M. C.; Disposição Final de Resíduos Potencialmente Infectantes de Serviços de Saúde em Célula Especial e por Co-Disposição com Resíduos Sólidos Urbanos. Tese (doutorado). Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental. Belo Horizonte 2005, 334p.

DAVIS, J. S. Management of bone and joint infections due to *Staphylococcus aureus*. **International Medicine Journal**. V. 35, p.79S-96S, 2005.

DEPIZZOL, F.; Avaliação da resistência a antibióticos em isolados de *Escherichia coli* provenientes de esgoto hospitalar e sanitário. Dissertação (mestrado). Universidade Federal do Espírito Santo-Vitória-ES. UFES. 2006.

DOYLE, M. P., BEUCHAT, L. R., MONTVILLE, T. J., **Food Microbiology-Fundamentals and Frontiers**. 2 ed. ASM Press, Washington, DC, 2001.

EIFF, C.V.; BECKER, K.; MACHKA, K.; STAMMER, H.; PETERS, G.; Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. **The New England Journal of Medicine**. V. 344, nº1, p.11-16, 2001.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2008. 182p.

FRIDKIN S. K.; LAWTON R.; EDWARDS J. R.; TENOVER F. C.; MCGOWAN J. E.; Jr., GAYNES R. P.; Monitoring antimicrobial use and resistance: comparison with a national benchmark on reducing vancomycin use and vancomycin-resistant enterococci. **Emerging Infectious Diseases**. V.8, nº7, p.702-707, 2002.

FUCHS F. D.; Princípios Gerais do Uso de Antimicrobianos. In: FUCHS F.; WANNAMACHER L.; FERREIRA M.; editors. **Farmacologia Clínica-Fundamentos da terapêutica Racional**. 3ª ed. Rio de Janeiro, 2004: Guanabara Koogan; p.342, 2004.

GARCIA LP, ZANETTI-RAMOS BG. Gerenciamento dos resíduos de serviços de saúde: uma questão de biossegurança. **Caderno de Saúde Pública**. V. 20, nº3, p.744-52, 2004.

GARZONI, C.; VERGIDIS, P. Methicilin-Resistant, Vancomycin-Intermediate and Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections in Solid Organ Transplantation. **American Journal of Transplantation**. V. 13, p.50-58, 2013.

GOLDMANN D.A.; HUSKINS W.C. Control of nosocomial antimicrobial-resistant bacteria: a strategic priority for hospitals worldwide. **Clinical Infectious Diseases**. V. 24, nº1, p.139-145, 1997.

GOOGLE MAPS, Disponível em:

<[http://maps.google.com.br/maps?hl=ptBR&q=campos%20dos%20goytacazes&bv=on.2,or.r\\_gc.r\\_pw.,cf.osb&biw=1152&bih=620&um=1&ie=UTF8&sa=N&tab=wl](http://maps.google.com.br/maps?hl=ptBR&q=campos%20dos%20goytacazes&bv=on.2,or.r_gc.r_pw.,cf.osb&biw=1152&bih=620&um=1&ie=UTF8&sa=N&tab=wl)

> Acesso em: 28 de mar. de 2012.

GUARDABASSI L, DALSGAARD A, OLSEN JE. Phenotypic characterization and antibiotic resistance of *Acinetobacter* spp. isolated from aquatic sources. **Journal of Applied Microbiology**, V.87,p.659–67, 1999.

HATCH, S., Sree, A., Tirrell, S., Torres, B., Rothman, A.L.. Metastatic complications from *Staphylococcus intermedius*, a zoonotic pathogen. J. Clin. Microbiol., V.50, nº3,p. 1099–1101, 2012.

HARBARTH, S.; HARRIS, A.D.; CARMELI, Y.; SAMORE, M. H.; Parallel analysis of individual and aggregated data on antibiotic exposure and resistance in gram-negative bacilli. **Clinical Infectious Diseases**. V.33, nº9, p.1462-1468, 2001.

HARNISZ, M. Total resistance of native bacteria as an indicator of changes in the water environment. **Journal of Environmental Pollution**. V. 174, p.85-92, 2013.

HOLDEN, M. T. G.; HSU, L.Y., KURT, K., *et al.*; A genomic portrait of the emergence, evolution and global spread of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* pandemic. **Journal Genome Research**. p.1-49, 2013

HOLT, G.J., KRIEGER, R.N., SNEATH, A.H.P., STALEY, T.J. **BERGEY'S Manual of Determinative Bacteriology**. 9 ed. Ed: Williams & Wilkins, V.2, 1994.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICAS–IBGE. Programa Nacional de Saneamento Básico-2008. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em 13 de fev. de 2012.

JACOBY, T. S. Associação entre Consumo de Antimicrobianos e Multirresistência Bacteriana em Centro de Terapia Intensiva de Hospital Universitário Brasileiro. Dissertação (mestrado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRS, Ciências Médicas. Porto Alegre, 2008, 108p.

JANDA, J.M.; ABBOTT, T.S. L. The genus *Hafnia*: from soup to nuts. **Clinical Microbiology Reviews**, V.19, nº1, p.12-18, 2006.

JAY, J. **Microbiologia moderna de los alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1992. 804p.

KAYE, K.S.; ENGEMANN, J.J.; FRAIMOW, H.S.; ABRUTYN, E. Pathogens resistant to antimicrobial agents: epidemiology, molecular mechanisms, and clinical management. **Infectious Diseases Clinical of North America**. V.18, p. 467-511, 2004.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W.M.; SCHERECKENBERGER, P.C.; WINN JR, W. C.; PROCOP, G. W.; WOODS, G.L. **Diagnóstico Microbiológico**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

LANCELLOTTI, M. Estudo epidemiológico de Staphylococcus spp. em ambientes, água e portadores sadios e determinação da sensibilidade a antimicrobianos. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias Campus Jaboticabal 2006. 108p.

LIBÂNIO, P.A.C.; A avaliação da Eficiência e Aplicabilidade de um Sistema Integrado de Tratamento de Resíduos Sólidos Urbanos e de Chorume. Dissertação (mestrado). Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos. Belo Horizonte, 2002, 175p.

LICHTVEL, D.; RODENBECK, S.G.; LYBARGER, J.A. **The public health implication of medical waste: a report to Congress**. Atlanta: Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 1990.

LILENBAUM, W.; NUNES E.; AZEVEDO M.A. I. . Prevalence and antimicrobial susceptibility of staphylococci isolated from the skin surface of clinical normal cats. **Lett Appl Microbiol** 1998, V. 28, p.448–452.

LIM S.M.; WEBB S.A.; Nasocomial bacteria infections in Intensive Care Units. In: Organisms and mechanisms of antibiotic resistance. **Anaesthesia**. V. 60, nº9, p.887-902, 2005.

LIMA, L.M.Q. **Lixo -Tratamento e Bio-remediação**, São Paulo - Hemus Editora Ltda, 1995.

LO, I.M. Characteristics and treatment of leachates from domestic landfills. **Environment International**. V. 22, nº 4, p. 433-442, 1996.

LOEFFLER, A.; LINEK, M.; MOODLEY, A.;, GUARDABASSI, L.; SUNG, J. M.; WINKLER, M.; REINHARD WEISS, R.; LLOYD, D. H.; Blackwell Publishing Ltd First report of multiresistant, *mecA*-positive *Staphylococcus intermedius* in Europe: 12 cases from a veterinary dermatology referral clinic in Germany. p. 412-421, 2007.

MARTINEZ, J.L. Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. **Environmental Pollution** V. 157, p.2893–2902, 2009.

MEHROTRA, M.; WANG, G.; JOHNSON, W.M. Multiplex PCR for Detection of Genes for *Staphylococcus aureus* Enterotoxins, Exfoliative Toxins, Toxic Shock Syndrome Toxin 1, and Methicillin Resistance. **Journal of Clinical Microbiology**, V. 38, nº 3, p.1032–1035, 2000.

MENEZES, E. A.; ALENCAR, A. M.; CUNHA, F. A.; ANGELO, M.R.F.; SALVIANO, M.N.C.; OLIVEIRA, I.R.N. Frequência de cepas produtoras de enzima beta lactamase de espectro expandido (ESBL) e perfil de susceptibilidade de *Klebsiella pneumoniae* em hemo-culturas no berçário de um hospital em Fortaleza. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, V. 40, nº 1, p7-11, 2008.

MERCK. Manual Merck de Informação média. São Paulo: Roca, 2010, 1944p. Disponível em: [http:// www.manualmerck.net/](http://www.manualmerck.net/) Acesso em: 20 de janeiro de 2012.

MOREIRA,D.D.O.; MORAIS, V.; VIEIRA-DA-MOTTA, O, CAMPOS FARINHA, A. E. C.; TONHASCA JR, A. Ants as carriers os antibiotic-Resistant Bacteria in Hospitals. *Neotropical Entomology* V. 34, nº6, p.999-1006, 2005.

MURRAY, P. R.; ROSEBTHAL, K.S.; KOBAYASHI, G. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara KOOGAN., 2000.

MURTHY R.; Implementation of strategies to control antimicrobial resistance. **Chest Journal**. V.119, nº 2, p.405-411, 2001.

MUTO C.A.; JERNIGAN J.A.; OSTROWSKY B.E.; RICHET H.M.; JARVIS W.R.; BOYCE J.M.; *et al.*, SHEA guideline for preventing nosocomial transmission of multidrug-resistant strains of *Staphylococcus aureus* and *enterococcus*. **Infectious Control Hospital Epidemiology**. V.24, nº 5, p. 362-86, 2003.

NASCIMENTO, T.C.; Caracterização Fenotípica, susceptibilidade a antimicrobianos e pesquisa do gene *mecA* em linhagens de *Staphylococcus coagulase negativo* recuperadas de resíduos dos serviços de saúde. Dissertação (mestrado). Universidade Federal de Juiz de Fora. Juiz de Fora-MG, 2009, 76p.

NASCIMENTO, T.C.; JANUZZI, W.A.; LEONEL, M. LEONEL, M.; SILVA, V.L.; DINIZ, C.G. Ocorrência de bactérias clinicamente relevantes nos resíduos de serviços de saúde em um aterro sanitário brasileiro e perfil de susceptibilidade a antimicrobianos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. V. 42, nº 4, p. 415-419, 2009.

NOGUEIRA, K. S.; Ocorrência de Beta-lactamases de Espectro Ampliado em Enterobactérias Isoladas em dois Hospitais Universitários. Dissertação (mestrado). Universidade Federal do Paraná. Curitiba-PR, 1995. 100p.

NOVO, A.; ANDRÉ, S.; VIANA,P.; NUNES, O.C.; MANAIA, C.N.O. Antibiotic resistance, antimicrobial residues and bacterial community composition in urban wastewater, **Water Research**. V. p 10.1016. 2013.

NWABUEZE, A.A.; Water quality and micro-organisms of leachate-contaminated pond; **American Journal of Scientific and Industrial Research**. V. 2, nº 2, p. 205-208, 2011.

OBIRE, O; AGUDA, M. Bacterial Community of Leachate from a Waste-Dump and an Adjacent Stream. **Journal of Applied Sciences & Environmental Management**, V. 6, nº 2, p. 71-75, 2002.

PACHECO R.J.; Estudo de Certas Potencialidades de Processos Oxidativos Avançados para o Tratamento de Percolado de Aterro Sanitário; Dissertação (mestrado); Departamento de Ciências Exatas. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, UFP, 2004. 97 p.

PATRICK D.M.; MARRA F.; HUTCHINSON J.; MONNET D.L.; NG H.; BOWIE W. R.; Per capita antibiotic consumption: how does a North American jurisdiction compare with Europe. **Clinical Infectious Diseases**. V.39, n.º1, p.11-7, 2004.

PENNA, B.; VARGES,R.; MARTINS R., MARTINS, G. Walter LILENBAUM, W. In vitro antimicrobial resistance of staphylococci isolated from canine urinary tract infection, **CVJ**, V. 51, 2010.

PESSOA, I. C.; Perfil de resistência a antimicrobianos de bactérias isoladas de amostras de água das escolas estaduais de Boa Vista-RR. Dissertação (mestrado); Universidade Federal de Roraima, Boa Vista-RR, UFRR, 2011, 101p.

PETERSON, D. L. Resistance in gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae. **American Journal of Medicine**, V. 34, nº 5, p20-28, 2006.

PONTES, L. A. E. Prevalência de *Staphylococcus* spp. resistentes a drogas em humanos, animais a ambiente hospitalar, em comunidades carentes de Campos Dos Goytacazes/ RJ, No Período de 2006-2008. Dissertação (mestrado). Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Campos dos Goytacazes-RJ. UENF. 2009.100p.

PRAXEDES, C. I. S. Avaliação da sensibilidade de *Enterobacteriaceae* da microbiota intestinal de frangos de corte submetidos à dieta com nitrofuranos. Tese (doutorado). Universidade Federal Fluminense-UFF, Niterói 2012, 123p.

QUINN, P.; MARKEY, B.; LEONARD, F.C.; FIZTPATRICK, E.S.; FANNING, S.; HARTIGAN, P.J. **Veterinary Microbiology and Microbial Diseases**. 2ed. Wiley-Blackwell Scienc, 1231p., 2011.

REAGAN, D. R. *et al.* Elimination of coincident *S. aureus* nasal and hand carriage with intranasal application of mupiricin calcium ointment. **Annals of Internal Medicine Journal**, V. 114, p.101-6, 1991.

REDEL, H.; GAO, Z.; LI, H.; ALESKSEYENKO, A.V.; ZHOU, Y.; PREZ-PREZE, G.I.; WEINSTOCK, G.; SODREGREN, E.; BLASER, M.J.; Quantitation and composition of cutaneous microbiota in diabetic and nondiabetic men. **Jornal of Infectious Diseases**. 2013.

ROSA, J. O.; MOURA J. P. ; PALOS; M A. P.; GIR, E.; REIS, C., KIPNIS, A.; CANINI, S. R. M. S.; BELISSIMO, F.; PIMENTA, RODRIGUES, FABIANA, C.; Detecção do gene *mecA* em estafilococos coagulase negativa resistentes à oxacilina isolados da saliva de profissionais da enfermagem. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, V. 42, nº 4, p.398-403, 2009.

SANTOS, A. L.; SANTOS, D. O.; FREITAS, C. C.; FERREIRA, B. L. A.; AFONSO, I. F.; RODRIGUES, C. R.; CASTRO, H. C.; *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia Médica e Laboratorial**. V. 43; p.413-423, 2007.

SHLAES D.M.; GERDING D.N.; JOHN J.F.; CRAIG W.A.; BORNSTEIN D.L.; DUNCAN R. A.; *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 hospitals. **Clinical Infectious Diseases**. V.25, nº.3, p.584-99, 1997.

SILBERGE L.D. Jr., E.K.; GRAHAM, J.; PRICE, L.B. Industrial Food Animal Production, Antimicrobial Resistance, and Human Health. **Annual Reviews of Public Health**. V.29, p.151-169, 2008.

SOUZA, L.B.G., FIGUEIREDO, B.B. Prevalence of Nosocomiais Infections Provoked by Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (M.R.S.A.), in the Regional University Hospital of Maringá. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**. V. 40, nº 1, p.31-34, 2008.

SOUZA, M.S.; REIS, C.; PIMENTA, F.C. Revisão sobre a aquisição gradual de resistência de *Staphylococcus aureus* aos antimicrobianos. **Revista de Patologia Tropical**. V. 34; nº 1; p.27-36, 2005.

TAKAYANAGUI, A.M.M.; *Trabalhadores de Saúde e Meio Ambiente: ação educativa do enfermeiro na conscientização para gerenciamento de resíduos sólidos*. Tese (doutorado); Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, USP, 1993, 179p.

TAVARES W.; Resistência Bacteriana. In: TAVARES W.; editor. **Manual de Antibióticos e Quimioterápicos Anti-infecciosos**. 3ª Ed. São Paulo: Atheneu; 2002. p. 55-144.

TENOVER F.C.; Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. **American Journal of Infectious Control**. V. 34, nº 5, p. 3-10, 2006.

TONUCI L.S.R.L. Desinfecção de Resíduos de Serviço de Saúde por Aquecimento Dielétrico do Tipo Micro-ondas. Dissertação (mestrado). Setor de Tecnologia Ambiental. Universidade de Ribeirão Preto, UNAERP, São Paulo. 2006. 108p.

TRABULSI, L.R. *et al.*; **MICROBIOLOGIA**. In: Microbiologia. 4ª ed. São Paulo: Atheneum, 2004.

VERONESI, R. **Doenças infecciosas e parasitárias**. 8.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. 1082 p.

VIDAILLAC, C.; GARDETE, S.; TEWHEY, R.; SAKOULAS, G.; KAATZ, G. W.; ROSE, W. E.; TOMASZ, A.; RYBAK, M. J. Alternative mutational pathways to vancomycin-intermediate resistance in methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Infectious Diseases Advance**. p.1-27, 2013.

VIEIRA-DA-MOTTA, O., FOLLY, M.M., SAKYIAMA, C.C.H. Detection of different *Staphylococcus aureus* strains in bovine milk from subclinical mastitis using PCR and routine techniques. **Brazilian Journal of Microbiology**. V.32, p.27-31, 2001.

VILELA, A. P. O. Prevalência Anual e Perfil de Susceptibilidade de Microrganismos Isolados de Infecções Comunitárias e Nosocomiais em Hospital Particular de Belo Horizonte – MG. TCC (Especialização). Universidade Federal de Minas Gerais , UFMG , Belo Horizonte, 2009.

XIMENES, F.H.B., VIEIRA-DA-MOTTA, O. CARVALHO, W.M., BRANCO, A.T., TEIXEIRA, G.N. Susceptibilidade a Antimicrobianos de Isolados de *Staphylococcus* spp. oriundos de lesões cutâneas e otite de animais domésticos em Campos dos Goytacazes-RJ. Revista da Universidade Rural. V.27, p. 203-205, 2007.

## 11- APÊNDICE I

### I- Artigo Submetido

#### **Antimicrobial Resistance Profile of Pathogenic Bacteria Isolated from Leachate, Waste Pickers and Animals from an Open-Dumping Landfill in Rio de Janeiro State, Brazil**

Maria Luiza Ribeiro da Costa Serafim, Marina Cristina Blume, Maria Fabíola Nunes Rangel, Renata Lins da Costa, Eduardo Shimoda, Olney Vieira-da-Motta

#### **Abstract**

Landfills are often designed to prevent liquid from leaching out and entering the environment, however, if not properly managed, the leachate is at risk for mixing with groundwater near the site, with dire effects. Pathogenic bacteria were investigated from leachate, human and animal samples from an open-dumping landfill in the northeast region of Rio de Janeiro state, Brazil. Samples of leachate were collected within four periods in three points during one year, together with samples of selected waste pickers and animals to investigate the profile of microorganism's antimicrobial resistance (AR) toward 11 antibiotics on each category, by using disk diffusion method. From Gram-negative the most prevalent were *Enterobacter* spp., *Proteus* spp., *Escherichia coli*, and *Morganella morganii*. In general, among Enterobacteriaceae the most resistant species were *Enterobacter* spp. and *Proteus* spp. and cefoxitin, amoxicillin, and tetracycline were the less active drugs. Meanwhile, among staphylococci amoxicillin, penicillin, and ampicillin were the less efficient drugs. For non-fermenting Gram-negative bacteria (NFGNB) *Pseudomonas* spp. were the most resistant specimens and amoxicillin was the less active drug. Staphylococci were isolated only from human and animals, with AR investigation extended to molecular analyses for the presence of *mecA* gene. From 28 nasal human samples, 26 staphylococci were isolated with eight samples oxacillin-resistant where coagulase-negative(2), *S. intermedius*(2), *S. hominis*(1), *S. saprophyticus*(1), and *S. aureus*(1) resulted positive by PCR. From 21 staphylococci samples [nasal(15), oral(1) cloaca (5)] of animals, four were oxacillin-resistant and all PCR-positive with 3 CNS (one *S. lentus*), and one *S. delphini*. The source of MRSA from human origin needs further

investigation and this is the first isolation of *S. lentus* and *S. delphini* from dog presenting *mecA* gene in Brazil. So far, no data on drug resistance profile of pathogenic bacteria are available from human and animals from landfills, which denotes a risk factor for the community.

Keywords: zoonosis, environment; hazardous material; health public; MRSA; PCR; antimicrobial multi-resistance; coagulase-negative staphylococci.

## Introduction

Waste dumping from human activity can be a solution or a problem to governments in order to find the ways to ameliorate the consequences involving human waste in all sort of material dumped in landfills, and leachate is one of the final products, especially in developing countries (Obire and Aguda, 2002). According to IBGE (2008), a Brazilian government instrument to investigate several social-economic data, landfills can be classified in different categories, from rudimentary to modern landfills. The period of permanence of material in the environment depends on their characteristics and may remain for decades until total degradation and assimilation into soil which depend essentially upon the metanogenic and acetogenic bacteria (Al-Muzaini et al., 1995). The leachates can be treated, also according to their characteristics and can keep flowing for decades after stopping garbage dumping (Lo, 1996). Although disposal of unprocessed medical waste to landfills is prohibited, it is still hard to evaluate their composition irregular contents (i.e. hospital disposal) can be found, consequently an emerging problem is expected, such as resistant microbiota development. Drugs residues in manure soil and resistance gene transfer among microorganisms were investigated (Heuer and Smalla, 2007 Heuer et al., 2010), but scarce data is available on ecological toxicity of antibiotics (Thiele- Bruhn, 2003) and in this case it is necessary to address any adverse effects of such a material and many others in the environment (Ritter et al., 2002; Thomas et al, 2009). However, human and animal somehow may be affected since the antibiotics and resistant organisms may be transferred to and accumulate in the food chain, and interfere in the success of pharmacotherapy by reducing drug effectiveness (Rhodes et al., 2000; Kumar et al., 2005). Recently, *Staphylococcus*

*aureus* methicillin resistant (MRSA), a very important and aggressive bacteria, was isolated from different sources of water (Goodwin et al., 2012; Goldstein et al., 2012) and staphylococci species have also been isolated from leachate (Obire and Aguda, 2002), besides its known that wastewater can also provide favorable conditions for the growth of a diverse bacterial community, which constitutes a basis for the selection and spread of antibiotic resistance. Gene mutation in some microorganisms result in drug resistance and other antibiotic-susceptible bacteria can receive such a genes via plasmids from resistant bacteria and incorporate them into their own chromosomes (Josephson, 2006).

Since previous data showed the prevalence of resistant-staphylococci from different production animal species in the region studied, among them multiresistant *S. aureus* and CNS strains, one can speculate a possible antibiotic-resistant bacteria environmental dissemination (Aires-de-Sousa et al., 2007; Bonna et al., 2007; Vieira-da-Motta et al. 2001). *S. aureus* is responsible for several diseases in human and animals (Balaban et al, 2001), and a source of dissemination among human in the community or transferred to animals (MORGAN, 2008). Gram-negative species are common water transmitted bacteria, and several species were isolated from landfills (Obire and Aguda, 2002). For sulfonamides, different resistant genes could be isolated from *Escherichia coli* found in pigs and even in humans also indicating a possible transfer via the food chain (Infante et al., 2005; Hammerum et al., 2006). Especially in environments influenced by agriculture an increased occurrence of antibiotic-related genes was detected (Heuer et al., 2010; Pruden et al., 2006). However, substances found in non-waste leachates can cause damage to MRSA membrane cells, but on *E. coli* cells the structural membrane integrity was retained, showing that antimicrobial mechanisms of aqueous leachate on microorganisms can vary according to their composition (Otto et al., 2010). Several pathogenic and opportunistic bacteria were isolated from leachate in Mexico, most of them enteric bacteria (Flores-Tena, et al., 2007).

For the first time in Brazil, this investigation studied the antimicrobial multiresistance of pathogenic bacteria isolated from leachate, workers, also known

as waste pickers, and their domestic animals, and somehow to contribute for mitigation and improvement of working conditions at this hostile site.

### **Material and methods**

The total number per volume or area of microorganisms were not quantified in the present work, and three sources were investigated: leachate, animal and nasal human samples. It also worth it mentions that agreement of people to participate the survey is not an easy task among waste pickers. The leachate's samples were collected from four previously designated sites in the open-dumping landfill, each one representing the two different occasion of the year, dry and raining seasons. The first collection (dry) was performed in July 11<sup>th</sup>, the second (end of dry) in November 3<sup>rd</sup>, and the third (beginning rain) in December 2<sup>nd</sup> of 2011, finally the 4<sup>th</sup> sample (end of rain) was collected in February 29<sup>th</sup> of 2012. With an automated device all leachate samples (2 mL) were collected by using sterile conventional 20mL glass pipette, and transferred to sterile tubes. Samples were collected from 14 animals, consisting of nasal cavity from 10 dogs, oral cavity from one cat, and cloacal from three birds with Cary-Blair media suabs (Copan, Italy). Health condition of all animals investigated was regarded as satisfactory, after clinical evaluation carried out by veterinarians. From 28 waste pickers were collected nasal samples by using Cary-Blair media suabs (Copan, Italy). Microorganisms were classified by a miniaturized kit (Api ID32 Staph, Api 20E, Api 32GN Biomeriéux, France) with an automated system MiniApi   (Biomeriéux, France), according to manufacturer's instructions.

To identify members of Enterobacteriaceae non-fermenter microorganisms, the ANVISA (Brazilian National Sanitary and Surveillance Agency) directions were followed, complemented by methodology used by Holt et al. (1994). From staphylococci strains that showed antibiotic resistance, especially toward oxacillin on disk diffusion test, genotyping by PCR analyses was performed by methodology used by others (Mehrotra et al., 2000).

### **Antimicrobial susceptibility tests.**

Susceptibility tests were performed by the disk diffusion method for penicillin, oxacillin, cephalothin, cefoxitin, trimethoprim- sulfamethoxazole, clindamycin, erythromycin, gentamicin, and tetracycline according to the

guidelines of the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012) and preconized methodology of ANVISA (2008) and others (Aires-de-Sousa et al., 2007). For Enterobacteriaceae the drugs used were amikacin (AMI, 30µg), amoxicillin (AMO, 10µg), aztreonam (ATM, 30µg), cefotaxin (CTX, 30µg), ceftriaxone (CRO, 30µg), ceftiofene (CFO, 30µg), gentamicin (GEN, 10µg), imipenem (IPM, 10µg), meropenem (MER, 10µg), tetracycline (TET, 30µg), tobramycin (TOB, 10µg). For GNNFB amikacin (AMI, 30µg), amoxicillin (AMO, 10µg), aztreonam (ATM, 30µg), cefepime (CPM, 30µg), cefotaxin (CTX, 30µg), ceftriaxone (CRO, 30µg), gentamicin (GEN, 10µg), imipenem (IPM, 10µg), meropenem (MER, 10µg), tetracycline (TET, 30µg), tobramycin (TOB, 10µg); and for Staphylococci the drugs used were amoxicillin (AMO, 10µg), ampicillin (AMP), 10µg, cefalotina (CFL, 30µg), clindamycin (CLI, 2µg), erythromycin (ERI, 15µg), gentamicin (GEN, 10µg), oxacillin (OXA, 1µg), penicillin G (PEN,10U), sulfazotrim (SUL, 25µg), tetracycline (TET, 30µg), vancomycin (VAN, 30µg).

## Results

A total of 187 specimens of microorganisms were isolated from all sources investigated, including leachate, human and animals. Tables 1, 2, and 3 show the microorganisms from each source, according to their classification.

**Table 1: *Staphylococcus* spp. isolated from different sources related to open-dumping landfill, in Rio de Janeiro State, Brazil.**

| Origin of Sample         |                        |                      |               |                |
|--------------------------|------------------------|----------------------|---------------|----------------|
| Microorganisms<br>(n=47) | Humans<br>(21 strains) | Animals (21 strains) |               |                |
|                          |                        | Dog/Nasal            | Cat/Oral      | Birds /Cloaca  |
| <i>S. aureus</i>         | (3/26) strains         | (2/21) strains       |               |                |
| <i>S. capitis</i>        | (1/21) strain          | -                    | -             | -              |
| <i>S. delphini</i>       | -                      | (1/21) strain        | -             | -              |
| <i>S. epidermidis</i>    | (1/26) strain          | -                    | -             | -              |
| <i>S. hominis</i>        | (2/26) strains         | -                    | -             | -              |
| <i>S. hycus</i>          | (1/26) strain          | -                    | -             | -              |
| <i>S. intermedius</i>    | (3/26) strains         | (2/21) strains       | -             | (1/21) strain  |
| <i>S. lentus</i>         | (1/21) strain          | (1/21) strain        | -             | -              |
| <i>S. saprophyticus</i>  | (2/26) strains         | -                    | -             | -              |
| <i>S. schleiferii</i>    | -                      | (1/21) strain        | -             | -              |
| <i>S. sciuri</i>         | -                      | (1/21) strain        | -             | -              |
| <i>S. simulans</i>       | (1/21) strain          | -                    | -             | -              |
| SCN spp.                 | (11/26) strains        | (7/21) strains       | (1/21) strain | (4/21) strains |

**Table 2: Enterobacteriaceae isolated from different sources related to open-dumping landfill, in Rio de Janeiro State, Brazil.**

| Origin of Sample                    |                       |                       |                  |                   |                  |                      |                  |                  |
|-------------------------------------|-----------------------|-----------------------|------------------|-------------------|------------------|----------------------|------------------|------------------|
| Microorganisms<br>(n=114)           | Humans<br>(32strains) | Leachate (53 strains) |                  |                   |                  | Animals (29 strains) |                  |                  |
|                                     |                       | 1 <sup>a</sup>        | 2 <sup>o</sup>   | 3 <sup>a</sup>    | 4 <sup>a</sup>   | Dog/                 | Cat/             | Birds/           |
|                                     |                       | Season                | Season           | Season            | Season           | Nasal                | Oral             | Cloaca           |
| <i>Cedeceae</i>                     | -                     | -                     | -                | -                 | -                | (1/29)<br>strain     | -                | -                |
| <i>Citrobacter<br/>amalonaticus</i> | -                     | (2/53)<br>strains     | (1/53)<br>strain | (1/53)<br>strain  | (1/53)<br>strain | (1/29)<br>strain     | -                | (1/29)<br>strain |
| <i>Citrobacter freundii</i>         | -                     | -                     | -                | -                 | (1/53)<br>strain |                      |                  |                  |
| <i>Edwardsiella</i> sp              | (1/32) strain         | -                     | -                | (2/53)<br>strains | -                | (2/29)<br>strains    | -                | -                |
| <i>Edwardsiella tarda</i>           | -                     | (1/53)<br>cepa        | (1/53)<br>strain | (1/53)<br>strain  | -                | -                    | -                | -                |
| <i>Enterobacter<br/>aerogenes</i>   | (1/32) strain         | (1/53)<br>strain      | -                | -                 | -                | -                    | -                | -                |
| <i>Enterobacter<br/>amnigenus</i>   | -                     | -                     | -                | -                 | (1/53)<br>strain | (1/29)<br>strain     | -                | -                |
| <i>Enterobacter cloacae</i>         | (1/32) strain         | -                     | -                | (2/53)<br>strains | -                | (1/29)<br>strain     | -                | -                |
| <i>Enterobacter<br/>hormaechei</i>  | (1/32) strain         | -                     | -                | -                 | -                | -                    | -                | -                |
| <i>Enterobacter gergoviae</i>       | -                     | -                     | (1/53)<br>strain | -                 | -                | -                    | -                | -                |
| <i>Enterobacter ictaluri</i>        | -                     | -                     | -                | -                 | (1/53)<br>strain | -                    | -                | -                |
| <i>Enterobacter<br/>intermedius</i> | -                     | -                     | -                | -                 | -                | -                    | (1/29)<br>strain | -                |
| <i>Enterobacter</i> sp.             | -                     | -                     | -                | -                 | (1/53)<br>strain | (3/29)<br>strains    | -                | -                |
| <i>Enterobacter taylorae</i>        | (1/32) strain         | -                     | (1/53)<br>strain | -                 | -                | (1/29)<br>strain     | -                | -                |
| <i>Erwinia</i> sp                   | -                     | -                     | -                | -                 | -                | (1/29)               | -                | -                |

|                                    |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                  |                  |
|------------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------------|------------------|
|                                    |                   |                   |                   |                   |                   | strain            |                  |                  |
| <i>Escherichia coli</i>            | (6/32)<br>strains | (2/53)<br>strains | (1/53)<br>strain  | (1/53)<br>strain  | -                 | (1/29)<br>strain  | -                |                  |
| <i>Escherichia vulneris</i>        | (1/32) strain     | -                 | -                 | -                 | -                 | -                 | -                | -                |
| <i>Ewingella americana</i>         | -                 | -                 | -                 | (1/53)<br>strain  | -                 | -                 | -                | -                |
| <i>Hafnia alvei</i> ,              | -                 | -                 | -                 | -                 | -                 | (2/29)<br>strains | -                | -                |
| <i>Klebsiella</i> sp               | -                 | -                 | -                 | -                 | -                 | (1/29)<br>strain  | (1/29)<br>strain | -                |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i>       | (1/32) strain     | -                 | -                 | -                 | -                 | -                 | -                | -                |
| <i>Klebsiella terrigena</i>        | -                 | (1/53)<br>strain  | -                 | -                 | -                 | -                 | -                | -                |
| <i>Leminorella richardii</i>       | -                 | -                 | -                 | (1/53)<br>strain  | -                 | -                 | -                | -                |
| <i>Morganella morganii</i> ,       | -                 | (1/53)<br>strain  | -                 | (2/53)<br>strains | (2/53)<br>strains | (1/29)<br>strain  | -                | (1/29)<br>strain |
| <i>Pantoea</i> sp.                 | -                 | -                 | -                 | -                 | -                 | (3/29)<br>strains | -                | -                |
| <i>Pantoea agglomerans</i>         | (4/32)<br>strains | -                 | -                 | -                 | -                 | -                 | -                | -                |
| <i>Proteus mirabilis</i>           | (3/32)<br>strains | (2/53)<br>strains | (3/53)<br>strains | -                 | -                 | (1/29)<br>strain  | -                | -                |
| <i>Proteus myxofaciens</i>         | (7/32)<br>strains | (1/53)<br>strain  | -                 | -                 | (1/53)<br>strain  | (1/29)<br>strain  | -                | -                |
| <i>Proteus penneri</i>             | (4/32)<br>strains | -                 | -                 | -                 | -                 | -                 | -                | -                |
| <i>Proteus vulgaris</i>            | (1/32) strain     | (3/53)<br>strains | (3/53)<br>strains | (1/53)<br>strain  | (1/53)<br>strain  | (2/29)<br>strains | -                | -                |
| <i>Providencia alcalifaciens</i>   | -                 | -                 | -                 | -                 | (1/53)<br>strain  | -                 | -                | -                |
| <i>Providencia</i> sp.             | -                 | -                 | -                 | (1/53)<br>strain  | -                 | -                 | -                | (1/29)<br>strain |
| <i>Providencia stuartii</i>        | -                 | (2/53)<br>strains | -                 | -                 | -                 | -                 | -                | -                |
| <i>Serratia</i> sp.                | -                 | -                 | -                 | (1/53)<br>strain  | (1/53)<br>strain  | -                 | -                | -                |
| <i>Shigella</i> sp.                | -                 | -                 | -                 | -                 | -                 | (1/29)<br>strain  | -                | -                |
| <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> | -                 | -                 | (1/53)<br>strain  | -                 | -                 | -                 | -                | -                |

**Table 3: Gram-negative non-fermenters bacteria (GNNFB) isolated from different sources coming from open-dumping landfill, in Rio de Janeiro State, Brazil.**

| Microorganisms<br>(n=26)         | Origin of Sample    |                          |                          |                          |                          |                      |               |                  |
|----------------------------------|---------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|----------------------|---------------|------------------|
|                                  | Humans<br>(5strain) | Leachate (9 strains)     |                          |                          |                          | Animals (12 strains) |               |                  |
|                                  |                     | 1 <sup>a</sup><br>Season | 2 <sup>a</sup><br>Season | 3 <sup>a</sup><br>Season | 4 <sup>a</sup><br>Season | Dog/<br>Nasal        | Cat/<br>Oral  | Birds<br>/Cloaca |
| <i>Acinetobacter baumannii</i>   | (2/5) strains       | -                        | -                        | -                        | -                        | (1/12) strain        | -             | -                |
| <i>Aeromonas sobria</i>          | -                   | -                        | -                        | (1/9) strain             | -                        | -                    | -             | -                |
| <i>Alcaligenes denitrificans</i> | -                   | -                        | -                        | -                        | -                        | (5/12) strains       | -             | (2/12) strains   |
| <i>Chromobacterium violaceum</i> | -                   | (1/9) strain             | -                        | (1/9) strain             | -                        | -                    | -             | -                |
| <i>Ochrobactrum anthropi</i>     | -                   | -                        | (1/9) strain             | -                        | -                        | -                    | -             | -                |
| <i>Pseudomonas alcaligenes</i>   | -                   | (1/9) strain             | -                        | (1/9) strain             | (1/9) strain             | (2/12) strains       | -             | -                |
| <i>Pseudomonas putida</i>        | -                   | -                        | -                        | -                        | (2/9) strains            | (1/12) strain        | (1/12) strain | -                |
| <i>Pseudomonas stutzeri</i>      | (3/5) strains       | -                        | -                        | -                        | -                        | -                    | -             | -                |

### Humans samples

From nasal surface of 28 waste pickers from open-dumping landfill the results showed 26 strains of *Staphylococcus* spp., 32 strains of *Enterobacteriaceae*, and five strains of Gram-negative non fermenting strains. Results of *Staphylococcus* spp. were recovered from all swabs and from some of them more than one type of bacteria was isolated. From CPS, three were *S. aureus*, three were *S. intermedius*, and one strain was *S. hycus*. From CNS one strain was classified as

*S. epidermidis*, two *S. hominis*, two *S. saprophyticus*, and one each of *S. simulans*, *S. capitis*, *S. lentus* and 11 strains classified as CNS spp.

From *Enterobacteriaceae* results showed 100% positive at least in one sample of this group of bacteria and more than one strain was isolated from the same swab. They were distributed as follow: six *Escherichia coli*; one strain of each of *Edwardsiella* sp., *Escherichia vulneris*, *Enterobacter hormaechei*, *Enterobacter taylorae*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*; four strains of *Pantoea agglomerans*; seven strains of *Proteus myxofaciens*, four *Proteus penneri*, and three strains of *Proteus mirabilis*.

Gram-negative non fermenting bacilli

These species were not isolated from all swabs analyzed. The follow bacteria were obtained: two strains of *Acinetobacter baumannii* and three of *Pseudomonas stutzeri*.

### **Animal samples**

A total of 21 strains isolated were *Staphylococcus* spp., 29 were *Enterobacteriaceae*, and 12 Gram-negative non fermenting bacilli. From coagulase negative staphylococci one strain was *S. sciuri*, one *S. lentus*, and 12 strains classified as CNS. From CPS the results showed two strains of *S. aureus*, three *S. intermedius*, one *S. schleiferii*, and one *S. delphini*. Among *Enterobacteriaceae* all swabs investigated showed at least one strain of the group and some more than one type of bacteria. The following bacteria were isolated: *Cedeceae*(1), *Citrobacter amalonaticus*(2), *Edwardsiella* sp.(2), *Escherichia coli*(1), *Enterobacter* spp.(3), *Enterobacter cloacae*(1), *Enterobacter taylorae*(1), *Enterobacter intermedius*(1), *Enterobacter amnigenus*(1), *Erwinia* sp.(1), *Hafnia alvei*(2), *Klebsiella* sp.(2), *Morganella morganii*(2), *Proteus myxofaciens*(1), *Proteus vulgaris*(2), *Proteus mirabilis*(1), *Pantoea* spp.(3), *Providencia* sp.(1), and *Shigella* sp(1). From Gram-negative non fermenting bacilli, not all swabs resulted positive and the following bacteria were isolated: one strain of *Acinetobacter baumannii*, seven *Alcaligenes denitrificans*, two *Pseudomonas alcaligenes*, and two strains of *Pseudomonas putida*.

## Leachate samples

From the four samples collected, 62 strains isolated resulted in 53 strains belonging to *Enterobacteriaceae* and nine Gram-negative non fermenting bacilli. Staphylococci were not isolated from leachate samples. All specimens obtained came from three points, coming from all four seasons of the year. From first collection 18 species were obtained; from 2nd collection a total of 12 species were isolated, from 3rd the collection resulted in 17 species, and finally from the 4th sampling a total of 15 species were isolated. From *Enterobacteriaceae* were isolated the following species: five strains of *Citrobacter amalonaticus*, one of *Citrobacter freundii*, two of *Edwardsiella* spp., three strains of *Edwardsiella tarda*, four of *Escherichia coli*, one strain of *Enterobacter* spp., one of *Enterobacter amnigenus*, two *Enterobacter cloacae*, one of *Enterobacter taylorae*, one of *Enterobacter ictaluri*, one of *Enterobacter aerogenes*, one *Enterobacter gergoviae*, one of *Ewingella americana*, one of *Klebsiella terrigena*, one of *Leminorella richardii*, five *Morganella morganii*, two *Proteus myxofaciens*, eight *Proteus vulgaris*, five *Proteus mirabilis*, one strain of *Providencia* spp., two of *Providencia stuartii*, one *Providencia alcalifaciens*, two *Serratia* spp., and one strain of *Yersinia pseudotuberculosis*. From leachate the Gram-negative non fermenting bacteria (GNNFB) obtained followed: one strain of *Aeromonas sobria*, two *Chromobacterium violaceum*, two *Ochrobactrum anthropi*, two *Pseudomonas alcaligenes*, and two strains of *Pseudomonas putida*.

## Antimicrobial profile

Figures 1 to 8 shows the antimicrobial profile of drugs towards each group of bacteria, with emphasis for some categories such as the less effective represented by beta-lactamic drugs: penicillin, amoxicillin, ampicillin, and tetracycline. Among the most effective drugs against Gram-negative bacilli included broad-spectrum beta-lactamic carbapenem, aztreonam, and tobramycin. Staphylococci were most sensitive towards vancomycin, sulfazotrin, and gentamicin, and less sensitive towards amoxicillin, penicillin, and ampicillin.

Figures 1 to 8 show the profile of all antimicrobial drugs tested against bacteria from three different sources, and classified by sensitive, intermediary

resistance, and resistant. Bars of each figure represent the percentages of drug profile.

Figure 1: Antimicrobial profile of Enterobacteriaceae isolated from animal related to landfill workers in Rio de Janeiro State, Brazil.

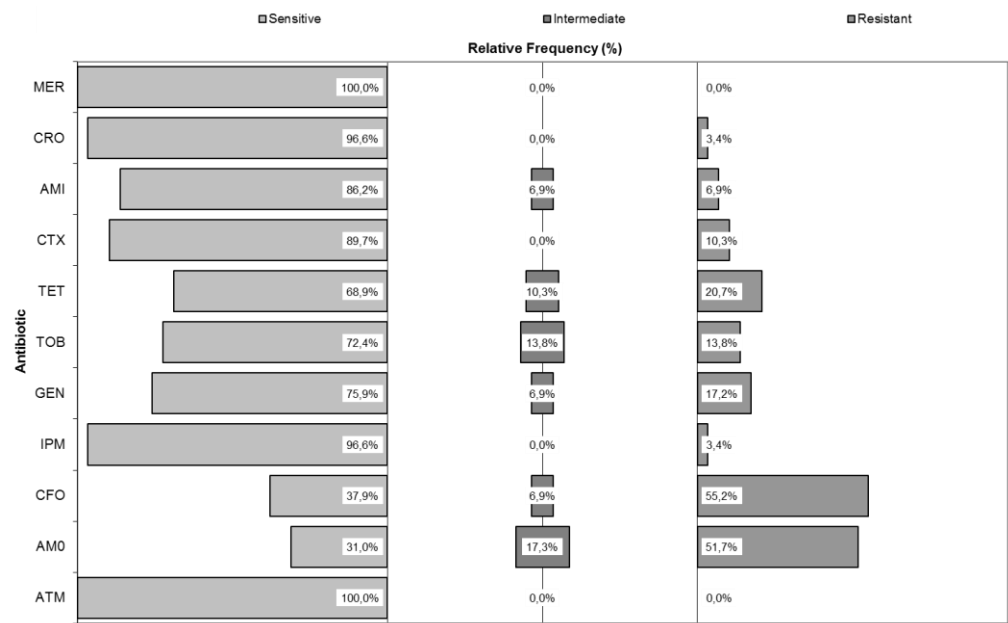


Figure 2: Antimicrobial profile of NFGNB isolated from animal related to landfill workers in Rio de Janeiro State, Brazil.

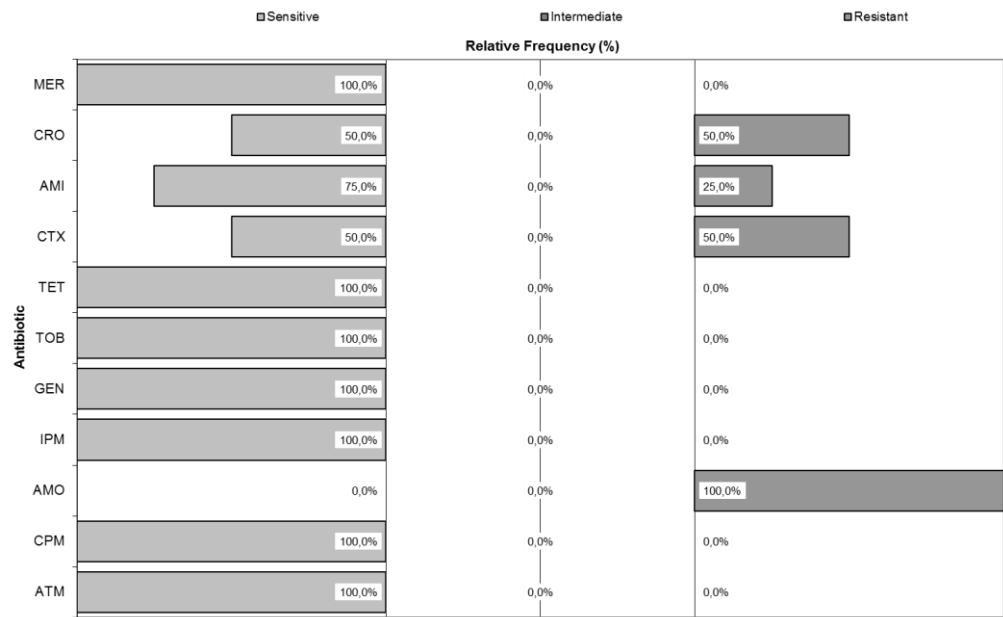


Figure 3: Antimicrobial profile of staphylococci isolated from animals related to landfill workers in Rio de Janeiro State, Brazil.

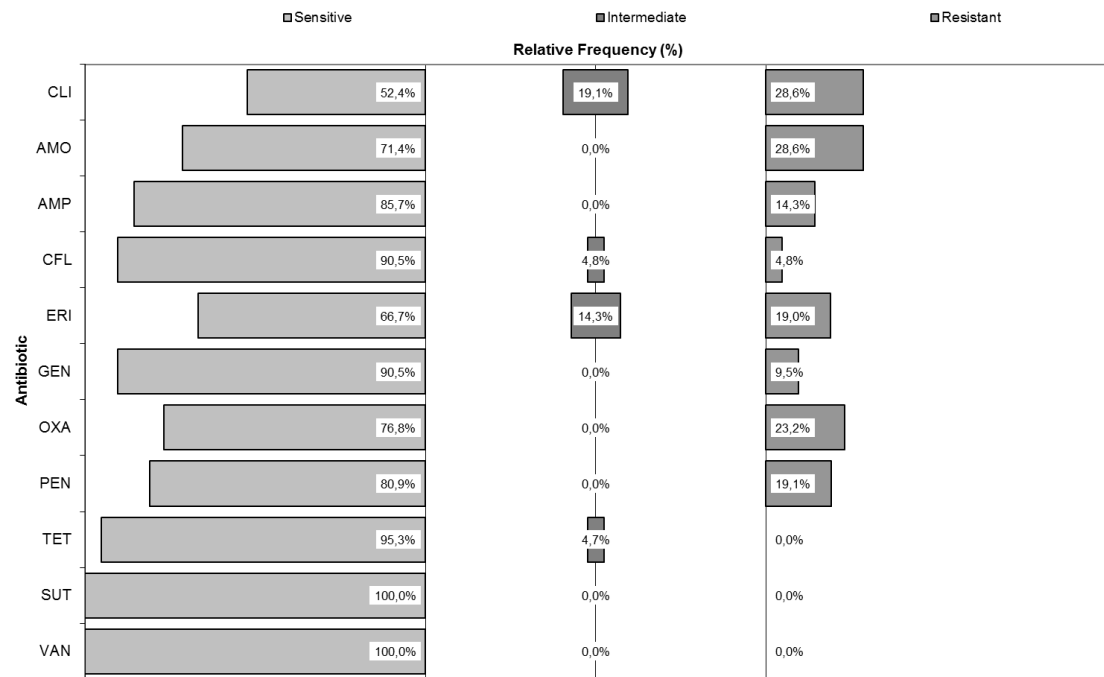


Figure 4: Antimicrobial profile of Enterobacteriaceae isolated from waste pickers workers of a landfill in Rio de Janeiro State, Brazil.

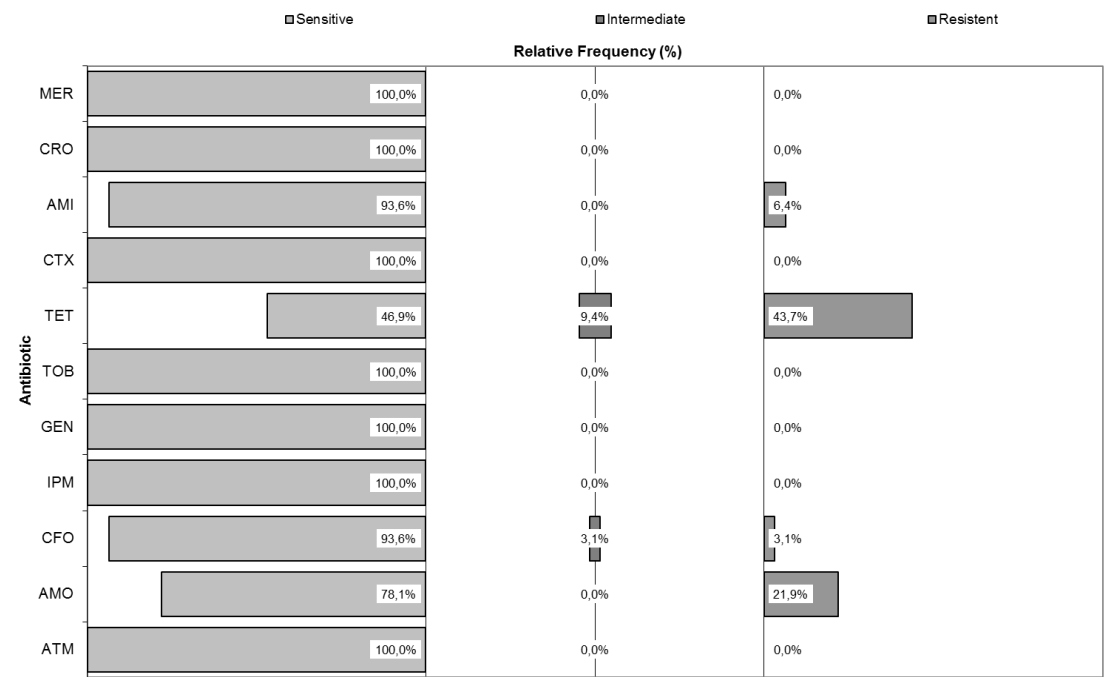


Figure 5: Antimicrobial profile of NFGNB isolated from waste pickers workers of a landfill in Rio de Janeiro State, Brazil.

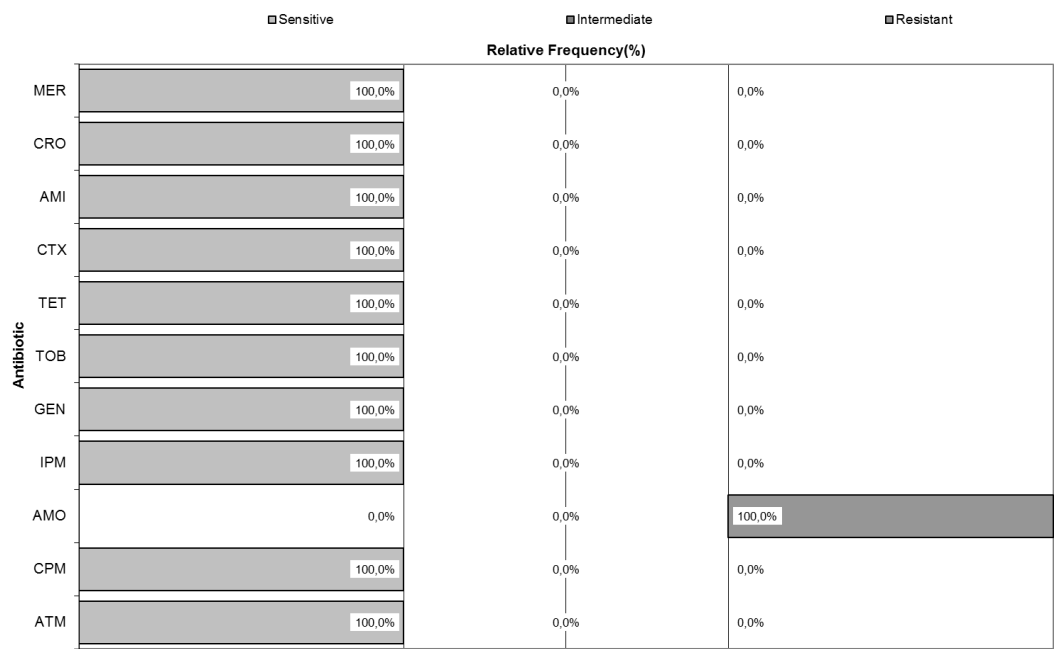


Figure 6: Antimicrobial profile of staphylococci isolated from waste pickers workers of a landfill in Rio de Janeiro State, Brazil.

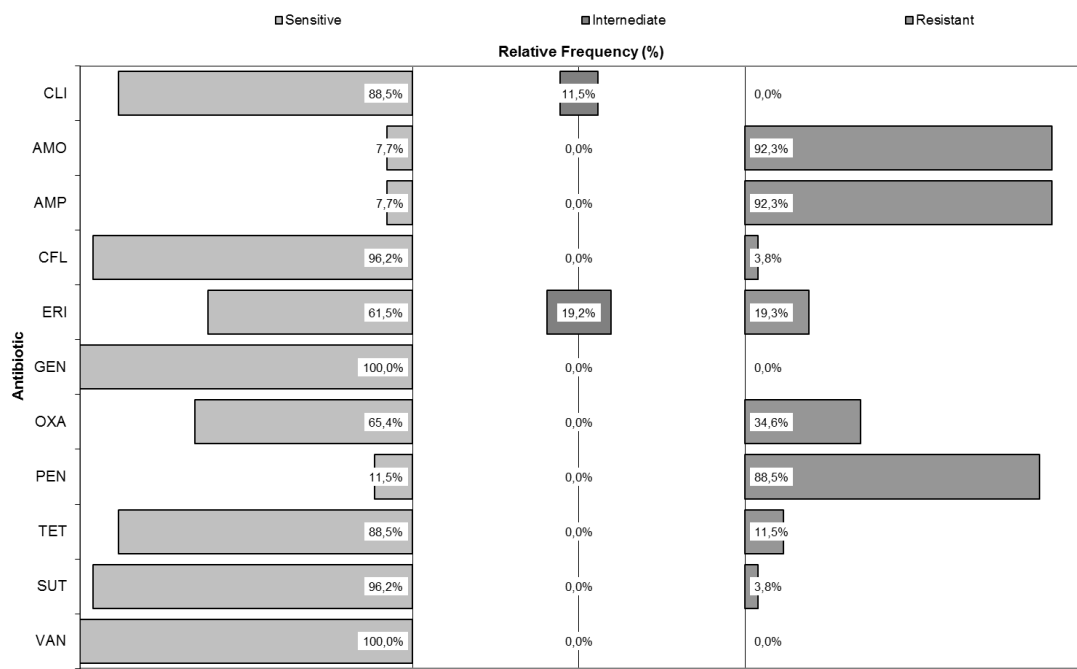


Figure 7: Antimicrobial profile of *Enterobacteriaceae* isolated from a leachate of a landfill in Rio de Janeiro State, Brazil.

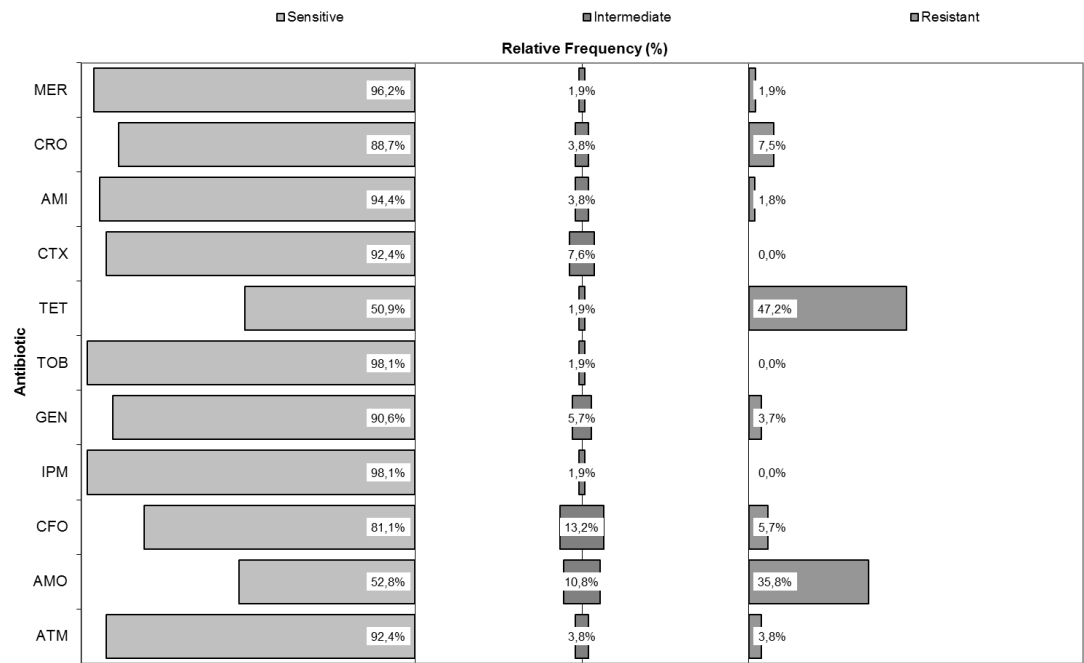
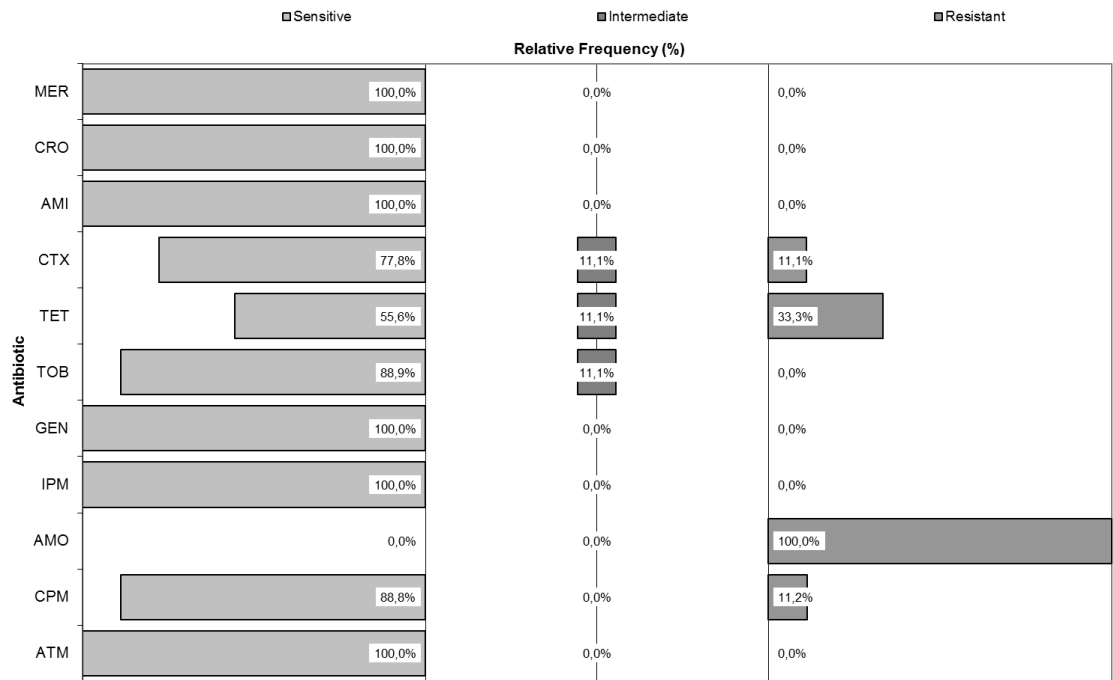


Figure 8: Antimicrobial profile of NFGNB isolated from a leachate of a landfill in Rio de Janeiro State, Brazil.

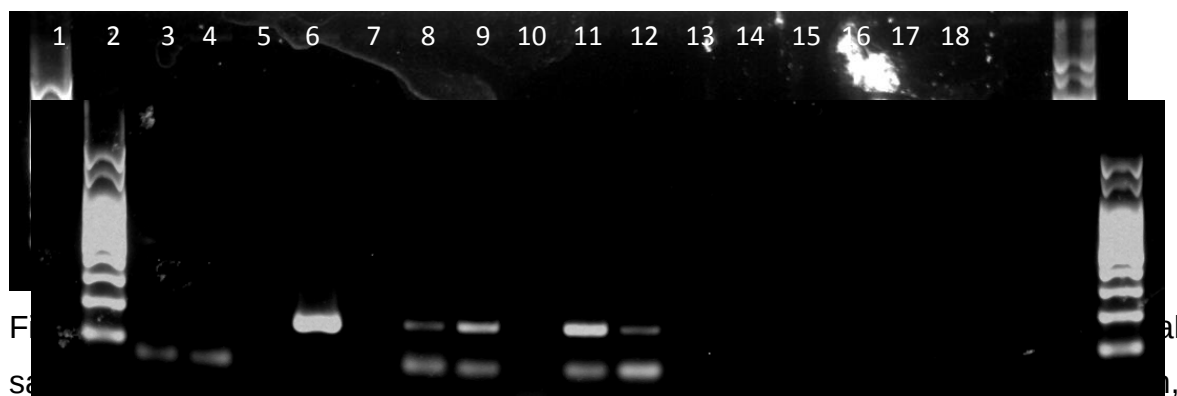


## PCR results

Based on phenotyping results, the molecular analyses were performed to verify the presence of *mecA* gene from oxacillin-resistant staphylococci, including one *S. aureus* and six other non-aureus staphylococci strains from human samples that followed this criterion. From eight samples positive to resistance toward oxacillin by diffusion method, only one was *mecA* negative (figure 9). The positive samples by PCR were *S. aureus* (1), *S. intermedius* (2), *S. hominis* (1), *S. saprophyticus* (1), and CNS (2).

From 21 staphylococci from animal origin, only four presented phenotypic oxacillin-resistant profile, and all four presented amplification of *mecA* gene, according to figure 10. The result of three coagulase-negative staphylococci, and one coagulase-positive *S. delphini* from nasal samples of dogs with *mecA*-positive profile, comprises the first case of *mecA*-positive *S. lentus* and *S. delphini* in dogs (figure 10, lanes 8 and 11).

As expected the amplicons from PCR assay of all strains investigated were obtained in the range of 163bp, according to Mehrotra et al. (2000).



Brazil); 2- negative control water without DNA; 3- negative control *Salmonella enteritidis* ATCC13076; 4- empty well; 5- *S. aureus* ATCC33591 positive control (163 pb); 6- empty well; 7- *S. intermedius* (sample 13B); 8- *S. hominis* (sample 15); 9- *S. intermedius* (sample 17B); 10- CNS (sample 14A); 11- CNS (sample 19A); 12- *S. saprophyticus* (sample 23); 13- *S. aureus* (sample 23); 14- *S. epidermidis* (sample 24); 15-19- empty wells.



Figure 10: Agarose gel eletroforesis *mecA* genes amplification strains from nasal samples from dogs. Lanes 1 and 20 DNA ladder (100bp, Ludwig Biotech, Brazil); 2- negative control water without DNA; 3- negative control *Salmonella enteritidis* ATCC13076; 4- empty well; 5- *S. aureus* ATCC33591 positive control (163 pb); 6- empty well; 7- CNS (sample ALIX 9c); 8- *S. delphini* CNS (ALIX12); 9- empty well; 10- CNS (sample ALIX 17B); 11- *S. lentus* (sample ALIX 26); 12-19- empty wells.

## Discussion

A landfill can be compared to small communities working in cooperation, from microorganisms to people, in order to get their profit to survive in this hostile environment. According to managers of the landfill subject of this work, approximately 240 tons of solid waste is dumped daily. Important to mention is that many houses in the vicinity are not served by sanitary services from the local government and are under serious and eminent risk of contamination of water supplies coming from wells. Several products constitute the great mass of garbage dumped daily in a landfill and bring to light the urgency to know the microbiota present in the leachate, animals and people who work or live around this area. The association of these pathogenic microorganisms and their presence in the leachate will depend on their survival time in the soil and in the case of pathogens, the ability to survive outside their host under a variety of environmental conditions, including leachate composition, and contamination and dispersion material, such as metal residues (GRISEY et al. 2010; OTTO et al., 2010). Differently of others (OBIRE and AGUDA, 2002), but likewise NWABUEZE (2011), there was no isolation of staphylococci from leachate samples in the present work. The data showed *mecA*-positive staphylococci, being three were CNS, one *S. aureus*, two *S. intermedius*, and one of each *S. hominis* and *S. saprophyticus*., all from human

origin. The *Staphylococcus intermedius* group (SIG) consists of three closely related coagulase-positive bacterial species including *S. intermedius*, *Staphylococcus pseudintermedius*, and *Staphylococcus delphini*. *S. pseudintermedius* is a major skin pathogen of dogs, which occasionally causes severe zoonotic infections of humans (Kadlec and Schwarz, 2012; Hatch et al., 2012). In the present work *S. intermedius* was identified in dogs, cloacal bird and humans, but no relation was investigated among these samples, and no data from animals living in landfill or in close contact with human that work in landfills being colonized by these strains are known so far. It's worth to mention that *mecA*-positive *S. intermedius* were identified by PCR (figure 1, lanes 7 and 9), and interestingly, one of the dogs belonging to waste picker (lane 7 sample 13B) also presented *S. delphini* PCR-positive which comprehends the SIG group. According to Penna and cols. (2012) dogs, with or without topic infections, can carry CNS methicillin-resistant. In the present work no *S. schleiferi* and methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) from dog origin, but they were described by others (GUARDABASSI et al., 2004). In the region investigated the drug resistance profile of *S. aureus* from animals (Vieira-da-Motta et al., 2001; Aires-de-Sousa et al., 2007), and drug-resistant CNS from buffalo with mastitis (Bonna et al., 2007) was described, and the present study complements such investigations by showing human and dogs colonized by multiresistant staphylococci strains. Anterior nares of humans is considered a perfect ecological niche for *S. aureus* (Klutmans et al., 1997). The results presented in this work calls attention for the presence of a MRSA strain colonizing nasal cavity surface of a human, but it is not clear if this is a case of persistent or an intermittent carrier. Other staphylococci isolated from the same area in the present work (figure 1), and show that drug resistance still remains as a risk factor for people. In the case of animals that live in close contact with human as a companion animal, the possibility of interchange of bacterial species between owners has been shown (MORGAN, 2008). However, no MRSA strain was isolated from animals in the present study. Concerning resistance profile, the most prevalent among human samples was observed towards tetracycline (43,7%), followed by amoxicillin (21,9%), and from animal samples the most prevalent resistance profile was against cephoxytime

(55,2%), followed by amoxicillin (51, 7%), tetracycline (20,7%), gentamycin (17,2%), and less towards other drugs. In the present study from 21 staphylococci samples [nasal(15), oral(1) cloaca (5)] of animals four were oxacillin-resistant which were all PCR-positive with 3 CNS (one *S. lentus*), and one *S. delphini*, and seven strains of staphylococci, among them one MRSA, were PCR-positive. Like other staphylococci, *S. lentus* has the ability to acquire antibiotic resistance genes, including erythromycin ribosome methylase (*erm*) genes, which confer resistance to macrolide, lincosamide, and streptogramin B (MLSB) antibiotics (Schwendener and Perreten, 2012). The two strains isolated, one from human and other from dog, were sensitive towards clindamicin and erythromycin and intermediary resistance towards both drugs, respectively which are the representatives of lincosamide and macrolide drugs used toward staphylococci strains in the present study. It's important to mention that *S. lentus* from dog was also resistant towards four drugs (CFO, AMO, AMP, and PEN) and the human strain against three drugs (AMP, PEN, AMO). These data suggest that both human and animals figure as potential dispersing carriers of *mecA* gene-positive and multiresistant staphylococci in that environment. Microbiota other than staphylococci, was identified colonizing animals and humans from the area investigated, including nasal human enterobacteriaceae. Among Gram-negative species, the most prevalent were *Proteus* sp with 34 strains followed by *Enterobacter* sp. with 19 strains, and among identified Gram-negative species *E. coli* and *P. vulgaris* with 11 strains each (Table 2) were the most prevalent. On the other hand, the drugs showing the highest efficacy towards Gram-negative bacteria were meropenem and imipenem (both 98, 2%), followed by aztreonam (95,5%). Regarding the 26 Gram-negative non fermenting bacilli isolated, the highest sensitivity profile was towards meropenem, imipenem, gentamicin and tobramycin with all bacteria 100% sensitive, followed by ceftriaxone (77%), aztreonam and cephodoxime (both 73%). The data show that *E. coli* was isolated from all sources investigated, including samples from human nasal cavities denoting poor sanitary conditions from people, since fecal-oral route is the most involved in transmission of pathogenic *E. coli* among humans (Black *et al.*, 1982). Gram-negative bacteria (GN) can also be found in a diverse myriad of samples, but water, soil and feces represent the main

source of contamination, and although fecal coliforms such as *E. coli* may not survive for long period in extraintestinal conditions their presence in leachate samples may indicate recent fecal contamination generated by warm-blooded animals, including humans (Harihan and Weinstein 1996; Ali Abadi and Lees, 2000). Flores-Tena et al. (2007) found that the most frequent species in leachate in Mexico were *Acinetobacter baumannii*, *Bordetella* sp, *Brucella* sp. and *Escherichia coli*, but from leachate sampled in the present study only *E. coli* was isolated, and *A. baumannii* was present in samples from human and animal sources. The most prevalent gram-negative species in leachate samples were *Citrobacter amalonaticus*, *Morganella morganii* and *Proteus vulgaris*, being present in all samples collected along the year investigation, followed by *Proteus mirabilis* and *E. coli*. Among the gram negative species, the isolation of *E. coli* from human nasal cavity (6/32) is of concern, since this bacteria could have its source in landfill, and hospital material was also dumped in the area. Soil is a well-known environment for pathogenic bacteria recipient, with many enteric-diseases causing microorganisms present (Santamaria and Toranzos, 2003), and members of enteric-diseases Gram-negative bacteria were isolated from leachate, for instance *Shigella* sp., *Yersinia pseudotuberculosis*, and *E. coli*. Gram-negative species were also present colonizing oral cavity surface of animals, probably due to contact with leachate draining to surrounding water sources observed (data not shown) or by direct feeding from trash. Water can be strongly affected by leachate, and shift in microbiota can change as distance increase from areas affected by leachate migration to ground water (Ludvigsen et al., 1999). Besides Gram-negative bacteria are among the main sources of contamination of surface and groundwater water for human consumption (Ritter et al., 2002), which is a feasible possibility in the area studied. Since the discharge of leachate was not canalized to municipal sewer system, thus, microbiota from animals investigated could be affected by drinking surface water they access in the nearby pond that receives leachate disposal. Finally, as leachate remains in the environment for long periods, and human and animal can access their content by direct contact, the data presented corroborate to hypothesis that pathogenic bacteria can persist in

the environment and that possibility of resistance gene transfer among bacteria communities is in course.

## References

AIRES-DE-SOUSA M, PARENTE CE, VIEIRA-DA-MOTTA O, BONNA IC, SILVA DA, DE LENCASTRE H. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from buffalo, bovine, ovine, and caprine milk samples collected in Rio de Janeiro State, Brazil. *Appl Environ Microbiol.* 73(12):3845-9, 2007.

ALI ABADI, F.S.; LEES, P. Antibiotic treatment for animals: effect on bacterial population and dosage regimen optimization. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 14: 307-313, 2000.

BALABAN, N., COLLINS, L.V., CULLOR, J.S., HUME, E.B., MEDINA-ACOSTA, E., VIEIRA-DA-MOTTA, O., O'CALLAGHAN, R., ROSSITTO, P.V., SHIRTLIFF, M.E., SERAFIM, L.S., TARKOWSKI, A., TORRES, J.V. Prevention of diseases caused by *Staphylococcus aureus* using the peptide RIP. *Peptides*, 21(9): 1301-1311, 2000.

BLACK, RE., BROWN, KH, BECKER, S, ABDUL ALIM A.R.M., MERSON, MH. Contamination of weaning foods and transmission of enterotoxigenic *Escherichia coli* diarrhoea in children in rural Bangladesh. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 76(2): 259–264, 1982.

BONNA, I.C.F., SANTOS, A.P.V., TEIXEIRA, G.N., VIEIRA-DA-MOTTA, O. Drug resistant coagulase-negative staphylococci isolated from milk of buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Rev Bras Cien Vet.*, 14(2): 117-121, 2007.

CLSI - Clinical Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-second informational supplement (M100-S22). Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania, USA; 32(3), 2012.

FLORES-TENA, F.J., GUERRERO-BARRERA, A.L., AVELAR-GONZÁLEZ, F.J., RAMÍREZ-LÓPEZ, E.M., MARTÍNEZ-SALDAÑA, M.C. Pathogenic and

opportunistic gram-negative bacteria in soil, leachate and air in San Nicolás landfill at Aguascalientes, Mexico. *Rev Latinoam Microbiol.*, 49(1-2):25-30, 2007.

GOLDSTEIN, R.E.R., MICALLEF, S.A., GIBBS, S.G., DAVIS, J.A., HE, X., GEORGE, A., KLEINFELTER, L.M., SCHREIBER, N.A., MUKHERJEE, S., SAPKOTA, A., JOSEPH, S.W., SAPKOTA, A.R. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) detected at four U.S. wastewater treatment plants. *Environ. Health Perspect.*, 120: 1551–1558, 2012.

GOODWIN, K.D., MCNAY, M., CAO, Y., EBENTIER, D., MADISON, M., GRIFFITH, J.F.. A multi-beach study of *Staphylococcus aureus*, MRSA, and enterococci in seawater and beach sand. *Water Research*, 46(13): 4195–4207, 2012.

GRISEY, E., BELLE, E., DAT, J., MUDRY, J., ALEYA, L. Survival of pathogenic and indicator organisms in groundwater and landfill leachate through coupling bacterial enumeration with tracer tests. *Desalination*, 2010.

GUARDABASSI, L., SCHWARZ, S., LLOYD, D.H. Pet animals as reservoirs of antimicrobial-resistant bacteria. *J. Antimicrob. Chemother*, 54 (2): 321-332, 2004.

HAMMERUM, A. M., SANDVANG, D., ANDERSEN, S.R., SEYFARTH, A.M., PORSBO, L.J., FRIMODT-MØLLER, N., HEUER, O.E. Detection of sul1, sul2 and sul3 in sulphonamide resistant *Escherichia coli* isolates obtained from healthy humans, porks and pigs in Denmark. *Int J Food Microbiol*, 106(2):235–237, 2006.

HARIHAN, R.; WEINSTEIN, R.A. Enterobacteriaceae. In: Mayhall, C.G.(ed.) *Hospital epidemiology and infection control*. Williams & Wilkins, Baltimore. p.345-366, 1996.

HATCH, S., Sree, A., Tirrell, S., Torres, B., Rothman, A.L.. Metastatic complications from *Staphylococcus intermedius*, a zoonotic pathogen. *J. Clin. Microbiol.*, 50(3): 1099–1101, 2012.

HEUER, H., SMALLA, K. Manure and sulfadiazine synergistically increased bacterial antibiotic resistance in soil over at least two months (2007) *Environmental Microbiology*, Volume 9(3): 657–66, 2007.

HEUER, H., BINH, C.T.T. KOPMANN, C., ZIMMERLING, U., KRÖGERRECKLENFORT, E., SMALLA, K. (2010) *Interdisciplinary Studies on Environmental Chemistry — Biological Responses to Contaminants*, Eds., N. Hamamura, S. Suzuki, S. Mendo, C. M. Barroso, H. Iwata and S. Tanabe, pp. 9–13. © by TERRAPUB, 2010.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICAS–IBGE. “Programa Nacional de Saneamento Básico-2008”. <<http://www.ibge.gov.br>> (February 13<sup>th</sup>, 2012).

INFANTE, B., GRAPE, M., LARSSON, M., KRISTIANSSON, C., PALLECCHI, L., ROSSOLINI, G.M., KRONVALL, G. Acquired sulphonamide resistance genes in faecal *Escherichia coli* from healthy children in Bolivia and Peru. *Int J Antimicrob Ag*, 25(4):308–312, 2005.

JOSEPHSON, J. J. The microbial resistome. *Environ. Sci. Technol.*, 40(21):6531–6534, 2006.

KADLEC, K., Schwarz, S. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus pseudintermedius*. *Vet. Dermatol.*, 23: 276–282, 2012.

KLUYTMANS, J., VAN BELKUM, A., VERBRUGH, H. Nasal Carriage of *Staphylococcus aureus*: Epidemiology, Underlying Mechanisms, and Associated Risks. *Clin. Microbiol. Rev.*, 10(3): 505–520, 1997.

KUMAR, K., GUPTA, S.C., BAIDOO, S.K., CHANDER, Y., ROSEN, C.J. Antibiotic uptake by plants from soil fertilized with animal manure. *J Environ Qual*, 34: 2082–2085, 2005.

LO, I.M. Characteristics and treatment of leachates from domestic landfills. *Environ. Int.*, 22(4): 433-442, 1996.

LUDVIGSEN, L., ALBRECHTSEN, H.-J., RINGELBERG, D.B., EKElund, F., CHRISTENSEN, T.H. Distribution and composition of microbial populations in a

landfill leachate contaminated aquifer (Grindsted, Denmark). *Microb. Ecol.* 37:197–207, 1999.

MEHROTRA, M., WANG, G., JOHNSON, W. M., Multiplex PCR for Detection of Genes for *Staphylococcus aureus* Enterotoxins, Exfoliative Toxins, Toxic Shock Syndrome Toxin 1, and Methicillin Resistance, *J. Clin. Microbiol.*, Mar., p. 1032–1035. 2000.

MORGAN, M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and animals: zoonosis or humanosis? *J. Antimicrob. Chemother.*, 62(6):1181-7, 2008.

NWABUEZE, A.A.; Water quality and micro-organisms of leachate-contaminated pond; *American Journal of Scientific and Industrial Research*. V. 2, nº 2, p. 205-208, 2011.

OBIRE, O., AGUDA, M.J. Bacterial community of leachate from a waste-dump and an adjacent stream. *Appl. Sci. Environ. Manag.*, 6(2): 71-75, 2002.

OTTO, C.C., CUNNINGHAM, T.M., HANSEN, M.R., HAYDEL, S.E. Effects of antibacterial mineral leachates on the cellular ultrastructure, morphology, and membrane integrity of *Escherichia coli* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 9(26): 2-13, 2010.

PRUDEN, A., Pei, R., Storteboom, H., Carlson, K.H. Antibiotic resistance genes as emerging contaminants: Studies in Northern Colorado. *Environ Sci Technol*, 40(23):7445–7450, 2006.

Ritter, L., Solomon, K, Sibley, P. Sources, pathways, and relative risks of contaminants in surface water and groundwater: a perspective prepared for the Walkerton Inquiry. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 65:1–142, 2002.

RHODES, G., HUYS, G., SWINGS, J., MCGANN, P., HINEY, M., SMITH, P., PICKUP, R.W. Distribution of oxytetracycline resistance plasmids between *Aeromonads* in hospital and aquaculture environments: Implication of Tn1721 in

dissemination of the tetracycline resistance determinant Tet A. Appl Environ Microbiol, 66(9): 3883–3890, 2000.

VIEIRA-DA-MOTTA, O., FOLLY, M.M., SAKYIAMA, C.C.H. Detection of different *Staphylococcus aureus* strains in bovine milk from subclinical mastitis using PCR and routine techniques. Braz. J. Microbiol., 32, p. 27-31, 2001.

## II-Quadro Geral

|                    | Micro-organismo isolado         | HUM<br>(n=28) | ANIM<br>(n=14) | CHORUME   |     |     |   |           |     |     |   |           |     |     |   |           |     |     |   |
|--------------------|---------------------------------|---------------|----------------|-----------|-----|-----|---|-----------|-----|-----|---|-----------|-----|-----|---|-----------|-----|-----|---|
|                    |                                 |               |                | ESTAÇÃO 1 |     |     |   | ESTAÇÃO 2 |     |     |   | ESTAÇÃO 3 |     |     |   | ESTAÇÃO 4 |     |     |   |
|                    |                                 |               |                | P 1       | P 2 | P 3 | Σ | P 1       | P 2 | P 3 | Σ | P 1       | P 2 | P 3 | Σ | P 1       | P 2 | P 3 | Σ |
| Enterobacteriaceae | <i>Cedacea</i> spp.             |               | 1              |           |     |     |   |           |     |     |   |           |     |     |   |           |     |     |   |
|                    | <i>Citrobacter amalonaticus</i> |               | 2              | 1         | 1   |     | 2 |           |     | 1   | 1 |           | 1   |     | 1 | 1         |     |     | 1 |
|                    | <i>Citrobacter freundii</i>     |               |                |           |     |     |   |           |     |     |   |           |     |     |   |           | 1   | 1   | 1 |
|                    | <i>Edwardsiella ictaluri</i>    |               |                |           |     |     |   |           |     |     |   |           |     |     |   | 1         |     | 1   | 1 |
|                    | <i>Edwardsiella</i> spp.        | 1             | 2              |           |     |     |   |           |     |     |   | 1         |     | 1   | 2 |           |     |     | 2 |
|                    | <i>Edwardsiella tarda</i>       |               |                | 1         |     |     | 1 |           | 1   |     | 1 |           | 1   |     | 1 |           |     |     | 3 |
|                    | <i>Enterobacter aerogenes</i>   | 1             |                | 1         |     |     | 1 |           |     |     |   |           |     |     |   |           |     |     | 1 |
|                    | <i>Enterobacter agglomerans</i> | 3             |                |           |     |     |   |           |     |     |   |           |     |     |   |           |     |     |   |
|                    | <i>Enterobacter aminigenus</i>  |               | 1              |           |     |     |   |           |     |     |   |           |     |     |   | 1         |     |     | 1 |
|                    | <i>Enterobacter cloacae</i>     | 1             | 1              |           |     |     |   |           |     |     |   | 1         | 1   |     | 2 |           |     |     | 2 |
|                    | <i>Enterobacter gergoviae</i>   |               |                |           |     |     |   |           |     | 1   | 1 |           |     |     |   |           |     |     | 1 |
|                    | <i>Enterobacter Hormaechi</i>   | 1             |                |           |     |     |   |           |     |     |   |           |     |     |   |           |     |     |   |
|                    | <i>Enterobacter intermedius</i> |               | 1              |           |     |     |   |           |     |     |   |           |     |     |   |           |     |     |   |
|                    | <i>Enterobacter</i> spp.        |               | 3              |           |     |     |   |           |     |     |   |           |     |     |   | 1         |     |     | 1 |
|                    | <i>Enterobacter taylorae</i>    | 1             | 1              |           |     |     |   |           |     | 1   | 1 | 1         |     |     | 1 |           |     |     | 2 |
|                    | <i>Erwinia</i> spp.             |               | 1              |           |     |     |   |           |     |     |   |           |     |     |   |           |     |     |   |
|                    | <i>Escherichia coli</i>         | 6             | 1              |           | 1   | 1   | 2 |           |     | 1   | 1 |           | 1   |     | 1 |           |     |     | 4 |
|                    | <i>Escherichia vulneris</i>     | 1             |                |           |     |     |   |           |     |     |   |           |     |     |   |           |     |     |   |
|                    | <i>Ewingella americana</i>      |               |                |           |     |     |   |           |     |     |   | 1         |     |     | 1 |           |     |     | 1 |
|                    | <i>Hafnia alvei</i>             |               | 2              |           |     |     |   |           |     |     |   |           |     |     |   |           |     |     |   |
|                    | <i>Klebsiella pneumoniae</i>    | 1             |                |           |     |     |   |           |     |     |   |           |     |     |   |           |     |     |   |
|                    | <i>Klebsiella</i> spp.          |               | 2              |           |     |     |   |           |     |     |   |           |     |     |   |           |     |     |   |
|                    | <i>Klebsiella terrigena</i>     |               |                | 1         |     |     | 1 |           |     |     |   |           |     |     |   |           |     |     | 1 |
|                    | <i>Leminorella richardii</i>    |               |                |           |     |     |   |           |     |     |   | 1         |     |     | 1 |           |     |     | 1 |

|                           |                                    |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|---------------------------|------------------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
|                           | <i>Morganella morganii</i>         |   | 2 | 1 |   |   | 1 |   | 1 |   | 1 | 1 |   | 1 | 2 | 1 |   |   | 1 | 5 |
|                           | <i>Pantoea agglomerans</i>         | 1 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|                           | <i>Pantoea</i> spp.                |   | 3 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|                           | <i>Proteus mirabilis</i>           | 3 | 1 | 1 |   | 1 | 2 | 1 | 1 |   | 2 |   |   | 1 | 1 |   |   |   |   | 5 |
|                           | <i>Proteus myxofaciens</i>         | 7 | 1 |   |   | 1 | 1 |   |   |   |   | 1 |   | 1 |   |   |   |   |   | 2 |
|                           | <i>Proteus penneri</i>             | 4 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|                           | <i>Proteus vulgaris</i>            | 1 | 2 | 1 | 1 |   | 2 | 1 | 1 | 1 | 3 |   | 1 |   | 1 | 1 | 1 |   | 2 | 8 |
|                           | <i>Providencia alcalifaciens</i>   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   | 1 |   | 1 | 1 |
|                           | <i>Providencia</i> spp.            |   | 1 |   |   |   |   |   |   |   |   | 1 |   | 1 |   |   |   |   |   | 1 |
|                           | <i>Providencia stuartii</i>        |   |   | 1 | 1 |   | 2 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   | 2 |
|                           | <i>Serratia</i> spp.               |   |   |   |   |   |   |   |   |   | 1 |   |   | 1 |   |   |   |   |   | 1 |
|                           | <i>Shigella</i> spp.               |   | 1 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|                           | <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> |   |   |   |   |   |   |   | 1 | 1 |   |   |   |   |   |   |   |   |   | 1 |
| BGNF                      | <i>Pseudomonas alcaligenes</i>     |   | 2 |   |   |   |   | 1 |   | 1 |   |   |   |   |   |   | 1 | 1 |   | 2 |
|                           | <i>Pseudomonas putida</i>          |   | 2 |   |   | 1 | 1 |   |   |   |   |   | 1 | 1 |   |   |   |   |   | 2 |
|                           | <i>Aeromonas sobria</i>            |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   | 1 |   | 1 |   |   |   |   |   | 1 |
|                           | <i>Chromobacterium violaceum</i>   |   |   |   |   | 1 | 1 |   |   |   |   | 1 |   | 1 |   |   |   |   |   | 2 |
|                           | <i>Ochrobactrum anthropi</i>       |   |   |   |   |   |   | 1 | 1 |   |   |   |   |   |   |   | 1 | 1 |   | 2 |
|                           | <i>Acinetobacter baumannii</i>     | 2 | 1 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|                           | <i>Alcaligenes denitrificans</i>   |   | 7 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|                           | <i>Pseudomonas stutzeri</i>        | 3 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| <i>Staphylococcus</i> sp. | <i>S. aureus</i>                   | 3 | 2 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|                           | <i>S. capitis</i>                  | 1 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|                           | <i>S. delphini</i>                 |   | 1 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|                           | <i>S. epidermidis</i>              | 1 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|                           | <i>S. hominis</i>                  | 2 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|                           | <i>S. hyicus</i>                   | 1 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|                           | <i>S. intermedius</i>              | 3 | 3 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|                           | <i>S. lentus</i>                   | 1 | 1 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|                           | <i>S. saprophyticus</i>            | 2 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |

|  |                      |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|--|----------------------|----|----|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|
|  | <i>S. schleiferi</i> |    | 1  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  | <i>S. sciuri</i>     |    | 1  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  | <i>S. simulans</i>   | 1  |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  | SCN                  | 11 | 12 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |

### III- Questionário aplicado à população-alvo



**UENF**

Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro



**LSA/CCTA/UENF**

**Setor de Bacteriologia**

Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ n° questionário: \_\_\_\_ entrevistador: \_\_\_\_\_

#### 1. DADOS PESSOAIS

Nome: \_\_\_\_\_

Idade: \_\_\_\_\_ sexo ( ) masculino ( ) feminino

Profissão: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Quantas pessoas residem no local: \_\_\_\_\_

#### 2. CONDIÇÕES SÓCIO-ECONOMICAS

Nível de escolaridade do responsável pela residência:

Analfabeto ( ) ( ) fundamental incompleto ( ) fundamental completo

( ) Médio incompleto ( ) médio completo

( ) superior incompleto ( ) superior completo

#### 3. DADOS DE CONDIÇÕES SANITÁRIAS

Tem contato com ambiente hospitalar? ( ) direto ( ) indireto ( ) não

Obs: \_\_\_\_\_

O que usa como proteção em contato com o lixo?

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Faz (ou fez) algum tipo de tratamento medicamentoso? ( ) sim ( ) não

Se sim, especifique período, automedicação ou receituário:

---

---

Utiliza objetos encontrados no lixão para uso domiciliar?

( ) sim ( ) não

Se sim, quais?

---

---

Costuma reaproveitar alimentos encontrados? ( ) sim ( ) não

Obs.: \_\_\_\_\_

---

Quais medidas de higiene diária são adotadas?

---

#### 4. DADOS DOS ANIMAIS

Nº de animais: \_\_\_\_\_

Descrição dos animais: \_\_\_\_\_

---

Animal é tratado por algum médico veterinário: ( ) sim ( ) não

Recebe tratamento? ( ) sim ( ) não

Qual medicamento?

---

Qual a frequência de banhos do animal?

( ) uma vez por semana ( ) um vez ao mês ( ) outras

Onde vive o animal?

( ) dentro de casa ( ) no quintal ( ) na rua ( ) outros

---

Qual a alimentação deste animal? ( ) ração ( ) comida caseira ( ) outros

---

#### 5. DESCRIÇÃO DAS LESÕES

O animal apresenta algum tipo de lesão? sim ( ) não ( )

Tipos de lesões:

---

---

Local das lesões:

---

---

O proprietário lava as mãos após mexer com seu animal?

( ) sim ( ) não ( ) as vezes

Os proprietários já ouviram falar de transmissão de doenças de animais para os humanos? ( ) sim ( ) alguma coisa ( ) nunca

Em caso positivo, já ouviram falar sobre bactérias, fungos e doenças relacionadas?

( ) sim ( ) não ( ) ligeira noção

Se sim, qual(is) micro-organismo(s) já ouviu falar?

---

---

O que o proprietário acha da visita do médico veterinário e um biomédico em sua residência?

( ) Ruim ( ) satisfatória ( ) boa ( ) excelente

**Autorizo o médico veterinário a entrar em minha residência e examinar meus animais, e autorizo o biomédico a realizar coleta de material humano.**

Ass: \_\_\_\_\_

**IMPORTANTE: Todo e qualquer tipo de informação colhida neste questionário terá caráter sigiloso finalidade a avaliação científica dos dados obtidos, sendo proibido o seu uso para outros fins.**

OBSERVAÇÕES PERTINENTES:

---

---

---

Av. Alberto Lamego, 2000 - Parque Califórnia - Campos dos Goytacazes/ RJ  
CEP: 28013-602 Tel.: (22) 2739-7209

#### **IV- Termo de consentimento livre esclarecido**

Declaro para os devidos fins que eu, \_\_\_\_\_, Morador da comunidade de \_\_\_\_\_ do Município de Campos dos Goytacazes/ RJ. Estou ciente do projeto sobre bactérias e desejo participar doando uma amostra, através de um suabe da cavidade nasal para colaborar com o projeto a ser realizado pelo Laboratório de Sanidade Animal, setor de Microbiologia no Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Sua participação não é obrigatória e a qualquer momento você pode desistir de participar e retirar seu consentimento, sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador ou com a instituição.

As informações obtidas através dessa pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre sua participação. Os dados não serão divulgados de forma a possibilitar sua identificação, pois o projeto é baseado em dados estatísticos.

Você receberá uma cópia deste termo onde consta o telefone e o endereço institucional do pesquisador principal e do CEP, podendo tirar suas dúvidas sobre o projeto e sua participação, agora ou a qualquer momento.

\_\_\_\_\_  
Nome e assinatura do pesquisador

Declaro que entendi os objetivos, riscos e benefícios de minha participação na pesquisa e concordo em participar.

\_\_\_\_\_  
Sujeito da pesquisa