

Avaliação da Eficiência de uma Estação de Tratamento de Efluente Hospitalar através da Detecção e Caracterização Molecular de *Pseudomonas aeruginosa*, na Cidade do Rio de Janeiro

Rosa Maria Pinto de Novaes

Curso de Especialização em Controle da Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços Vinculados à Vigilância Sanitária.
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Fundação Oswaldo Cruz

Orientadora: Maysa Beatriz Mandetta Clementino

Rio de Janeiro

2009

CAPA / LOMBADA

Rosa Maria Pinto
de Novaes

Avaliação da
Eficiência de
uma Estação de
Tratamento de
Efluente
Hospitalar
através da
Detecção e
Caracterização
Molecular de
*Pseudomonas
aeruginosa* na
Cidade do Rio de
Janeiro.

PPGVS/ INCQS
FIOCRUZ
2009

FOLHA DE ROSTO

Avaliação da Eficiência de uma Estação de Tratamento de Efluente Hospitalar na Cidade do Rio de Janeiro, através da Detecção e Caracterização Molecular de *Pseudomonas aeruginosa*

Rosa Maria Pinto de Novaes

Curso de Especialização em Controle da Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços Vinculados à Vigilância Sanitária

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Fundação Oswaldo Cruz

Maysa Beatriz Mandetta Clementino

Rio de Janeiro

FOLHA DE APROVAÇÃO

Avaliação da Eficiência de uma Estação de Tratamento de Efluente Hospitalar através da Detecção e Caracterização Molecular de *Pseudomonas aeruginosa* na Cidade do Rio de Janeiro.

Rosa Maria Pinto de Novaes

Monografia submetida à Comissão Examinadora composta pelos professores e tecnologistas do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz e por professores convidados de outras instituições, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Especialização em Controle da Qualidade em Produtos, Ambientes e Serviços Vinculados à Vigilância Sanitária.

Aprovado:

Dr. Célia Maria Carvalho Pereira Araújo Romão, Tecnologista sênior, INCQS, FIOCRUZ.

Dr. Alessandra Silva Morilla Gonzalez, Bolsista de Pós-Doutorado Júnior, Instituto de Biologia, UFRJ.

Dr. Ivano Raffaele Victorio de Filippis Capasso, Tecnologista sênior, INCQS, FIOCRUZ.

Dr. Maysa Beatriz Mandetta Clementino, Tecnologista sênior, INCQS, FIOCRUZ.
(Orientador)

Rio de Janeiro
FICHA CATALOGRÁFICA

Novaes, Rosa Maria Pinto de
Avaliação da Eficiência de uma Estação de Tratamento de Efluente Hospitalar através da Detecção e Caracterização Molecular de *Pseudomonas aeruginosa* na Cidade do Rio de Janeiro/ Rosa Maria Pinto de Novaes. Rio de Janeiro: INCQS/ FIOCRUZ, 2009.

xii, 51 f., il., tab., graf.

Trabalho de conclusão de Curso (Especialização em Vigilância Sanitária) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Rio de Janeiro, 2009.

Orientador: Maysa Beatriz Mandetta Clementino

1. Esgoto hospitalar. 2. *Pseudomonas aeruginosa*.
3. Bactérias multirresistentes I. Título.

RESUMO

O ambiente hospitalar é alvo de preocupação por parte da sociedade devido ao grande número de doentes em um mesmo local e pela diversidade de microrganismos encontrados, que estariam presentes também nos resíduos gerados. Os hospitais liberam, em seu esgoto, uma variedade de substâncias tais como fármacos, antibióticos, desinfetantes, anestésicos, metais pesados e drogas não metabolizadas por pacientes, que podem provocar um aumento das populações bacterianas multirresistentes. A *Pseudomonas aeruginosa*, devido à sua natureza ubíqua, é comumente encontrada no ambiente hospitalar, sendo considerada um dos patógenos mais relevantes. Este estudo abrange a discussão sobre as características microbiológicas de esgotos hospitalares, bem como os impactos do lançamento destes efluentes sem um pré-tratamento adequado em corpos receptores, cujos riscos associados incluem a disseminação de microrganismos patogênicos no ambiente. Desta forma, estudou-se a eficiência de um sistema de tratamento de esgoto hospitalar localizado na cidade do Rio de Janeiro através da identificação bioquímica e molecular dos isolados de *P. aeruginosa*, a determinação de seus perfis de sensibilidade aos antimicrobianos e o comportamento das mesmas ao longo do sistema. Foi detectada a presença de *P. aeruginosa* em todas as etapas do tratamento, cepas sensíveis e resistentes a cefepime, imipeném, aztreonam, gentamicina, ciprofloxacina, e norfloxacina, refletiram a diversidade dos isolados. Concluiu-se que o sistema de tratamento estudado não foi capaz de eliminar a *P. aeruginosa* do efluente tratado; que o método molecular foi mais sensível e eficiente que o convencional na identificação dos isolados e que cepas de *P. aeruginosa* multirresistentes estão sendo lançadas no meio ambiente. Estes resultados poderão permitir uma avaliação da influência do tratamento no comportamento de patógenos resistentes, evitando a disseminação desses organismos nos recursos hídricos.

Palavras chave: Esgoto hospitalar, *Pseudomonas aeruginosa*, bactérias multirresistentes, gene 16S rRNA.

ABSTRACT

The hospital environment is causing concern to society, due to the high number of patients in the same area and because of microbial diversity that has been found in its wastes. The hospitals release in their sewage a variety of substances including drugs, antibiotics, disinfectants, anesthetics, heavy metals and non-metabolized drugs, that can provide the development of multi-resistant bacterial communities. *Pseudomonas aeruginosa*, due to its ubiquitous nature, is commonly found in the hospital environment, being considered one of the most relevant pathogens. This study includes the discussion about microbiological characteristics of hospital wastes, as the impact of the release of these effluents without adequate preliminary treatment into hydric resources, which associated risks include pathogenic microorganism spread in the environment. We analyzed a wastewater treatment plant in the Rio de Janeiro city efficiency by biochemical and molecular identification of *P. aeruginosa* isolates; the determination of their antimicrobial susceptibility and their behavior during the treatment process. We detected the presence of *P. aeruginosa* during all the treatment steps, and a number of susceptible and resistant strains against cefepime; imipenem; aztreonam; gentamicin; ciprofloxacin; and norfloxacin, reflecting the diversity of the isolates. We concluded that a) the treatment plant was not able to eliminate *P. aeruginosa* strains from the treated effluent b) the molecular approach was more sensible and efficient than conventional methodology for the isolates identification and c) the multi-resistant *P. aeruginosa* strains are currently released into the environment. These results will allow the assessment of the influence of treatment on resistant pathogens performance, avoiding their dissemination in water resources.

Key-words: Hospital waste, *Pseudomonas aeruginosa*, multi-resistant bacteria, 16S rRNA gene.

LISTA DE SIGLAS

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AIDS - Acquired Immunodeficiency Syndrome (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida)

ATCC - American Type Culture Collection

bp - Bases par (Pares de Base)

CDC - Centers for Disease Control and Prevention

CLSI - Clinical and Laboratory Standard Institute

CNES - Cadastro Nacional de Estabelecimentos de Saúde

CONAMA - Conselho Nacional de Meio Ambiente

DNA - Ácido desoxirribonucléico

ETE - Estação de Tratamento de Esgotos

FIOCRUZ - Fundação Instituto Osvaldo Cruz

HIV - Human Immunodeficiency Vírus (Vírus Humano da Imunodeficiência)

HMLJ - Hospital Municipal Lourenço Jorge

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

INCQS - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

MLD - Maternidade Leila Diniz

NBR - Norma Brasileira Regulamentadora

NNISS - National Nosocomial Infections Surveillance System

PCR - Polymerase chain reaction (Reação em cadeia pela Polimerase)

rDNA - DNA ribossomal

Rio-Águas - Subsecretaria de Águas Municipais

RSS - Resíduos de Serviços de Saúde

SENTRY - Programa de Vigilância Epidemiológica e de Resistência Antimicrobiana

SUS - Sistema Unificado de Saúde

UTI - Unidade de Tratamento Intermediário

TBE - Tris-borato EDTA

TAE - Tris-acetato EDTA

Lista de Tabelas

Tabela 1. Resultados das Provas Bioquímicas.

Tabela 2. Susceptibilidade aos antimicrobianos.

Lista de Gráficos

Gráfico 1. Resultado das Provas Bioquímicas

Gráfico 2. Resultado da identificação molecular dos isolados.

Lista de Ilustrações

- Figura 1 A** - Panorâmica da estação de Tratamento
- Figura 1 B** - Panorâmica da estação de Tratamento
- Figura 2** - Crescimento bacteriano em Agar Cetrimide
- Figura 3** - Crescimento bacteriano no Caldo Letheen
- Figura 4** - Gráfico com resultados das provas bioquímicas
- Figura 5 A** - Especificidade dos iniciadores para o gênero *Pseudomonas*
- Figura 5 B** - Especificidade dos iniciadores para *P. aeruginosa*
- Figura 6** - PCR dos isolados do ponto 1 ETE
- Figura 7** - PCR dos isolados dos pontos 2 ETE, 3 ETE e 4 ETE
- Figura 8** - PCR dos isolados dos pontos 5 ETE e 5c ETE

Sumário

RESUMO.....	vi
Gráfico 1. Resultado das Provas Bioquímicas.....	x
Figura 4 - Gráfico com resultados das provas bioquímicas.....	xi
1. Introdução.....	1
1.1. Resíduos de Serviços de Saúde.....	1
1.2. Resíduos Líquidos dos Serviços de Saúde e a Legislação Brasileira.....	3
1.3. Características Microbiológicas dos RSS.....	5
1.4. Pseudomonas aeruginosa.....	7
1.5. Identificação Fenotípica	10
1.6. Identificação Molecular.....	11
1.7. Estação de Tratamento de Esgotos do Complexo hospitalar Lourenço Jorge/ Leila Diniz.....	12
2. Objetivos.....	15
2.1. Objetivo geral.....	15
2.2. Objetivos Específicos.....	15
3. Materiais e Métodos.....	16
3.1. Local de Estudo:.....	16
3.2. Coleta:.....	17
3.3 Identificação Fenotípica.....	17
3.3.1. Condições de cultivo:.....	17
3.3.2. Identificação:.....	17
3.4. Identificação Molecular.....	18
3.4.1. Extração do DNA genômico:.....	18
3.4.2. Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR):.....	18
3.5. Preservação dos isolados.....	19
3.6. Avaliação da susceptibilidade aos antibióticos.....	19
4. Resultados.....	19
4.1. Cultivo e Isolamento de Pseudomonas aeruginosa:.....	19
4.2. Caracterização Fenotípica dos isolados:.....	21
Figura 4. Resultados das Provas bioquímicas. SIM (S – Sulforeto, I – Indol, M – Motilidade).....	22
4.3. Caracterização Molecular dos isolados:.....	23
5 ETE - os 2 isolados do ponto 5 ETE também apresentaram os fragmentos correspondentes ao gênero Pseudomonas e à espécie aeruginosa (Figura 8).....	26
5c ETE - 5c ETE A e B não apresentaram fragmentos correspondentes ao gênero Pseudomonas e à espécie aeruginosa, 5c ETE E e F apresentaram fragmentos de	

618 e 956 bp correspondentes ao gênero <i>Pseudomonas</i> e a espécie aeruginosa respectivamente e 5c ETE C apresentou fragmento para o gênero <i>Pseudomonas</i> (Figura 8).....	26
4.4. Avaliação da susceptibilidade aos antibióticos.....	28
5. Discussão.....	29
11. Conclusões.....	33
12. Referências bibliográficas:.....	35
8. ANEXO 1.....	47
1. Meios de Cultura e Condições de Cultivo.....	47
2. Provas Bioquímicas.....	49
Meio de gelatina nutriente.....	53
Meio Básico de Moeller.....	54
Reagente de Kovacs.....	57
Inoculação e cultivo.....	58
3. Métodos de Preservação.....	58
4. Preparo de Géis e Tampões.....	59

Aos meus adorados pais por todos os dias de minha vida.

Agradecimentos

À minha orientadora Maysa, pelos ensinamentos, pela paciência e por ter me aceitado como sua aluna.

À minha irmã Teresa, pela força.

À Coordenação de Ensino da pós-graduação, pela oportunidade.

À Ana Paula (Aninha), pela paciência, tranquilidade e meiguice ao me ajudar no desenvolvimento do meu trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Microrganismos de Referência, Ivano, Cátia, Claudia Paula, Claudia, Jandira e Carlos, meu muito obrigado.

“Recomendo-lhes paixão e coragem no desempenho de seu trabalho”

Professor Darcy Fontoura de Almeida

1. Introdução

1.1. Resíduos de Serviços de Saúde

As civilizações sempre identificaram a água como fonte de vida e energia e os povoados humanos sempre se estabeleceram próximos aos locais que fornecessem este recurso natural. O crescimento desses povoados transformando-os em cidades e grandes metrópoles despertaram ainda mais a necessidade da água, uma vez que ela se caracteriza como fator essencial para sustento e a evolução da vida. Hoje, se não se respeitar a água em todas as suas ocorrências, a sobrevivência humana estará seriamente ameaçada ([Bustos, 2003](#)).

Além da preocupação com a água, a humanidade se deparou com outras necessidades, dentre elas a busca de soluções para os problemas de saúde. Para isso, construíram locais de assistência médica onde as enfermidades passaram a ser controladas a partir do atendimento aos doentes, graças aos recursos tecnológicos e farmacológicos cada vez mais sofisticados e eficientes. Com o início da assistência hospitalar, certamente houve o início de geração de Resíduos de Serviços de Saúde (RSS), entretanto somente há pouco mais de uma década este vêm se tornando um assunto bastante discutido, devido ao grande impacto ocorrido no campo da infecção hospitalar e no meio ambiente ([Ribeiro, 2005](#)).

Os RSS são aqueles gerados em hospitais, clínicas, ambulatórios e similares. Apresentam como principal característica o potencial de estarem contaminados com agentes patogênicos ([Associação Brasileira de Normas Técnicas - NBR 7.501, 1989](#)). Eles representam cerca de 1% da quantidade total dos resíduos gerados no país e têm um papel importante no cenário da saúde pública por serem uma fonte potencial de organismos patogênicos, pelo caráter infectante de alguns de seus componentes e pela heterogeneidade de sua composição, que pode conter substâncias tóxicas, radioativas, perfurantes e cortantes ([Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2005](#)).

A Pesquisa Nacional de Saneamento Básico, do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2000), mostra que apesar de 63% de um total de 5.507 municípios brasileiros pesquisados realizarem a coleta dos RSS, a maioria dos municípios brasileiros não utiliza um sistema apropriado para efetuar a coleta, tratamento e a disposição final dos RSS,.

Em relação aos riscos há , no Brasil, várias classificações de resíduos, entre as quais destacam-se as da Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT, do Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA e da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Quanto aos riscos potenciais ao meio ambiente e à saúde pública, os resíduos são classificados segundo as Normas Brasileiras Regulamentadoras (NBR) 10004 da ABNT (ABNT- NBR 7.500, 1994) em três classes: classe I, II e III, sendo que os resíduos de saúde são enquadrados na classe I - resíduos perigosos e, respectivamente, nas classes II e III, os “não inertes (e não perigosos)” e os “inertes”. No que se refere aos resíduos de serviços de saúde, a ABNT (NBR 12.807, 1993) os classifica em A, B e C. Na classe A estão incluídos os resíduos infectantes, que são subdivididos em biológico, sangue e hemoderivados, cirúrgico anatomopatológico e exsudativo, perfuro-cortante, animal-contaminado e aqueles provenientes da assistência ao paciente. A classe B inclui resíduos especiais, subdivididos em rejeito radioativo, resíduo farmacêutico e resíduo químico perigoso. A classe C é constituída pelos resíduos comuns.

Até o início dos anos 80 não havia no Brasil uma preocupação efetiva com relação ao gerenciamento e ao descarte adequado dos resíduos sólidos gerados pelos estabelecimentos de assistência à saúde bem como suas águas residuais. Com o aumento da carga poluidora nos corpos hídricos e devido às condições favoráveis no país à propagação de doenças veiculadas pela água, cada vez mais vem sendo dada ênfase à necessidade do controle ambiental em face à pesada interferência que tem sobre a saúde pública. A avaliação das características dos diferentes tipos de efluentes, os impactos que o descarte inadequado ou o não tratamento dos mesmos possam causar no ecossistema aquático e o procedimento adequado de controle dessas questões é o que têm direcionado as atuais pesquisas (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2005).

1.2. Resíduos Líquidos dos Serviços de Saúde e a Legislação Brasileira

No contexto de legislação, o Governo Federal através do Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA) e da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), órgãos de meio ambiente e de saúde pública, têm traçado normas objetivando minimizar os efeitos desastrosos do manejo incorreto dos rejeitos líquidos de qualquer origem. Assim sendo, o CONAMA editou a Resolução nº 283, de 12 de julho de 2001 (Brasil, 2001) em complementação aos procedimentos contidos na Resolução CONAMA nº 05, de 5 de agosto de 1993 (Brasil, 1993), relativos ao tratamento e destinação final dos resíduos dos serviços de saúde, com vistas a preservar a saúde pública e a qualidade do meio ambiente, hoje CONAMA nº 358/05 (Brasil, 2005). A seguir, a ANVISA fez publicar a Resolução da Diretoria Colegiada - RDC 306 de 7 de dezembro de 2004, que estabeleceu no seu item 11.18.3, que: *“Resíduos no estado líquido podem ser lançados na rede coletora de esgoto ou em corpo receptor, desde que atendam respectivamente as diretrizes estabelecidas pelos órgãos ambientais gestores de recursos hídricos e de saneamento competentes”*. E ainda no seu item 13.3.1 que *“Os resíduos líquidos provenientes de esgoto e de águas servidas de estabelecimentos de saúde devem ser tratados antes do lançamento no corpo receptor ou na rede coletora de esgoto, sempre que não houver sistema de tratamento de esgoto coletivo atendendo a área onde está localizado...”* (Brasil, 2004).

Na Cidade do Rio de Janeiro, existe um programa que objetiva adequar os sistemas de tratamento de esgoto nos hospitais da Prefeitura, administrado pela Subsecretaria de Águas Municipais (Rio-Águas) em parceria com a Secretaria Municipal de Saúde. As obras incluem a construção de estações próprias de tratamento, recuperação de redes de coleta e modernização dos equipamentos. A iniciativa impede que os resíduos hospitalares sejam jogados sem tratamento nos rios e lagoas da cidade, o que compromete a saúde pública e desrespeita as leis

ambientais. Este programa foi criado para atender a Lei Estadual nº 2.661, de 27 de dezembro de 1996 ([Rio de Janeiro, 1996](#)) que Regulamentou o disposto no art. 274 da Constituição do Estado do Rio de Janeiro no que se refere à exigência de níveis mínimos de tratamento de esgotos sanitários, antes de seu lançamento em corpos d'água e dá outras providências. Dentre outros artigos destacamos o Art. 8º - *“Os efluentes de hospitais, laboratórios, clínicas e estabelecimentos similares, em áreas que não disponham de sistema público de tratamento, deverão sofrer tratamento especial na origem, que impossibilite a contaminação dos corpos receptores por organismos patogênicos”*. E o seu parágrafo 2º - *“Cabe aos hospitais, laboratórios, clínicas ou estabelecimentos similares a responsabilidade técnica e econômica pelo projeto, construção e operação das instalações de tratamento necessárias ao cumprimento do disposto no caput”*. Sendo que tanto os serviços públicos de saúde quanto os da rede privada, obrigatoriamente, deverão cumprir tais exigências.

É importante destacar que, de acordo com a Resolução CONAMA 20/86 ([Brasil, 1986](#)), o tratamento dos efluentes pode variar muito dependendo do tipo de efluente tratado e da classificação do corpo de água que irá receber esse efluente. Quanto à classificação, o efluente deve ser devolvido ao rio tão limpo ou mais limpo do que ele próprio, de forma que não altere suas características físicas, químicas e biológicas. Em alguns casos, como por exemplo, quando a bacia hidrográfica está classificada como sendo de classe especial, nenhum tipo de efluente pode ser jogado ali, mesmo que tratado. Isso porque esse tipo de classe se refere aos corpos de água usados para abastecimento. A Resolução 20/86, foi em 2005 revogada pela Resolução CONAMA 357/05 ([BRASIL, 2005](#)), e depois alterada pela Resolução CONAMA 370/06 ([BRASIL, 2006](#)), sendo, porém, mantido o que anteriormente fora previsto

1.3. Características Microbiológicas dos RSS

Entre os principais microrganismos presentes em esgotos estão as bactérias, os fungos, os vírus e as algas. As bactérias constituem um dos elementos mais importantes deste grupo de organismos, responsáveis pela decomposição e estabilização da matéria orgânica, tanto na natureza como nas unidades de tratamento biológico. No entanto, a presença de microrganismos patogênicos e compostos químicos nos recursos hídricos é um importante meio de transmissão de várias doenças, sendo o despejo de esgoto sem tratamento o mais freqüente fator de contaminação. As doenças veiculadas pela água estão entre uma das causas comuns de morte no mundo e afetam especialmente países em desenvolvimento. Estima-se que 25% dos leitos hospitalares no mundo estejam ocupados por pacientes com doenças transmitidas por veiculação hídrica (Straub & Chandler, 2003). Portanto, o ambiente hospitalar é alvo de preocupação por parte da sociedade devido ao grande número de doentes em um mesmo local e pela diversidade de microrganismos encontrados, que estariam presentes também nos resíduos gerados (Coelho, 2000).

O efluente hospitalar demonstra características similares ao esgoto doméstico e industrial por apresentar entre seus componentes patógenos como vírus, bactérias, protozoários e helmintos, que ocasionam muitas doenças com implicações em saúde pública.

Segundo Morel e Bertussi Filho (1997) os primeiros estudos realizados com o intuito de caracterizar as unidades geradoras de RSS, em termos qualitativos e quantitativos, foram realizados em 1978, quando foi identificada uma série de microrganismos presentes na massa de resíduos indicando-lhes o potencial de risco, recomendando cuidados de gerenciamento como acondicionamento e coleta. Neste estudo, foram identificados: *Salmonella typhi*, *Shigella sp.*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*. A possibilidade de sobrevivência de vírus na massa de resíduos sólidos foi comprovada para o vírus da poliomielite tipo I, vírus da hepatite A e B, influenza, vaccínia e vírus entéricos.

Tsai, *et al.* (1998) detectaram no efluente hospitalar a presença de coliformes totais, coliformes fecais, estreptococos fecais, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella* sp. Além disso, os hospitais liberam, em seu esgoto, uma variedade de substâncias tais como fármacos, antibióticos, desinfetantes, anestésicos, metais pesados e drogas não metabolizadas por pacientes (Kummerer, 2001; Emmanuel *et al.*, 2005). A disposição conjunta dos resíduos contendo microrganismos e substâncias químicas, no ambiente, pode provocar um aumento das populações bacterianas resistentes a certos antibióticos, detectadas no esgoto de hospitais (Kummerer, 2003). Os microrganismos presentes contaminam o solo, inclusive os lençóis subterrâneos águas superficiais e os ambientes aquáticos, sendo responsáveis pelas doenças de veiculação hídrica. *P. aeruginosa*, *Escherichia coli*, e *Staphylococcus aureus* são microrganismos de grande interesse por estarem geralmente envolvidos na infecção hospitalar (Garcia e Zanetti-Ramos 2004). Bidone (2001) ressalta que esses microrganismos são os mais freqüentemente encontrados em análises microbiológicas dos resíduos de serviços de saúde.

A presença de microrganismos resistentes em efluentes hospitalares é preocupante quando se avalia o potencial de risco relacionado à disseminação de genes de resistência aos antimicrobianos (Prado, 2007). Quiteira & Peixe (2006) detectaram genes de resistência aos antibióticos beta-lactâmicos em cepas de *P. aeruginosa* isoladas de fonte não hospitalar, sugerindo que os mesmos são provavelmente de origem nosocomial. Assim, o esgoto deve ser considerado como uma fonte relevante de espécies bacterianas com diferentes perfis de resistência e possui um grande potencial para contaminação de rios e águas costeiras quando não tratado devidamente.

É importante esclarecer que o tratamento de esgoto seja domiciliar ou hospitalar, pode ser separado em 4 níveis básicos: nível preliminar, tratamento primário e tratamento secundário que tem quase a mesma função, e tratamento terciário ou pós-tratamento. Cada um deles tem, respectivamente, o objetivo de: remover os sólidos suspensos (lixo, areia), remover os sólidos dissolvidos, a matéria orgânica, e os nutrientes e organismos patogênicos sendo que o nível

terciário varia de acordo com o tipo de estação de tratamento, podendo ser, basicamente, o uso de um recurso físico ou químico (Borsoi, 1997). No Brasil, as características de efluentes hospitalares e os dados da eficiência dos sistemas de tratamento que operam em escala real ainda são pouco conhecidos.

1.4. *Pseudomonas aeruginosa*

Em 1894, Migula, citado por Palleroni (2005), propôs o gênero *Pseudomonas* para classificar as bactérias inicialmente incluídas no gênero *Monas*. Primitivamente, o gênero *Pseudomonas* continha uma única espécie *Pseudomonas violaceae* que foi descrita como uma espécie móvel graças a único flagelo polar (Migula, 1900). De fato a *Pseudomonas violaceae* (hoje, *Chromobacterium violaceum*) é móvel graças a um flagelo polar e a 1, 2, 3 ou 4 flagelos laterais. Ele incluiu no gênero *Pseudomonas*, bactérias possuidoras de cílio monotríquio ou multitríquios na espécie *Pseudomonas pyocyaneae* (hoje, *Pseudomonas aeruginosa*) (Ibid). Posteriormente, o gênero *Pseudomonas* incluiu um grande número de espécies (294 espécies são citadas na 8ª Edição do “*Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*”). Ele é constituído de bastonetes Gram negativos, móveis (cílio polar) ou imóveis e com metabolismo oxidativo (Palleroni, 2005)

P. aeruginosa pertence à família Pseudomonadaceae (Palleroni, 1973), caracteriza-se como bastonete Gram-negativo reto ou ligeiramente curvo, aeróbio estrito, podendo ser observado como células isoladas, aos pares, ou em cadeias curtas, revelando mobilidade através de flagelo polar monotríqueo (Pollack, 1995). A pioverdina e a piocianina são pigmentos fluorescentes difusíveis no meio de cultura produzidos por este microrganismo. Algumas cepas produzem um pigmento avermelhado (piorrubina) ou preto (piomelanina) (Ibid.).

É um dos microrganismos mais ubiqüitários, pois é encontrado no solo, na água, nos vegetais causando patologias (Franco; Landgraf, 2003), nos animais, nos alimentos (Forsythe, 2002), no esgoto, no intestino dos mamíferos, nos fluidos de infusão, desinfetantes, cosméticos (Balows et al, 1991) e nos mais diversos

ambientes hospitalares, incluindo equipamentos médicos e farmacêuticos. Um estudo identificou a presença desse microrganismo nas águas das torneiras de uma unidade de terapia intensiva (Trauttman *et al*, 2001). Devido a sua natureza ubíqua, sua habilidade de sobreviver em condições adversas e a afinidade por ambientes úmidos, *Pseudomonas aeruginosa* é comumente encontrado no ambiente hospitalar, sendo um dos patógenos mais importantes, especialmente em unidades de pacientes queimados e imunocomprometidos (Mokaddas; Sanyal, 1999).

Um estudo envolvendo um surto de bacteriemia em um Centro de Hemodiálise de um hospital de Campinas, São Paulo, Brasil (Pisani *et al*, 2000) identificou a presença da *P. aeruginosa* em 80% das amostras de água coletadas em diferentes pontos do sistema de hemodiálise e das amostras dos pacientes dialisados. Infecções causadas por esse microrganismo são de difícil tratamento em função da sua virulência, da resistência intrínseca e adquirida aos antibióticos e, relativamente, a pouca disponibilidade de agentes antimicrobianos (Chuanchuen *et al*, 2002; Zavascki *et al* 2005). Além disto são particularmente resistentes aos biocidas (anti-sépticos, desinfetantes, preservantes) (Mac Donnell & Russell, 1999; Higgins *et al*, 2001; Stickler, 2004).

Informações sobre os patógenos envolvidos em casos de infecção hospitalar são importantes, e para tal existem sistemas de vigilância para este monitoramento. Em 1996, o sistema National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS), conduzido pelo programa de infecções hospitalares do Centers for Disease Control and Prevention (CDC), nos Estados Unidos descreveu a *P. aeruginosa* como a principal causa de infecção hospitalar dentre todos os patógenos relacionados com a pneumonia em Unidades de Terapia Intensiva (Richards *et al*, 1999). A *P. aeruginosa* aparece ainda, como o 4º agente de infecção de sítio cirúrgico, o 5º de infecções hospitalares em geral e o 6º de infecções da corrente sanguínea (NNISS, 1996).

Na América Latina, o sistema SENTRY – Programa de Vigilância Epidemiológica e de Resistência Antimicrobiana, fornece dados sobre a ocorrência de *P. aeruginosa* em infecções hospitalares, tendo sido este o

microrganismo mais freqüentemente detectado entre os patógenos bacterianos de pacientes com pneumonia, internados em 10 centros médicos de seis países da América Latina (Sade *et al*, 1998). O SENTRY reportou, no tocante à sensibilidade antimicrobiana, uma reduzida sensibilidade à ceftazidima, que tendo apresentado em 1997, um percentual de 66,6, em 2001 passou a 59,5 %. Quanto às fluoroquinonas, apenas 50 a 60% das amostras se mostraram sensíveis assim como para os aminoglicosídios; 62,1 % dos isolados foram sensíveis à amicacina e 55% à gentamicina. Um fato preocupante foi a diminuída sensibilidade ao imipenem (69,8%), antibiótico de ultima geração com amplo espectro de atividade antibacteriana, muitas vezes utilizado, como última alternativa terapêutica, em casos considerados extremos (Trabulsi & Althertun, 2004).

Um estudo epidemiológico realizado em Hospital Universitário da cidade do Rio de Janeiro mostrou que dentre as 24 espécies bacterianas identificadas nos casos de infecção hospitalar (agosto de 1995 a julho de 1997), a *P. aeruginosa* foi o segundo agente mais predominante com uma freqüência de 18,5% no total dos isolados clínicos, sendo superado apenas pelo *Staphylococcus aureus* de freqüência igual a 21,0% (Aseni *et al*, 2000).

A patogenicidade dos bastonetes Gram negativos não fermentadores depende da aderência a células hospedeiras, produção de polissacarídeos (alginate), toxinas extracelulares, resistência aos fatores bactericidas do soro e presença de lipopolissacarídeo de parede celular (endotoxina) (Arnou & Flaherty, 1996). As fímbrias ou *Pili* que se estendem a partir da superfície celular são responsáveis pela aderência da bactéria aos receptores do gangliosídeo GM-1, que estão presentes na superfície das células epiteliais do hospedeiro (Irvin *et al*, 1989). Dentre os fatores de virulência extracelulares, que facilitam o rompimento da integridade epitelial, podem ser citadas as elastases, protease alcalina, fosfolipase C, neuraminidase, exoenzima S, lectina e as proteases como hemolisinas e exotoxinas (Jaffar-Bandjee *et al*, 1995).

A resistência natural e adquirida da *P. aeruginosa* aos diversos antibacterianos de uso comum deve-se: à produção de uma β -lactamase cromossomial, à impermeabilidade da membrana, à capacidade de colonizar

superfícies em forma de biofilme, à presença de sistemas de efluxo e à aquisição de plasmídios de resistência transferidos por processo de transdução e conjugação. Todos esses fatores, que podem ser expressos de forma individual ou combinados, fazem com que poucos antibióticos sejam eficientes. Recentemente, tem-se dado importância ao aparecimento de β -lactamase de amplo espectro de atividade, bem como o surgimento de carbapenemases que degradam o imipenem e/ou meropenem, que são antibióticos do grupo dos carbapênicos, que teriam a propriedade de inativar as β -lactases. Embora restrito a alguns países, no Brasil, já têm sido reportados casos esporádicos, como é o caso do estudo desenvolvido por Santos Filho *et al* (2001) em amostras de *P. aeruginosa* na capital do estado da Paraíba (2001) e ainda o estudo desenvolvido na cidade de Uberlândia, Minas Gerais por Cezario *et al* (2005).

1.5. Identificação Fenotípica

Técnicas fenotípicas são definidas como técnicas que analisam as características expressas pelos microrganismos, ou seja, que resultam da expressão de genes que podem sofrer variações, baseados em mudanças nas condições de crescimento, fase de crescimento e mutação espontânea (Tenover, 1995). Para realizar as análises de identificação vários métodos clássicos têm sido empregados, destacando-se a biotipagem, sorotipagem, fagotipagem, tipagem de piocinas, perfis de resistência a antimicrobianos, entre outras técnicas fenotípicas (Arbeit, 1995; Tenover *et al*, 1995; Lipuma, 1998).

Para a classificação da espécie *P. aeruginosa*, devem ser consideradas algumas características metabólicas. Ela é um microrganismo não fermentador de carboidratos, é produtora de citocromo-oxidase, utiliza o nitrato em substituição ao oxigênio como aceptor final de elétrons (portanto é anaeróbico facultativo) produzindo também arginina-dehidrolase e ornitina-descarboxilase. Porém alternativamente, é capaz de utilizar outras fontes de carbono, como o acetato, por exemplo. Pode crescer rapidamente nos meios mais simples de cultura numa ampla faixa

de temperaturas (4°C a 42°C), em face à sua versatilidade nos requerimentos nutricionais e energéticos. Cresce formando colônias iridescentes irregulares. Outra importante característica é produção de odor adocicado de frutas (semelhante a uvas ou milho), produto de uma aminoacetona liberado pelo microrganismo (Trabulsi & Althertun, 2004).

A *P. aeruginosa* é facilmente reconhecida nos meios de isolamento primário com base na sua morfologia colonial característica com colônias que é geralmente plana e espalhada com bordas irregulares e brilho metálico (associado com autólise da colônia). Podem apresentar outras morfologias, incluindo lisas, mucóides e anãs (pequenas colônias variantes). Podem apresentar certas variações no fenótipo, uma vez que isolados sem atividade oxidativa têm sido reportados ocasionalmente, no entanto, eles exibem outras características típicas (Blonder-Hill et al, 2007). Terapias com agentes antimicrobianos que afetam a síntese protéica podem causar o aparecimento de fenótipos aberrantes. Isolados mucóides, como os freqüentemente encontrados em pacientes com fibrose cística, podem sofrer várias mudanças fenotípicas, incluindo crescimento lento, perda de mobilidade e perda da produção de pigmento (Ibid).

Ainda como característica importante é a formação em meio de cultura líquido e sólido, de uma camada de aspecto mucóide denominada “*slime*”, que é um elemento essencial na formação de biofilmes (Trabulsi & Althertun, 2004).

1.6. Identificação Molecular

Os métodos microbiológicos tradicionais baseados em características fenotípicas, como propriedades morfológicas, fisiológicas e bioquímicas, governaram por décadas a taxonomia microbiana e forneceram informação descritiva para a estruturação de diversos taxa bacterianos.

Com o advento da taxonomia numérica (Sneath & Sokal, 1962) e o surgimento da computação, dados fenotípicos começaram a ser analisados por coeficientes numéricos que expressam similaridade entre linhagens com o auxílio

de um computador. Nos últimos 40 anos, com o desenvolvimento nas áreas de química, biologia molecular, estatística e informática, a taxonomia de procaríotos sofreu profundas alterações na direção de um sistema que refletisse as relações evolutivas entre os organismos aproximando a classificação microbiana o melhor possível da realidade biológica.

[Busch & Nitschko \(1999\)](#) relataram que as metodologias que envolvem ácidos nucleicos foram reconhecidas como ferramentas para identificação de microrganismos por oferecerem resultados rápidos, precisos e reprodutíveis quando comparados aos métodos baseados nas características fenotípicas. Uma das principais estratégias de identificação bacteriana consiste, na análise do gene codificador da subunidade 16S ribossomal. A amplificação pela reação em cadeia pela polimerase (PCR) desse gene oferece a possibilidade de identificação bacteriana através de um único par de iniciadores, específicos para regiões conservadas do rDNA ([Drancourt, 2000](#)). Este método pode implementar e concluir a identificação bacteriana fenotípica, por ser um gene de distribuição universal entre as bactérias e por apresentar regiões variáveis espécie específicas ([Weisburg et al, 1991](#)). Esta abordagem tem sido extensivamente adotada, e possui atualmente um dos maiores bancos de dados, o que possibilita a identificação de um grande número de organismos ([Van de Peer et al, 1996](#)).

Embora tenha sido bastante utilizado por muitos laboratórios, sua implementação requer um investimento inicial alto envolvendo a aquisição de equipamentos sofisticados e reagentes caros, o que limita sua ampla utilização ([De Boer; Beumer, 1999](#)).

1.7. Estação de Tratamento de Esgotos do Complexo hospitalar Lourenço Jorge/ Leila Diniz

O Hospital Municipal Lourenço Jorge, que tem perfil de grande emergência possui 258 leitos, distribuídos entre os setores de cirurgia geral, bucomaxilofacial, e ortopediatraumatologia; clinica geral, neonatologia e de AIDS, UTI adulto,

unidade intermediária neonatal, unidade de isolamento, unidade intermediária, UTI neonatal, obstetrícia clínica e cirúrgica, pediatria clínica, fisiologia e psiquiatria. A Maternidade Leila Diniz, por sua vez, possui 105 leitos distribuídos nos setores de cirurgia geral e ginecológica, clínica geral e neonatologia, UTI neonatal, unidade intermediária neonatal, obstetrícia clínica e cirúrgica. As duas unidades totalizam 363 leitos ([Cadastro Nacional Estabelecimentos de Saúde - CNESNet-MS, 2004](#)).

A Estação de Tratamento de Esgotos do complexo Lourenço Jorge-Leila Diniz realiza o tratamento classificado como terciário, ou seja, além de realizar a fase primária e secundária, completa o tratamento com uma fase terciária que, no caso específico desta estação, se trata da adição de um processo químico.

Na fase de tratamento primário, os dejetos do complexo HLJ/MLD chegam por canalizações, passivamente por efeito gravitacional, à estação de tratamento e são direcionados a um poço situado abaixo do nível da edificação, onde ocorre a remoção, através de grades, dos sólidos grosseiros e da areia, para que sejam protegidas as demais unidades de tratamento, além dos dispositivos de transporte (bombas e tubulações) e os corpos receptores. Neste poço, cujas mensurações permitem o acesso das equipes de inspeção e operação da unidade, o afluente percorre por calhas (abertas), e por uma em especial, calha Parshall, onde é medida, por períodos pré-determinados, a vazão do líquido. Com o auxílio de bombas de recalque, a massa líquida é transferida para tanques de aeração, onde é injetado, por um período pré-determinado, oxigênio puro em grande quantidade para que seja estimulada a multiplicação da flora bacteriana aeróbica, iniciando-se a fase de tratamento secundário. Nessa fase há uma intensa multiplicação bacteriana com a síntese da matéria orgânica. Após a fase em que é feita a degradação biológica, os sólidos produzidos são depositados no fundo dos tanques formando o lodo (lodo primário), a parte líquida é dirigida aos tanques de decantação e o sobrenadante flui vagarosamente pelos decantadores e destes para os tanques de esgoto tratado. No fundo dos tanques de decantação também há formação de um lodo que juntamente com o lodo primário, retornam ao tanque de aeração para mais uma vez refazer o ciclo e ter melhor rendimento do efluente.

O esgoto tratado é então encaminhado a um tanque de passagem de dimensões menores que os anteriores, localizado na área externa à estação onde é adicionado, por gotejamento, Hipoclorito de sódio, que é a fase terciária de tratamento. A quantidade do Hipoclorito é calculada de acordo com a vazão de saída do efluente e provém de uma “bomba dosadora”, instalada no núcleo central de operações da estação de tratamento. O efluente clorado, ainda percorre um trecho composto por chicanas que servem para misturar o líquido e é então incorporado à bacia lagunar da região. O lodo resultante de todo o processo de tratamento é estocado e retirado periodicamente por caminhões-tanque, sendo o destino final, as indústrias de fertilizantes.

Conforme abordado, o descarte dos efluentes hospitalares, por exigência legal, deverá sofrer tratamento prévio, com a finalidade de minimizar a contaminação dos corpos receptores e evitar o descumprimento das leis ambientais e o comprometimento da saúde pública. Este novo estudo propõe a avaliação da eficiência desse tratamento através da detecção e monitoramento de *Pseudomonas aeruginosa* nas diferentes etapas de uma planta de tratamento de esgoto de hospitalar, com objetivo de colaborar para o aprimoramento dos serviços de vigilância ambiental e epidemiológica, e da prevenção de doenças advindas dos recursos hídricos.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Avaliar a eficiência de uma planta de tratamento de esgoto hospitalar através da detecção e caracterização da *Pseudomonas aeruginosa* em uma Unidade de Saúde do Município do Rio de Janeiro

2.2. Objetivos Específicos

- Realizar a coleta de amostras em seis pontos da estação de tratamento de esgoto hospitalar, no complexo do Hospital Municipal Lourenço Jorge e Maternidade Leila Diniz, Rio de Janeiro;
- Realizar o cultivo e o isolamento de cepas de *P. aeruginosa* em meio de cultura seletivo;
- Identificar os isolados do meio seletivo por meio de provas bioquímicas convencionais;
- Realizar identificação molecular do gênero *Pseudomonas* e da espécie *Pseudomonas aeruginosa*, pela reação em cadeia pela polimerase do gene 16S rRNA, através de iniciadores específicos;
- Analisar a susceptibilidade das cepas de *P. aeruginosa* isoladas frente a representantes de algumas classes de antibióticos;
- Avaliar o comportamento microbiológico da *P. aeruginosa* nas diferentes etapas do tratamento do efluente;
- Avaliar a eficiência da estação com objetivo de alertar para o aprimoramento dos serviços de vigilância ambiental e epidemiológica e a prevenção de doenças advindas dos recursos hídricos.

3. Materiais e Métodos

3.1. Local de Estudo:

Hospital Municipal Lourenço Jorge e Maternidade Leila Diniz, na Barra da Tijuca:

Possuem um total de 360 leitos e 1800 funcionários. Neles são realizados cerca de 30 mil atendimentos mensais e são lavadas 300 kg de roupa por dia. A estação de tratamento que atende as duas unidades tem capacidade para tratar 220 metros cúbicos de esgoto por dia, evitando que ele seja despejado sem tratamento nos rios da região (Figura 1 A e 1B).

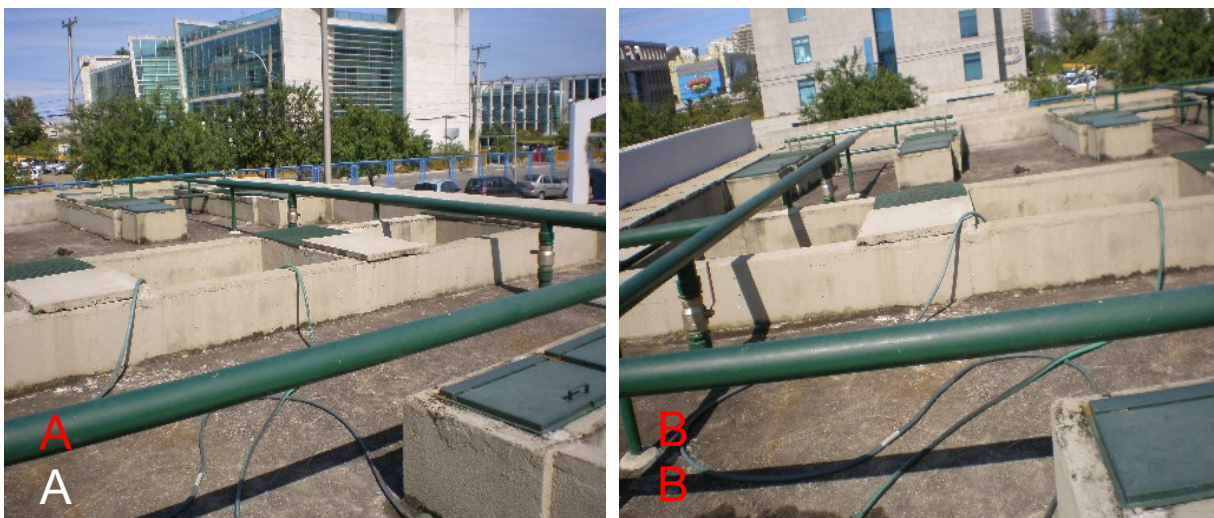


Figura 1: Vista panorâmica da estação de Tratamento (A, B).

3.2. Coleta:

Foram coletadas 6 amostras correspondentes a cada uma das etapas da estação de tratamento : amostra 1 - ETE 1 (chegada do esgoto); amostra 2 - ETE 2 (tanque de aeração); amostra 3 - ETE 3 (tanque de decantação); amostra 4 ETE - 4 (sedimento tanque de decantação), amostra 5 - ETE 5 (esgoto tratado) e amostra 6 - ETE 5c (esgoto tratado e clorado). As amostras foram coletadas em frascos estéreis e mantidas no gelo e transportadas ao laboratório em recipiente isotérmico.

3.3 Identificação Fenotípica

3.3.1. Condições de cultivo:

As amostras coletadas foram semeadas em caldo nutriente, ágar nutriente e ágar cetrimide, incubados por 24h a 37°C (Anexo1). Os microrganismos de referência foram cultivados nas condições e meios de cultivo recomendados pela ATCC(American Type Culture Collection).

3.3.2. Identificação:

Todas as colônias isoladas foram submetidas à coloração de Gram e às provas bioquímicas convencionais: OF glicose, xilose, manitol, lactose, lisina, arginina, ornitina descarboxilase, gelatina, SIM, incubação a 42°C, oxidase e catalase (Anexo 1).

3.4. Identificação Molecular

3.4.1. Extração do DNA genômico:

Após o crescimento das colônias suspeitas nas condições estabelecidas, o DNA genômico foi extraído e purificado segundo o Appendix D: Purification of Genomic DNA from Gram-Negative Bactéria do Dnaeasy Tissue Kit (Qiagen). Uma alça bacteriológica do crescimento bacteriano foi ressuspensa no tampão indicado e seguiram-se todos os procedimentos de acordo com as instruções do fabricante.

3.4.2. Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR):

A mistura para o PCR teve um volume total de 50 µl por reação, contendo os seguintes reagentes: iniciadores para o gênero *Pseudomonas*: PA-GS-F 5'-GACGGGTGAGTAATGCCTA e PA-GS-R CACTGGTGTTCCTTCCTATA, iniciadores para *P. aeruginosa* PA-SS-F 5'-GGGGATCTTCGACCTCA-3' e PA-SS-R 5'-TCCTTAGAGTGCCACCCG-3', (50 pmol cada) (Spilker et al., 2004); 5,0 µl de 10x PCR Buffer (500mM KCl, 100mM Tris HCl [pH 9.0]); 200µM (cada) dATP, dCTP, dGTP e dTTP; 1U *Taq* polimerase, 2mM MgCl₂ e água deionizada q.s.p 50 µ l. A esta mistura foi adicionado ~30 ng do DNA a ser analisado e a amplificação ocorreu nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos; 25 ciclos: 94°C por 20 segundos, 55°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto, uma extensão adicional a 72°C por 7 minutos. Os produtos do PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose, a 1.5% (p/v) em tampão TBE 0,5 X; o gel foi revelado com brometo de etídio (3 mg/ml), analisado e documentado pelo sistema de vídeo documentação "ImageMaster VDS" (Pharmacia).

3.5. Preservação dos isolados

Logo após o isolamento, as cepas foram preservadas em glicerol 20% e estocadas a – 20°C. Após as identificações fenotípica e molecular, os isolados foram preservados por liofilização e armazenados na Coleção de Microrganismos do INCQS/FIOCRUZ (Anexo1).

3.6. Avaliação da susceptibilidade aos antibióticos

A avaliação da susceptibilidade aos antibióticos foi realizada de acordo com o Método de Difusão de discos em ágar de Kirby-Bauer modificado segundo o CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute – 2005). Os antibióticos escolhidos, segundo o CLSI, foram: cefepime (30 µg); imipeném (10 µg); aztreonam (30 µg); gentamicina (10 µg); ciprofloxacina (5 µg) e norfloxacina (10 µg); O controle da qualidade dos discos de antibióticos foi realizado frente à *P. aeruginosa* INCQS 00099, lote 1107099 (ATCC 27853) .

4. Resultados

4.1. Cultivo e Isolamento de *Pseudomonas aeruginosa*:

Foram coletadas amostras em seis diferentes pontos da estação de tratamento assim definidas; ponto 1 – esgoto da saída do hospital, ponto 2 – tanque de aeração, ponto 3 – tanque de decantação, ponto 4 – lodo, ponto 5 – efluente tratado, e ponto 5C - efluente tratado e clorado. As amostras correspondentes aos 6 pontos da estação de tratamento, que passaram a ser denominadas 1 ETE , 2 ETE , 3 ETE , 4 ETE , 5 ETE e 5c ETE, foram semeadas em ágar nutriente e ágar cetrímide e apresentaram crescimento após 24h de incubação. Para prosseguimento das análises foram utilizados os crescimentos bacterianos do ágar cetrímide, por ser o meio de cultura seletivo para a *P. aeruginosa*. A amostra da etapa 1, correspondente ao esgoto antes da entrada na

estação, apresentou colônias brancas e de cor creme, no ágar nutriente, e ausência total de crescimento no ágar cetrímide. Ao contrário, as amostras das outras 5 etapas apresentaram coloração que variou do amarelo claro ao verde intenso. (Figura 2). O crescimento bacteriano em caldo nutriente, da etapa 1 ETE, foi inoculado no meio de cultura líquido letheen, onde apresentou crescimento após 72h de incubação. Este crescimento foi semeado em ágar cetrímide, resultando em um crescimento amarelado. (Figura 3)

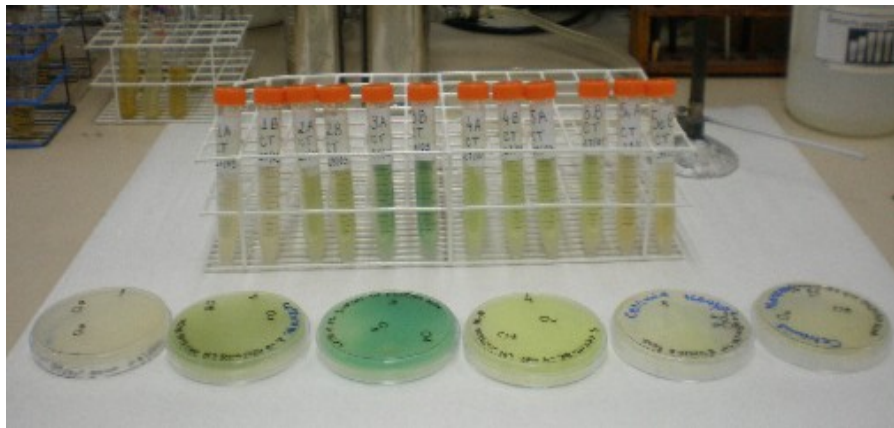
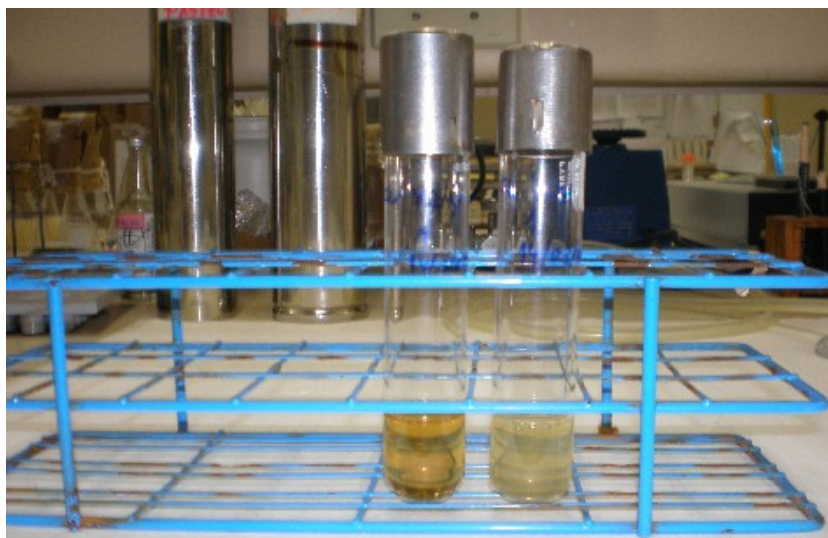


Figura 2: Crescimento bacteriano em Ágar Cetrímide. **1.** 1 ETE; **2.** 2 ETE; **3.** 3 ETE; **4.** 4 ETE; **5.** 5 ETE e **5c.** 5c ETE.



A B

Figura 3: Crescimento bacteriano **A.** Caldo Nutriente; **B.** Caldo Letheen

4.2. Caracterização Fenotípica dos isolados:

A partir do cultivo em ágar cetrímide, foram isoladas um total de 25 colônias das 6 diferentes etapas da estação de tratamento. Inicialmente, essas colônias foram submetidas à Coloração de Gram e apresentaram células Gram negativas na forma de pequenos bastonetes. Posteriormente os isolados foram submetidos às provas bioquímicas (Tabela 1). A figura 4 mostra o gráfico correspondente às porcentagens de positividade frente aos testes realizados.

De acordo com os resultados das provas bioquímicas 14 cepas (56%) foram identificadas como *P. aeruginosa*: 1 (ETE 1), 2 (ETE 2), 2 (ETE 3), 2 (ETE 4), 2 (ETE 5) e 5 (ETE 5c).

TABELA I – Resultados das Provas Bioquímicas

Amostr a	Número	OF glicose (aberto)	OF glicose (fech ado)	Xilo se	Mani tol	Lact ose	S	I	M	Gelatin a	Lisina	Argini na	Urniti na	Mac Conk ey	Oxidás e	Cresc. 42 C	Cetrímide
1 ETE F1	1	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Neg	Neg	M	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	LAC-	Positivo	Positivo	inalterado
1 ETE F2	1	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Neg	Neg	M	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	LAC-	Positivo	Positivo	inalterado
1 ETE E	1	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Neg	Neg	M	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	LAC-	Negativo	Positivo	inalterado
1 ETE E1	1	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Neg	Neg	M	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	LAC-	Positivo	Positivo	amarelo
1 ETE F	1	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Neg	Neg	M	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	LAC-	Negativo	Positivo	inalterado
1 ETE A	1	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Neg	Neg	M	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	LAC-	Negativo	Positivo	inalterado
1 ETE G	1	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Neg	Neg	M	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	LAC-	Negativo	Positivo	inalterado
2 ETE A	1	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Neg	Neg	M	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	LAC-	Positivo	Positivo	amarelo/verde
2 ETE B	1	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Neg	Neg	M	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	LAC-	Positivo	Positivo	amarelo/verde
3 ETE B1	1	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Neg	Neg	M	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	LAC-	Positivo	Positivo	verde
3 ETE B2	1	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Neg	Neg	M	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	LAC-	Positivo	Positivo	verde
3 ETE E	1	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Neg	Neg	M	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	LAC-	Positivo	Positivo	verde
3 ETE C	1	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Neg	Neg	M	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	LAC-	Positivo	Positivo	verde
3 ETE F	1	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Neg	Neg	M	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	LAC-	Positivo	Positivo	verde
3 ETE D	1	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Neg	Neg	M	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	LAC-	Positivo	Positivo	verde
3 ETE A	1	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Neg	Neg	M	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	LAC-	Positivo	Positivo	verde
4 ETE A	1	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Neg	Neg	M	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	LAC-	Positivo	Positivo	verde claro
4 ETE B	1	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Neg	Neg	M	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	LAC-	Positivo	Positivo	verde claro
5 ETE B	1	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Neg	Neg	M	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	LAC-	Positivo	Positivo	verde/amarelo
5 ETE A	1	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Neg	Neg	M	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	LAC-	Positivo	Positivo	verde/amarelo
5c ETE A	1	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Neg	Neg	M	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	LAC-	Positivo	Positivo	verde/amarelo
5c ETE E	1	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Neg	Neg	M	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	LAC-	Positivo	Positivo	verde/amarelo
5c ETE B	1	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Neg	Neg	M	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	LAC-	Positivo	Positivo	verde/amarelo
5c ETE F	1	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Neg	Neg	M	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	LAC-	Positivo	Positivo	verde/amarelo

Tabela 1. Resultados das Provas Bioquímicas. OF - oxidação/fermentação; SIM - H₂S/ Indol/ Mobilidade.

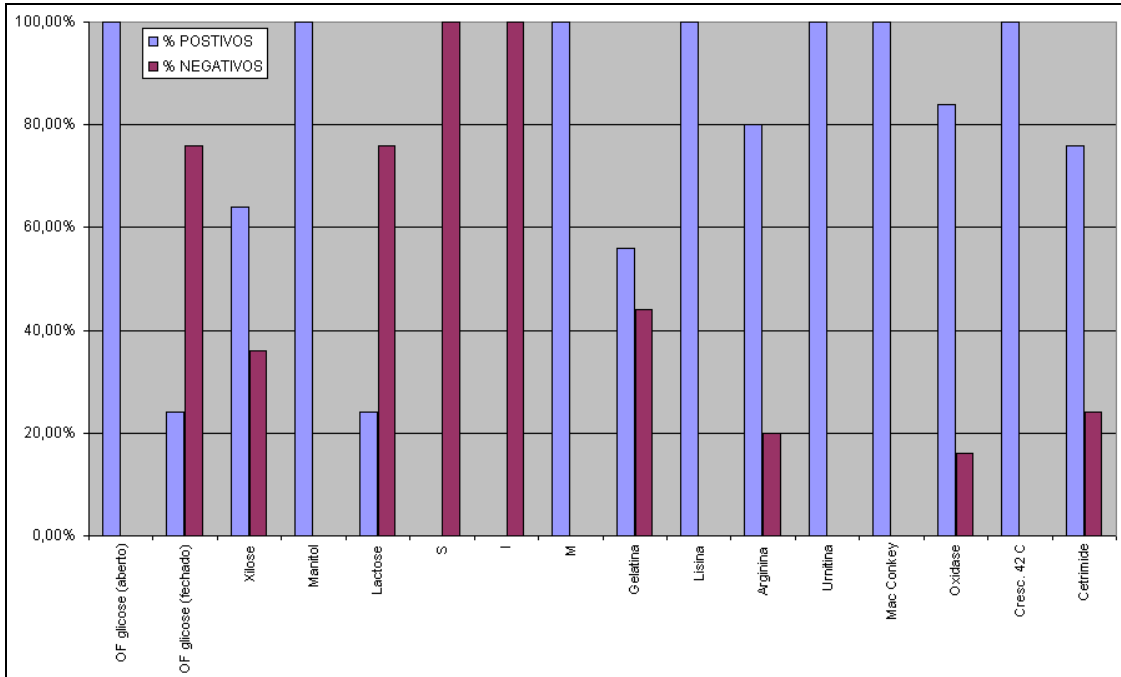


Figura 4. Resultados das Provas bioquímicas. SIM (S – Sulfureto, I – Indol, M – Motilidade)

4.3. Caracterização Molecular dos isolados:

A especificidade dos iniciadores para o gênero *Pseudomonas* e para a espécie *aeruginosa* foi demonstrada pelas reações da PCR frente a 8 espécies do gênero *Pseudomonas* : *P. aeruginosa* INCQS 00311, *P. aeruginosa* INCQS 00025, *P. aeruginosa* INCQS 00026, *P. alcaligenes* INCQS 00069, *P. fluorescens* INCQS 00077, *P. putida* INCQS 00113, *P. stutzeri* INCQS 00520 e *Stenotrophomonas maltophilia* INCQS 00103. Todas as espécies analisadas apresentaram fragmento de 600 bp correspondente ao gênero *Pseudomonas*, a *Escherichia coli* INCQS 00310 não apresentou amplificação (Figura 5A). Em relação à espécie, as três *P. aeruginosa* de referência utilizadas apresentaram fragmento de 956 bp correspondente a *P. aeruginosa* e as cepas de espécies diferentes não apresentaram amplificação (Figura 5B)

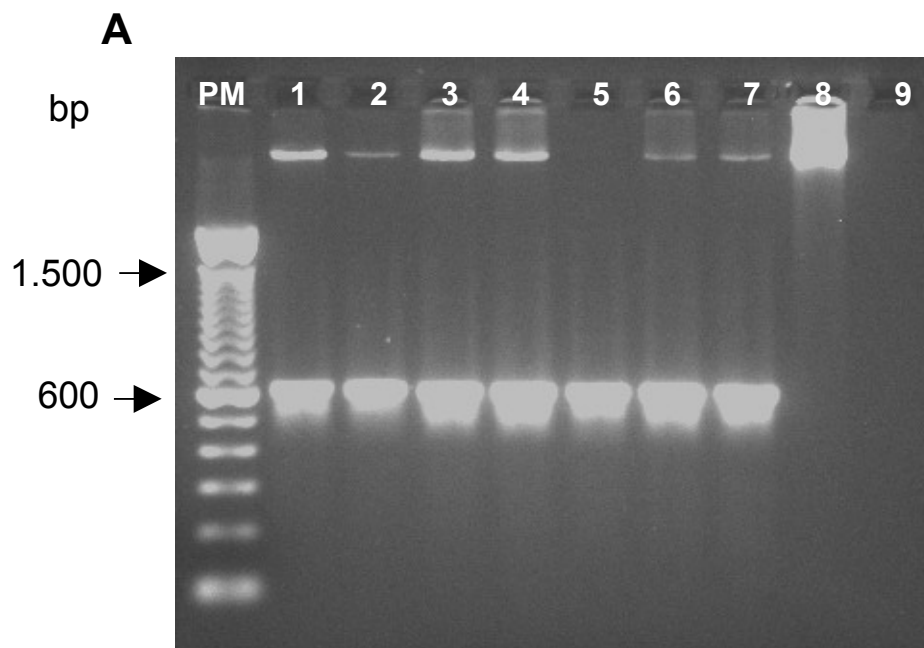


Figura 5A. Especificidade dos iniciadores para o gênero *Pseudomonas*. PM. peso molecular 100 bp; 1. *P. aeruginosa* INCQS 00031; 2. *P. aeruginosa* INCQS 00025; 3. *P. aeruginosa* INCQS 00026; 4. *P. alcaligenes* INCQS 00069; 5. *P. fluorescens* INCQS 00077; 6. *P. putida* INCQS 00113; 7. *P. stutzeri* INCQS 00520; 8. *Stenotrophomonas maltophilia* INCQS 00103; 9. H₂O.

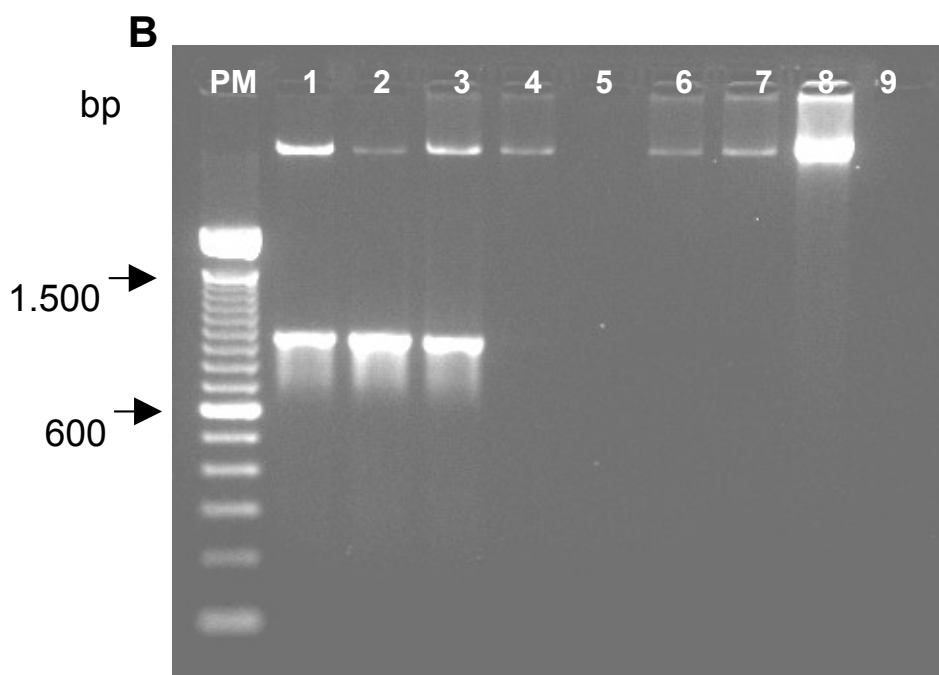


Figura 5B. Especificidade dos iniciadores para *P.aeruginosa*. PM. peso molecular 100 bp; **1.** *P. aeruginosa* INCQS 00031; **2.** *P. aeruginosa* INCQS 00025; **3.** *P.aeruginosa* INCQS 00026; **4.** *P. alcaligenes* INCQS 00069; **5.** *P. fluorescens* INCQS 00077; **6.** *P. putida* INCQS 00113; **7.** *P. stutzeri* INCQS 00520; **8.** *Stenotrophomonas maltophilia* INCQS 00103.

Ponto de coleta 1 ETE : Foram isoladas 7 colônias do ponto 1 ETE, sendo que 1 delas foi obtida após cultivo no caldo letheen. O isolado 1 ETE F1 e o 1 ETE F2 apresentaram fragmento de 600 bp na PCR relativa ao gênero *Pseudomonas*, porém não apresentaram o fragmento de 1000 bp na PCR relativa a espécie *aeruginosa*, os isolados 1ETE E, 1ETE F e 1ETE A não apresentaram nenhum fragmento nas duas reações e foram considerados negativos para o gênero *Pseudomonas* e para a espécie *P. aeruginosa*, enquanto que o 1 ETE E1 apresentou fragmentos de 600 e 1000 bp correspondentes ao gênero *Pseudomonas* e a espécie *aeruginosa* respectivamente (Figura 6).

Gênero *Pseudomonas*
Erro! Indicador não definido.P. aeruginosa

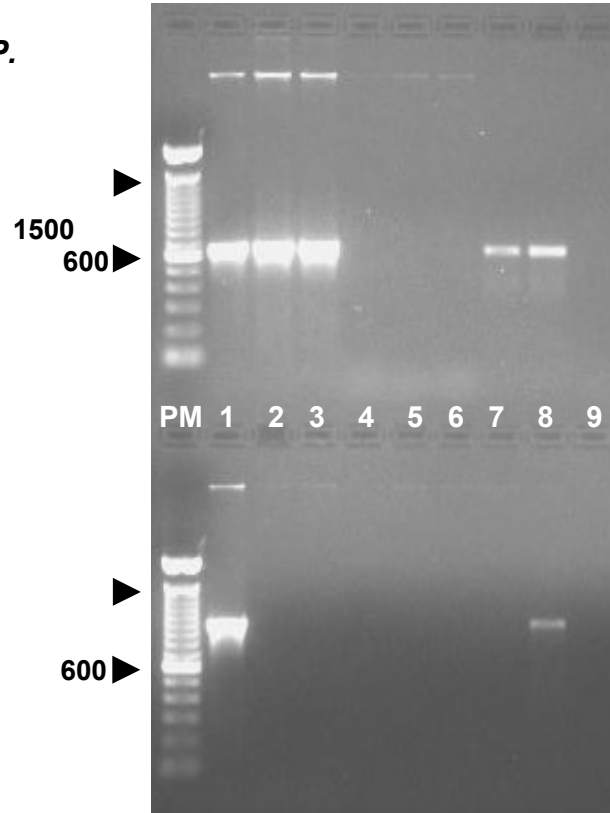


Figura 6. PCR dos isolados do ponto 1ETE. **Parte Superior:** gênero *Pseudomonas*; **Parte inferior:** *P. aeruginosa*. PM. Peso Molecular 100 bp; **1.** *P. aeruginosa*; INCQS 00031; **2.** 1 ETE F1 ; **3.** 1 ETE F2; **4.** 1 ETE E; **5.** 1 ETE F; **6.** 1 ETE A; **7.** 1ETE A; **8.** 1 ETE E1; **9.** H₂O.

2 ETE - os 2 isolados do ponto 2 ETE apresentaram os fragmentos de **618 e 956(?)** bp correspondentes ao gênero *Pseudomonas* e a espécie *aeruginosa* respectivamente (Figura 7).

3 ETE - dos 7 isolados do ponto 3 ETE, os isolados 3 ETE B1, B2, E, C e D apresentaram amplificação para o gênero *Pseudomonas*, porém não apresentaram amplificação para a espécie *aeruginosa*; 3 ETE F e A apresentaram fragmentos de 618 e 956 bp correspondentes ao gênero *Pseudomonas* e a espécie *aeruginosa* respectivamente (Figura 7).

4 ETE - Os 2 isolados do ponto 4 ETE apresentaram ampliações tanto para o gênero *Pseudomonas* como para a espécie e foram consideradas *P. aeruginosa* (Figura 7).

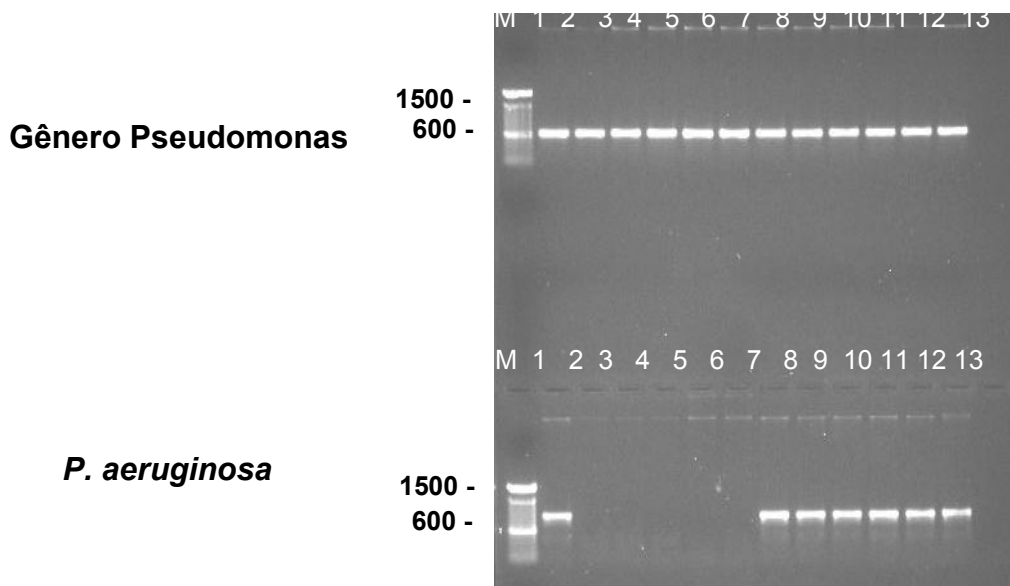


Figura 7. PCR dos isolados dos pontos 2 ETE, 3 ETE e 4 ETE. **Parte Superior:** gênero *Pseudomonas*; **Parte inferior:** PM. Peso molecular 100 bp; **1.** *P. aeruginosa* INCQS 00031; **2.** 3 ETE B1; **3.** 3 ETE B2; **4.** 3 ETE E; **5.** 3 ETE C; **6.** 3 ETE D; **7.** 3 ETE F; **8.** 3 ETE A; **9.** 2 ETE A; **10.** 2 ETE B; **11.** 4 ETE A; **12.** 4 ETE B; **13.** H₂O.

5 ETE - os 2 isolados do ponto 5 ETE também apresentaram os fragmentos correspondentes ao gênero *Pseudomonas* e à espécie *aeruginosa* (Figura 8).

5c ETE - 5c ETE A e B não apresentaram fragmentos correspondentes ao gênero *Pseudomonas* e à espécie *aeruginosa*, 5c ETE E e F apresentaram fragmentos de 618 e 956 bp correspondentes ao gênero *Pseudomonas* e a espécie *aeruginosa* respectivamente e 5c ETE C apresentou fragmento para o gênero *Pseudomonas* (Figura 8).

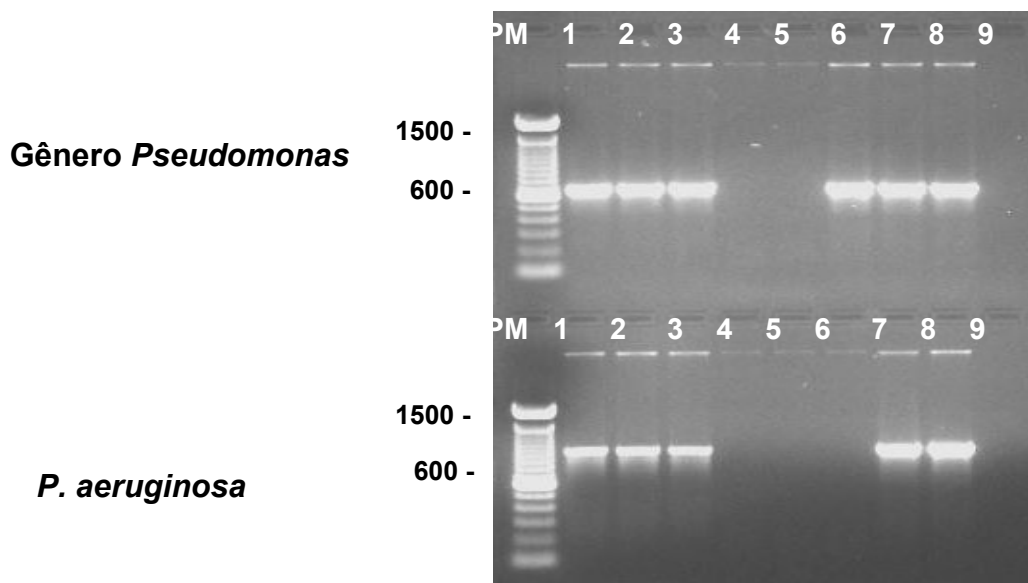


Figura 8. PCR dos isolados do ponto 5 e 5c ETE. **Parte Superior:** gênero *Pseudomonas*; **Parte inferior:** *P. aeruginosa*. PM. Peso Molecular 100 bp; 1. *P. aeruginosa* INCQS 00031; 2. 5 ETE A ; 3. 5 ETE B; 4. 5c ETE A; 5. 5c ETE B ; 6. 5c ETE C; 7. 5c ETE E; 8. 5 ETE F; 9. H₂O.

Dos 25 isolados, 5 isolados (20%) não apresentaram amplificação em nenhuma das duas reações e foram consideradas negativas para o gênero *Pseudomonas* e para a espécie *P. aeruginosa*., 9 isolados (36%) apresentaram amplificação para o gênero *Pseudomonas*, porém não apresentaram amplificação para a espécie aeruginosa, sendo assim consideradas positivas para o gênero *Pseudomonas*. 11 isolados (44%) apresentaram ampliações tanto para o gênero *Pseudomonas* como para a espécie aeruginosa e foram consideradas *P. aeruginosa* (Figura 9).

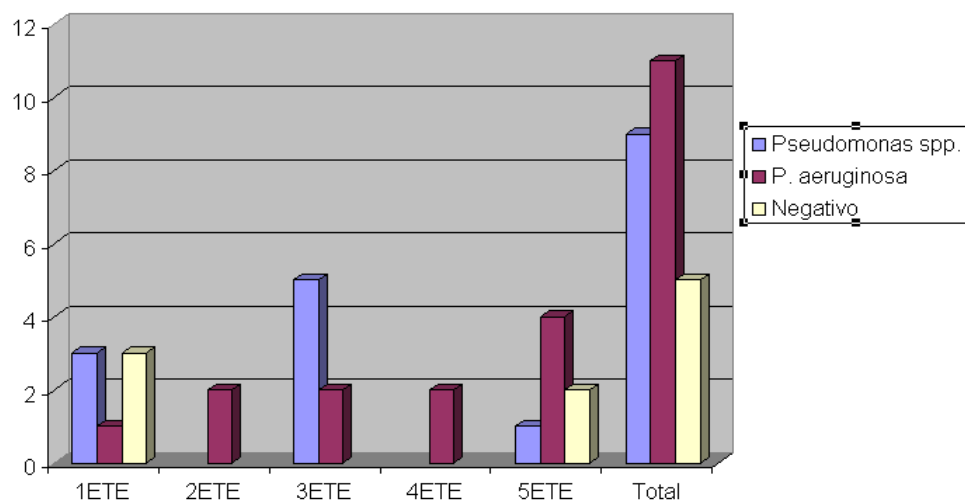


Figura 9. Resultado da identificação molecular dos isolados.

4.4. Avaliação da susceptibilidade aos antibióticos

Foram selecionados aleatoriamente 5 isolados, certificados como *P. aeruginosa*, para a realização da avaliação da susceptibilidade aos antibióticos. Os selecionados foram: 2 ETE A, 3 ETE A, 3 ETE F, 4 ETE B e 5c ETE F, além da *P. aeruginosa* INCQS 00099. Nas análises de susceptibilidade aos antimicrobianos: 60% (2 ETE A, 3 ETE A, 3 ETE F) dos isolados foram sensíveis aos 6 antibióticos analisados; 20% (4 ETE B) foi resistente a todos os anibióticos e 20% (5c ETE F) foi resistente a 1 antibiótico (gentamicina). (Tabela 2).

	NOR	GEN	CIP	CPM	IMP	ATM
<i>P.a.</i>	Sensível	Sensível	Sensível	Sensível	Sensível	Sensível
2 ETE A	Sensível	Sensível	Sensível	Sensível	Sensível	Sensível
3 ETE A	Sensível	Sensível	Sensível	Sensível	Sensível	Sensível
3 ETE F	Sensível	Sensível	Sensível	Sensível	Sensível	Sensível
4 ETE B	Resistente	Resistente	Resistente	Intermediário	Resistente	Intermediário
5c ETE F	Sensível	Resistente	Sensível	Sensível	Sensível	Sensível

Tabela 2. Susceptibilidade aos antimicrobianos. **NOR.** norfloxacina (10 µg); **GEN.** gentamicina (10 µg); **CIP.** ciprofloxacina (5 µg); **CPM.** cefepime (30 µg); **IMP.** imipeném (10 µg); **ATM.** aztreonam (30 µg).

5. Discussão

A Lei Orgânica da Saúde define a Vigilância Sanitária como “um conjunto de ações capaz de eliminar, diminuir, ou prevenir riscos à saúde e de intervir nos problemas sanitários decorrentes do meio ambiente, da produção e circulação de bens e da prestação de serviços de interesse da saúde” (ANVISA, 1998). Desta forma, verificamos a importância da Vigilância Sanitária no controle das infecções hospitalares, e em continuidade a isto, sua interferência na preservação do meio ambiente no tocante à manutenção da qualidade dos recursos hídricos.

Atualmente, há uma necessidade de controlar o meio ambiente, em face do aumento da carga poluidora nos corpos hídricos e das condições favoráveis, no Brasil, à propagação de doenças de veiculação hídrica, sendo crescente o interesse nas pesquisas que são focadas na avaliação das características dos efluentes gerados pelos estabelecimentos assistenciais de saúde e na avaliação dos impactos reais que o descarte inadequado ou o não tratamento dos efluentes poderiam causar no ecossistema aquático. .

[Rutala \(1997\)](#) relata que o descarte dos RSS nos Estados Unidos tem representado um dos maiores problemas de saúde pública nos últimos dez anos. O problema veio à tona quando os RSS começaram a aparecer, entre 1987 e 1988, em algumas praias de estados costeiros, e percebeu-se que estes poderiam ser uma fonte de transmissão do HIV – *Human Immunodeficiency Virus*.

Os hospitais norte-americanos segundo [Daschner \(1997\)](#) contribuem muito para a existência da poluição ambiental. Aproximadamente 6.700 toneladas de resíduos são geradas diariamente, representando um montante de 6,9 Kg de resíduos por paciente /dia em unidades de terapia intensiva.

Um estudo envolvendo a diversidade de *Enterococcus* spp em duas estações de tratamento de esgoto em um hospital público de Antofagasta, Chile, demonstrou a presença de 5 diferentes espécies *E. faecalis* (65%), *E. faecium* (14%), *E. hirae* (13%), *E. durans* (6%) e *E. gallinarum* (2%). Os isolados apresentaram alta resistência à gentamicina e estreptomicina, moderada resistência à ampicilina, cloranfenicol, tetraciclina e ciprofloxacina e suscetibilidade moderada a vancomicina. O estudo conclui que o esgoto pode ser uma via importante na transmissão destes organismos (Silva, 2005).

No Brasil, a eficiência de uma planta de tratamento de esgoto hospitalar foi analisada e demonstrou a presença de *Klebsiella pneumoniae* multirresistente no efluente tratado. A planta foi considerada ineficiente na remoção de microrganismos patogênicos, permitindo a disseminação dessas bactérias no ambiente (Prado 2007).

Na América Latina, o sistema SENTRY - Programa de Vigilância de Resistência - fornece dados sobre a ocorrência de *P. aeruginosa* em infecções hospitalares, tendo sido este o microrganismo mais frequentemente detectado entre os patógenos bacterianos de pacientes com pneumonia internados em 10 centros médicos de seis países da América Latina (Sader, 1998).

A alta incidência da *P. aeruginosa* pode ser atribuída a diversas propriedades como fácil adaptação às condições ambientais de nutrição, temperatura e umidade e sua capacidade de receber e transmitir fatores de resistência a antimicrobianos (Fávero, 1971). A possibilidade de sobreviver por períodos prolongados em ambientes úmidos, permite que equipamentos e utensílios hospitalares – respiradores e nebulizadores – bem como, soluções anti-sépticas, desinfetantes e de uso terapêutico, lhe sirvam de reservatório (Grundmann, 1995; Moolenaar, 2000). Este conjunto de fatores propicia a infecção de pacientes internados, principalmente em Unidades de Terapia Intensiva onde os indivíduos muitas vezes encontram-se imunodeprimidos e submetidos a procedimentos invasivos (Ibid.).

Stover e colaboradores (2000) seqüenciaram o genoma completo da linhagem da *P. aeruginosa* PAO1; com 6,3 milhões de pares de base, é o maior genoma bacteriano já seqüenciado. Ela contém a maior proporção de genes regulató-

rios observados em um genoma bacteriano e um grande número de genes envolvidos no catabolismo, transporte e efluxo de compostos orgânicos, bem como quatro sistemas potencialmente quimiotáticos. Os autores propõem que o tamanho e a complexidade do genoma de *P.aeruginosa* reflitam uma adaptação evolucionária permitindo-lhe crescer em diversos ambientes e resistir ao efeito de uma variedade de substâncias antimicrobianas.

Um fato intrigante neste estudo foi a ausência de cepas sugestivas de *P.aeruginosa* na amostra nº 1 do efluente hospitalar (ponto 1 ETE) que, pode ser justificada pela provável inibição do crescimento bacteriano pela ação de desinfetantes e outros produtos químicos utilizados na unidade de saúde, que naquele ponto inicial da estação de tratamento, ainda se encontravam ativos. Essa hipótese foi posteriormente verificada através da presença de crescimento bacteriano em meio de cultivo cuja formulação inibe alguns princípios destes produtos, propiciando o metabolismo microbiano. Embora essa inibição possa ser considerada como fator positivo no ambiente hospitalar, o mesmo não ocorre em relação ao ambiente, pois demonstramos que as cepas possivelmente inibidas tornam-se ativas ao longo das etapas do tratamento e são lançadas no meio ambiente, comprometendo a saúde pública. Muitos estudos têm apontado que efluentes hospitalares possuem altas concentrações de substâncias tóxicas, tais como antibióticos, agentes citostáticos, metais pesados, desinfetantes, hormônios e microrganismos resistentes que podem disseminar no meio ambiente (Kummerer, 2001; Reinthaler *et al*, 2003; Schwartz *et al*, 2003; Emanuel, 2005).

A preocupação com a disseminação de bactérias resistentes aos antibióticos se refere, sobretudo, à infecção hospitalar. Estudos realizados em hospitais brasileiros têm detectado altas taxas de infecção hospitalar no país (Gales *et al*, 1997; De Moraes *et al*, 2000; Villas Boas *et al*, 2004; Silva & Oliveira, 2006).

As análises de identificação de *P.aeruginosa* tem sido realizadas por métodos bioquímicos convencionais e pelo uso de kits comerciais baseados no padrão da utilização de fonte de carbono, e em características morfológicas e fisiológicas. Entretanto, os dados para *Pseudomonas* utilizados nestes sistemas são baseados

principalmente em amostras de isolados clínicos e não em amostras ambientais, restringindo inclusive, em alguns casos, a sua utilização. O uso destes Kits requer habilidade, pois apresenta limitação significativa para a distinção de amostras de uma mesma espécie (Medeiros, 2008).

Nas últimas décadas, verificou-se aumento significativo no desenvolvimento de técnicas moleculares para a detecção, identificação e caracterização de microrganismos. Dentre essas, destaca-se a reação em cadeia da polimerase (polymerase chain reaction –PCR) (Bôer et al, 1999). Esta técnica, apresenta, conforme o observado por Busch e Nitschko (1999), diversas vantagens em relação aos métodos convencionais, como maior poder de tipificação e discriminação, maior rapidez, bom limite de detecção, maior seletividade, especificidade, entre outras. Essas observações foram comprovadas em nossas análises, enquanto a metodologia convencional resultou na identificação de 14 *P. aeruginosa* a PCR do gene 16S rRNA confirmou a identificação de 11 cepas, Além de mais rápida, a PCR demonstrou maior especificidade na identificação de *P. aeruginosa*.

A *P. aeruginosa* em face à sua grande resistência aos antibióticos e aos desinfetantes vem nas últimas décadas adquirindo grande importância como agente de infecções hospitalares (COSTAS et al, 1992), sendo um dos principais microrganismos recuperados de efluentes hospitalares (FUENTEFRÍA, 2008). Existem relatos destes organismos crescendo em detergentes, anti-sépticos e sabões (COSTAS et al, 1992; DUBOIS et al, 2001).

Dentre os onze isolados de *P.aeruginosa*, cinco foram aleatoriamente selecionados e avaliados em relação à sensibilidade a diferentes classes de antibióticos. Embora alguns isolados tenham apresentado sensibilidade aos antibióticos testados, verificamos a presença de uma cepa resistente a todos os antimicrobianos. Estes resultados reafirmam a preocupação com a disseminação de patógenos multirresistentes no ambiente.

Os antimicrobianos podem ser classificados segundo sua estrutura química (derivados de aminoácidos, derivados de açúcares, derivados de acetatos e propionatos e outro), tipos de microrganismos sobre os quais atuam ou ainda,

efeito provocado no microrganismo (MANRIQUE, 1997). Em relação ao mecanismo de ação dos antimicrobianos, descreve-se a interferência na síntese da parede celular; alterações na permeabilidade da membrana citoplasmática; interferência na replicação do cromossomo; interferência na síntese protéica (Ibid).

A constatação da presença de *P. aeruginosa* no efluente hospitalar reforça a necessidade de conscientização das autoridades governamentais e dirigentes hospitalares em relação ao cumprimento da legislação, proporcionando o tratamento adequado dos esgotos hospitalares, evitando a contaminação dos corpos receptores por organismos patogênicos.

11. Conclusões

De acordo com os resultados apresentados foi possível concluir que:

- Todas as amostras coletadas nas diferentes etapas da estação de tratamento do esgoto, dos hospitais Lourenço Jorge e Leila Diniz, apresentaram crescimento microbiano em meio de cultura;
- A interpretação das provas bioquímicas demonstrou a presença de 14 cepas de *P. aeruginosa*;
- A reação da PCR do gene 16S rRNA resultou na identificação de 11 cepas de *P. aeruginosa*, demonstrando maior especificidade e tipificação que a identificação fenotípica;
- O isolamento de uma cepa de *P. aeruginosa* após cultivo no meio letheen sugere que os uso de desinfetantes, antibióticos e outros biocidas, pode estar exercendo uma atividade bacteriostática nas cepas de *P. aeruginosa* do efluente hospitalar;
- Foi constatada a presença de *P. aeruginosa* em todas as amostras analisadas, inclusive naquela correspondente à fase terciária do tratamento;

- O resultado das análises de susceptibilidade aos antimicrobianos, demonstrou a presença de cepas sensíveis e uma multirresistente, refletindo a diversidade dos isolados analisados;
- O sistema de tratamento analisado necessita de uma avaliação no sentido de ajustar os parâmetros necessários para uma maior eficiência na eliminação de patógenos multirresistentes.

A presença de microrganismos resistentes no efluente tratado reforça a necessidade do desenvolvimento de procedimentos para monitorar os resíduos hospitalares como forma de controle da saúde ambiental dos ecossistemas. Esperamos com este estudo, colaborar para o desenvolvimento de tais procedimentos que, certamente, irão contribuir para o desenho de ações preventivas aos impactos desses efluentes no ambiente e na saúde pública.

12. Referências bibliográficas:

ARBEIT, R. D. **Manual of Clinical Microbiology**. Laboratory procedures for the epidemiologic analysis of microorganisms. 6 ed. Washington DC: ASM Press, p. 190-208, 1995.

ARNOW, P. M.; FLAHERTY, J. P. Nonfermentative Gram-negative bacilli. In: Mayhall CG(ed). **Hospital Epidemiology and Infetion Control**, 1st ed. Williams & Wilkins. Galvestone, p. 366-387, Baltimore, Mayland 1996.

ASENSI, M. D.; MORAES, DE B. A.; CRAVO, C. A. N.; LOUREIRO, M. M. Epidemiological analysis of bacterial strains involved in hospital infection in a university hospital from Brazil. **Rev Inst Med Trop S Paulo**, v. 42, p. 201-207, 2000.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 7.501. **Transporte de produtos perigosos: terminologia**. Rio de Janeiro, 1989.

_____. NBR-12.807. **Resíduos de Serviços de Saúde: terminologia**. Rio de Janeiro, 1993.

_____. NBR-7.500. **Símbolos de risco e manuseio para o transporte e armazenamento de materiais**. Rio de Janeiro, 1994.

_____. NBR-10004. **Resíduos sólidos – Classificação**. Rio de Janeiro.1994 . Revisão 2004

BALOWS, A., Hausler WJ, Hermann K L, Isenberg HD, Shadamyit. I, **Manual of Clinical Microbiology** 5 ed, Washington (DC): American Society for Microbiology. 1991

BIDONE, F.R. A; POVINELLI, J. **Conceitos Básicos de Resíduos Sólidos**. São Carlos, SP: EESC-USP, 1999. 120p.

BLONDEL-HILL, E. HENRY, D.A. and SPEERT, D. *Pseudomonas*. In: Murray, P. R. et al. **Manual of Clinical Microbiology**. 9th ed. Washington, D.C.: ASM Press. 2007. p. 734-748.

BORSOI, Z. M. F; LANARI, N. L., GOMES, S. M. Tratamento de esgotos: tecnologias acessíveis. **Informe de Infra-Estrutura**, nº 16, nov. 1997.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária- ANVISA. Resolução da Diretoria Colegiada – **RDC n. 306**, de 7 de dezembro de 2004. Dispõe sobre o regulamento técnico para o gerenciamento de resíduos de serviços de saúde. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 10 dez. 2004.

BRASIL. Secretaria da Atenção à Saúde. **Cadastro Nacional de Estabelecimentos de Saúde** – CNESNet (Ministério da Saúde), 2004. Disponível em http://cnes.datasus.gov.br/Mod_hospitalar.asp. Acesso em 18 dez. 2008.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente CONAMA. **Resolução nº 5**, de 5 de agosto de 1993. Estabelece definições, classificação e procedimentos mínimos para o gerenciamento de resíduos sólidos oriundos de serviços de saúde, portos e aeroportos, terminais ferroviários e rodoviários. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, n. 166, 31 ago. 1993.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente CONAMA - **Resolução nº 283**, de 12 de julho de 2001. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 01 out. 2001.

BRASIL . Conselho Nacional de Meio Ambiente CONAMA – **Resolução nº 358**, de 29 de abril de 2005 . Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 04 mai. 2005.

BRASIL . Conselho Nacional do Meio Ambiente CONAMA – **Resolução nº 20** , de 18 de junho de 1986. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília,30 jul. 1986.

BRASIL . Conselho Nacional do Meio Ambiente CONAMA – **Resolução nº 357** , de 17 de março de 2005. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 18 mar. 2005.

BUSH, U.; NITSCHKO, H. **Methods for the differentiation of microorganisms**. J.-Chromatography, Amsterdam, v 722, p. 263-278,1999.

BUSTOS, M. R. L. **A educação ambiental sob a ótica da gestão de recursos hídricos**: USP, 2003. 194p. il. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo, Escola Politécnica, Departamento de Engenharia Hidráulica e Sanitária.

CNES. **Cadastro Nacional de Estabelecimentos de Saúde**. Ministério da Saúde. Brasília

CEZARIO, R.C.; DUARTE,L.; ALMEIDA, A.B.; GONTIJO FILHO, P.P. **Presença de Metalo Beta-Lactamases em *Pseudomonas aeruginosa* associado a um surto na Unidade de Terapia Intensiva de adultos de um hospital universitário brasileiro**. Uberlândia, Minas Gerais. 2003-2005.

CHUANCHUEN, R. ; NARASAKI, C.T.; SCHWEIZER, H.P., 2002. The MexJK efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa* requires OprM for antibiotic efflux but not for efflux of Triclosan. **J Bacteriol** 184: 5036-5044.

Clinical and Laboratory Standards Institute. CLSI **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. In: Abstract of the 15th Informational Supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute document. M100-S15 (ISBN 1-56238-556-9), Wayne, Pennsylvania, USA p.38-39, 2005

COELHO, H (2000) **Manual de gerenciamento de resíduos de serviços de saúde**. Rio de Janeiro, Fiocruz

COSTAS,M.;HOLMES,B.;ON, S.L.W. ET AL.Identificação of medically important *Pseudomonas* species using computerized methods.In: BOARD,R.G.; JONES, D.;SKINNER,F.A.**Identification methods in applied and environmental microbiology**.London:Blackwell, 1992.p.1-20.334p.(SAB.Technical,series 29).

DASCHNER, F. The Hospital and pollution: role of the hospital epidemiologist in protecting the environment. In: WENZEL, R. P. **Prevention and Control of Nosocomial Infections**.3. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1997. cap 28, p 595-605.

De BOER, E.; BEUMER, R.R. (1999) Methodology for detection and typing of food-borne microorganisms. **International Journal of Food Microbiology** 50, 119-130..

DRANCOURT, M. ; BOLLET, C. ; CARLIOZ, A.; MARTELIN, R.;GAYRAL, J.P.;RAOULT, D. **16S Ribosomal DNA Sequence Analysis of a Large Collection of Environmental and Clinical Unidentifiable Bacterial Isolates** Journal of Clinical Microbiology, October 2000, p. 3623-3630, Vol. 38, No. 10 0095-1137/00

DUBOIS,V.;ARPIN,C.;MELONI,M.;MELON,B.;ANDRE,C.;FRIGO,C.;QUENTIN,C.
Nosocomial outbreak due to a multiresistent strain of *Pseudomonas aeruginosa* P12:efficacy of Cefepime-Amikacin therapy and analysis of β -lactam resistance, Journal of clinical microbiology,v.39,n.6.p.2072-2078,2001.

EMMANUEL, E.; PERROTIN, Y.; KECK, G.; BLANCHARD, J.M.; VERMANDE,P.
(2005)..**Ecotoxicological risk assessment of hospital wastewater: a proposed framework for raw effluents discharging into urban sewer network**. J. Hazardous Mat. A117: 1-11.

FAVERO, M.S.; CARSON, L. A.;BOND,W.W.;PETERSEN,N.J. *Pseudomonas aeruginosa*: Growth in Distilled Water from Hospitals. **Science**, August 1971, p 836-838, vol 173, n° 3999 .

FRANCO, B. D. G.M; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: ATHENEU, 2003. 182p.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da Segurança Alimentar**. Porto Alegre: ARTEMED, 2002. 424 p.

FUENTEFRIA, D. B.; FERREIRA,A. E.;GRÄF, T.; CORÇÃO, G. ***Pseudomonas aeruginosa*: disseminação de resistência antimicrobiana em efluente hospitalar e água superficial**. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, Out 2008, vol.41, no.5, p.470-473. ISSN 0037-8682

GALES A.C.;BOLMSTRÖN, A, SAMPAIO, J; JONES, R.N.; SADER, H.S. Antimicrobial susceptibility of *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum β -lactamases (ESBL) isolated in Brazilian hospitals. **Braz J Infect Dis** 1997;1:196-203.

GARCIA, L. P., ZANETTI-RAMOS, B. G. Gerenciamento dos Resíduos de Serviços de Saúde: uma questão de Biossegurança. **Cad. Saúde Pública**, v. 20, nº 3, p. 744-752, 2004.

Grundmann H, Schneider C, Hartung D, Daschner FD, Pitt TL 1995. Discriminatory power of three DNA-based typing techniques for *Pseudomonas aeruginosa*. **J Clin Microbiol** 33: 528-534

HIGGINS, C.S.; MURTOUGH, S.M.; HIOM, S.J.; PAYNE, D.J.; RUSSEL, A.D.; WALSH, T.R. (2001) **Resistance to antibiotics and biocides among non-fermenting Gram-negative bacteria**. Clin Microbiol Infect Dis 7:308-315

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa Nacional de Saneamento Básico – PNSB**. 2000. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br> Último acesso em 18 de dezembro de 2008.

IRVIN, R. T.; DORIN, P.; LEE, K. K.; SASTRY, P. A.; PRANCHYCH, W.; TODD, T.; HODGES, R.S. Characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* pilus adhesion: confirmation that the pili structural proteins subunit contains a human epithelial cell binding domain. **Infect Immun**, v. 57, p. 3720-3766, 1989.

JAFFAR-BANDJEE, M. C.; LAZDUNSKI, A.; BALLY, M.; CARRERE, J.; CHAZLETTE, J. P.; GALABERT, C. Production of elastase, exotoxin A, and alkaline protease in sputa during pulmonary exacerbation of cystic fibrosis in patients chronically infected by *Pseudomonas aeruginosa*. **J Clin Microbiol**, v. 33, p. 924-929, 1995.

KÜMMERER, K. (2001) Drugs in the environment: emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources - a

review. **Chemosphere** 45:957-69. Review. *Erratum in: Chemosphere* 2002 48:383.

KÜMMERER, K. (2003) Significance of antibiotics in the environment. **J Antimicrob Chemother** 52:5-7

LIPUMA, J. J. Molecular tools for epidemiologic study of infectious diseases. **Pediatr Infect Dis J**, v. 17, p. 667-675, 1998.

MAC DONNELL, G.; RUSSELL, A.D. (1999) Antiseptics and disinfectants: activity, action and resistance. **Clin Microbiol Rev** 12:147-179

MANRIQUE, E.I.; GALVÃO, L.L.; racionalização e Controle de Antimicrobianos. In: RODRIGUES, E.A.; MENDONÇA, I.M.B.A.; FILHO, M.B.A.F.; GRINBAUM, R.S.; RICHTMANN, R. **Infecções Hospitalares, Prevenção e Controle**, v 6, p. 117-130, 1997.

MEDEIROS, P. S. **Caracterização Molecular de Isolados de *Pseudomonas aeruginosa* do hospital de base do Distrito Federal**. Brasília: UCB, 2008. 142p. II. Dissertação (Mestrado) – Universidade Católica de Brasília, Distrito Federal.

MEES, J.B. (2006) **Tratamento de Resíduos Líquidos I**. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Campus Medianeiro. Ministério da Educação

Meirelles-Pereira, F., A.M.S. Pereira, M.C.G. Silva, V.D. Gonçalves, P.R. Brum, E.A.R. Castro, A.A. Pereira, F.A. Esteves & J.A.A. Pereira, 2002. Ecological aspect of the antimicrobial resistance in bacteria. of importance to human infections. **Brazilian Journal of Microbiology** 33:287-293

MIGULA, W. 1900 **System der Bakterien**. P. 886-888. Gustav Fischer, Jena.

MOKADDAS, E. M.; SANYAL, S.C. Resistance patterns of *Pseudomonas aeruginosa* to carbapenems and piperacillin/tazobactam. **J Chemoth** 11: 93-96,1999.

MOOLENAR, R.L.; Crutcher JM, Joaquin VHS, Sewell LV, Hutwagner LC, Carson LA, Robison DA, Smithee LMK, Jarvis WR 2000. A prolonged outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* in a neonatal intensive care unit: Did staff fingernails play a role in disease transmission? **Infect Control Hosp Epidemiol** 21: 80-85.

MORAES, B.A. De;Cravo C.A.M.; Loureiro, M.M.; Solari ,C.A.; Asensi M.D. Epidemiological analysis of bactéria strains involved in hospital infection in a university hospital from Brazil. **Rev Inst Med Tropical São Paulo** 2000; 42:201-7.

MOREL, M.M.; BERTUSSI FILHO, L.A. **Resíduos de serviços de saúde**. In: Rodrigurs EAC et al. **Infecções hospitalares: prevenção e controle**. São Paulo: Savier, 1997. cap.9, pág 519-534.

NNISS. **National Nosocomial Infections Surveillance** System (Sistema Nacional de Vigilância de Infecções Nosocomiais) USA- www.cdc.gov/ncidod/hipNNIS/nosinfdefinitions.pdf

PALLERONI, N.; KUNISAWA, R.; CONTOPOULOU, R.; DOUDOROFF, M. Nucleic acid homologies in the genus *Pseudomonas*. **Int J Syst Bacteriol**, v. 23, p. 333-339, 1973.

PALLERONI, N.J. Genus I. ***Pseudomonas* Migula** 1894, In: BRENNER, D.J.; KRIEG, N.R.; STALEY, J.T. et GARRITY, G.M. (Eds), **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, second edition, vol. 2 (The *Proteobacteria*), part B (The *Gammaproteobacteria*), Springer-Verlag, New York, p. 323-379, 2005.

PISANI, B. ;SIMÕES, M., PRANDI, M. A G.; ROCHA, M.M.; GONÇALVES, C. R.;VAZ, T. M.; IRINO, K. **Surto de bacteriemia por *Pseudomonas aeruginosa* na unidade de hemodiálise de um hospital de Campinas, São Paulo.,Brasil.** Ver. Inst. Adolfo Lutz; 59(1/2):51-5,2000. ilus,

POLLACK, M. *Pseudomonas aeruginosa*. In: Mandell, D.; Benneths, J.; Dolin, R. (eds.).**Principles and practice of infections diseases**, 4 th ed.O. pp. 1980-2003. London,UK: Churchill Livingstone 1995

PRADO, T. **Avaliação da eficiência de um sistema de tratamento de efluente hospitalar por processo anaeróbio na remoção de coliformes, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* resistentes a antibióticos e Vírus da Hepatite A**, Dissertação de Mestrado, Rio de Janeiro. 2007

PRADO, T.; PEREIRA, W.C, SILVA, D.M, SEKI, L.M, CARVALHO, A.P, ASENSI, M.D. Detection of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in effluents and sludge of a hospital sewage treatment plant. **Lett Appl Microbiol**. 2008 Jan; 46(1): 136-41. Epub 2007 Nov 3.

QUINTEIRA, S.; PEIXE, L. Multiniche Screening Reveals the Clinically Relevant Metallo- β -lactamase VIM-2 in *Pseudomonas aeruginosa* Far from the Hospital Setting: an Ongoing Dispersion Process. **Appl Environ Microbiol** 72:3743-3745. 2006.

REINTHALER, F. F.; POSCH, J.; FEIREL, G.; WÜST, G.; HAAS, D.; RUCKENBAUER, G.; MASCHER, F.; MARTH, E. **Antibiotic resistance of *E. coli* in sewage and sludge**. Water Research 37, 1685-1690, 2003.

RIBEIRO, L. M.M., **Avaliação Quanto à carga poluidora dos efluentes líquidos de quatro hospitais de diferentes especializações no Município de Port**

Alegre. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2005 97 f. Porto Alegre, Rio Grande do Sul.

RICHARDS, M.J.; EDWARDS J.R.; CULVER D.H.; GAYNES R.P. Nosocomial infections in pediatric intensive care units in the United States. National Nosocomial Infections Surveillance System. **Pediatric**, v. 103, p. 39- 43, 1999.

RIO DE JANEIRO. **LEI N° 2.661, de 27/12/96.** Regulamenta o disposto no art. 274 da Constituição do Estado do Rio de Janeiro no que se refere à exigência de níveis mínimos de tratamento de esgotos sanitários, antes de seu lançamento em corpos d'água e dá outras providências. Diário Oficial do Estado do Rio de Janeiro de 30 de dezembro de 1996. Alterada pela Lei 4692 de 29 de dezembro de 2005. DOE de 01 de março de 2006.

RUTALA,W.A. Disinfection, Sterilization and waste Disposal In: WENZEL, R. P. **Prevention and Control of Nosocomial Infections.**3. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1997. cap 28, p. 539-593.

SADER, H.;GALES,A.C.;REIS,A.O.;ZACCOLI,C.;SAMPAIO, J.; JONES,R.N.*et al.* Antimicrobial susceptibilities as bacteria isolated from the lower respiratory tract of inpatients with pneumonia in Brazilian hospitals – results from the SENTRY surveillance program, 1997 and 1998. **J Pneumol** v. 27, n.2, p. 60-67, 2001.

SADER, H. S.; *et al.* Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Bras J Infect Dis**, v. 5, p. 200-214, 2001.

SANTOS FILHO, L.; SANTOS,I.B.; ASSIS, A.M.L.; XAVIER, D. E. **Determinação da produção de metalo-β- lactamases em amostras de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas em João Pessoa, Paraíba.** 2001.

SCWARTZ,T.; KOHNEN, W.; JANSEN,B.; OBST,U. Detection of antibiotic-resistant bacteria and their resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 43,n. 3.p. 325- 335, 2003.

SILVA, R.S.; Oliveira, A.C.Epidemiologia e controle de infecção hospitalar em uma unidade pediátrica. **Rev.Enferm.UFPE**.on line.2008-;2(2):177-84. Disponível pelo site: www.efpe.br/revistaenfermagem/index.php.

SILVEIRA, I.C.T. **Cloro e Ozônio aplicados à desinfecção de efluente hospitalar tratado em contadores biológicos rotatórios, com avaliação de efeitos tóxicos em *Daphia similis***. Porto Alegre: UFRGS, 2004. 173 f. Tese (Doutorado em recursos Hídricos e Saneamento Ambiental. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto alegre, 2004).

SNEATH, P.H. & R. R. SOKAL. 1962. Numerical taxonomy. **Nature** 193:855-860.

SPIPKER T, COENYE T, VANDAMME P, LIPUMA J. J. PCR-based assay for differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* from other *Pseudomonas* species recovered from cystic fibrosis patients. **J Clin Microbiol**. 2004 May; 42(5): 2074-9.

STICKLER DJ (2004) **Intrinsic resistance of gram-negative bacteria**. In: FRAISW AP, LAMBERT PA, Maillard J-Y, RUSSELL, HUGO & AYLIFFE. **Principle and Practice of Disinfection Preservation and Sterilization**. 4 ed. Massachusetts, *Blackwell*, 154-169

STOVER, C.K. *et al*. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. **Nature**, v. 406, p. 959-964, 2000.

STRAUB TM, Chandler DP (2003) Towards a unified system for detecting waterborne pathogens. **J Microbiol Methods** 53:185-97

TENOVER, F. C.; ARBEIT, R. D.; GOERING, R. V.; MICKELSEN, P. A.; MURRAY, B. E.; PERSING, D. H.; SWAMINATHAN, B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **J. Clin Microbiol**, v. 33, p. 2233-2239, 1995.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4.ed., São Paulo: ATHENEU, 2004.

TRAUTTMAN M, et col. Tap water colonization with *Pseudomonas aeruginosa* in Surgical intensive care unit (ICU) and relation to *Pseudomonas* Infections of ICU patients. **Infect Control Hosp Epidemiol**: 2001;22(1):49-52 .

TSAI, C.T. ; LAI, J.S.; LIN, S.T. Quantification of pathogenic microorganisms in the Sludge from treated hospital wastewater. **J.Appl.Microbiol**, 85: 171-179. 1998.

VAN DE PEER, Y.; VAN DER, A.G. ; De WACHTER, R. (1996) **J. Mol. Evol.** 42, 201-210

VILLAS BOAS, P.J.F.; RUIZ, T. Ocorrência de infecção hospitalar em idosos internados em hospital universitário. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v. 38, n. 3, June 2004 .

WEISBURG, W. G.; BARNS, S. M.; PELLETIER, D. A.; LANE, D. J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 173, p. 697-703, 1991.

ZAVASCKI AP, Cruz RP, Goldani LZ (2005) Risk factors for imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: a comparative analysis of two case-control studies in hospitalized patients. **J Hosp Infect** 59:96-101

8. ANEXO 1

1. Meios de Cultura e Condições de Cultivo

1.1. Caldo Nutriente

Na Cl.....5g
Peptona.....10g
Extrato de carne3g
H₂O q.s.p.....1000 ml

.Pesar cada um dos reagentes separadamente;

.Despejar os reagentes no Erlenmeyer maior solubilizando-os com água sob a placa de agitação e aquecimento, até o volume final de 1000 ml;

.Ajustar o pH para 7.4 com NaOH ou HCl;

.Autoclavar durante 15 minutos a 121° C.

Inoculação e cultivo

.O meio líquido foi distribuído no volume de 5 ml em tubos de ensaio 18x160mm;

.A inoculação e semeadura foram realizadas em capela de fluxo laminar.

1.2. Agar Nutriente

Na Cl.....5g
Peptona.....10g
Extrato de carne3g
Agar.....20g

H₂O q.s.p.....1000 ml

- .Pesar cada um dos reagentes separadamente;
- .Despejar os reagentes no Erlenmeyer maior solubilizando-os com água sob a placa de agitação e aquecimento, até o volume final de 1000 ml;
- .Solubilizar por último o agar, caso faça meio sólido;
- .Ajustar o pH para 7.4 com NaOH ou HCl;
- .Autoclavar durante 15 minutos a 121° C.

Inoculação e cultivo

- .O meio sólido foi distribuído no volume de 20 ml em placas de Petri;
- .A inoculação e semeadura foram realizadas em capela de fluxo laminar.

1.3. Agar Cetrimide

Peptona ----- 20g
Cloreto de magnésio ----- 14g
Sulfato de potássio ----- 10g
Cetrimide ----- 0,3g
Agar ----- 13,6g
Glicerol ----- 10ml
Água destilada ----- 1000ml

- .Suspender os componentes em água destilada.
- .Dissolver por aquecimento à ebulição.
- .Autoclavar a 121° C por 15 minutos.
- .Resfriar a 50° C.
- .Distribuir em placas de Petri (15x100mm). pH final = 7,1 +/- 0,2.

1.4. Agar Muller Hinton

Oxoid Código: CM337B Lote: 579019

Preparado de acordo com as instruções do fabricante. pH final = 7,1 +/- 0,2.

Distribuído 20 ml em cada placa de Petri (15x100mm).

1.5. Caldo Letheen

Difco™ Ref 268110 Lote 5089519

Preparado de acordo com as instruções do fabricante. pH final = 7,1 +/- 0,2.

Distribuído 10 ml em tubos 18X 160mm.

2. Provas Bioquímicas

2.1. Método de Gram:

Reagentes:

Cristal Violeta (Seg. Hucker)

Solução A:

Cristal Violeta ----- 2g

Álcool etílico ----- 20ml

Solução B:

Oxalato de amônio ----- 0,8g

Água destilada ----- 80ml

- .Misturar soluções A e B;
- .Deixar em repouso por 24 horas;
- .Filtrar em papel wathmamn nº 1;
- .Armazenar em frasco escuro.

Solução de Lugol:

Iodo ----- 1g
 Iodeto de potássio ----- 2g
 Água destilada ----- 300ml

- .Macerar o iodo e o iodeto de potássio em um gral;
- .Adicionar água aos poucos e misturar bem.Completar o volume com água destilada; Armazenar em frasco escuro.

Descorante:

Agente intermediário: álcool - acetona (álcool etílico 95%, 100ml; acetona, 100ml)

Fucsina Fenicada: (Seg. Ziehl)

Fucsina básica ----- 1g
 Álcool etílico 95% ----- 10ml
 Fenol fundido ----- 5g
 Água destilada ----- 100ml

- . Dissolver em um gral a fucsina no álcool;
- . Juntar aos poucos o fenol;
- . Homogeneizar até completa dissolução;
- . Juntar a água aos poucos, lavando o gral;
- . Filtrar após 24 h de repouso.

Procedimento:

- Esfregaço bem homogêneo fixado ao calor;
- Corar durante 1 minuto com solução de cristal violeta;
- Escorrer o corante e cobrir durante 1 minuto com solução de lugol;
- Lavar em água corrente;
- Diferenciar com um dos descorantes descritos acima;
- Lavar em água corrente;
- Contrastar durante trinta segundos com fucsina de Ziehl;
- Lavar em água corrente;
- Secar a preparação (entre duas tiras de papel de filtro).

Interpretação:

Microrganismos Gram positivos: cor roxa

Microrganismos Gram negativos: cor vermelha

2.3. Glicose OF/ Xilose/ Manitol/ Lactose

Difco TM OF Basal Médium Ref: 268820 Lote: 5081491

Preparado de acordo com as instruções do fabricante. Após a autoclavação foi acrescentado 1% do carboidrato desejado que deverá ser preparado separadamente e esterilizado por filtração (membrana 0,22 µm)

Inoculação e Incubação:

Inocular 2 tubos com a cultura pura de 18-24h de incubação;

Semear por picada central atingindo até uma profundidade de 1 cm;

Acrescentar 0,5 ml de óleo mineral estéril em um dos tubos inoculados

Interpretação:

Teste positivo: Oxidador: tubo aberto: amarelo; Tubo fechado: inalterado (verde)
Fermentador: Tubos fechado e aberto: amarelo

2.4. Meio de SIM (Sulfeto Indol Mobilidade Agar)

Extrato de carne ----- 3g
Bacto peptona ----- 10g
Trypticase ----- 10g
Sulfato ferroso amoniacal ----- 0,2g
Tiosulfato de sódio ----- 0,2g
Cloreto de sódio ----- 5g
Agar ----- 4g
Água destilada ----- 1000ml

Suspender os componentes em água destilada;

Dissolver por aquecimento à ebulição;

Distribuir em tubos 13x100mm, em volumes de 4 a 5ml;

Esterilizar a 121°C por 15 minutos;

Esfriar e estocar em refrigerador (4-10°C); pH final = 7,2 ± 0,2.

Inoculação e Incubação:

Inocular com cultura pura de 18-24h de incubação;

Semear por picada central atingindo até uma profundidade de 1 cm;

Retirar a agulha seguindo a linha de entrada;

Incubar a 35-37° C por 24 -48h.

Interpretação:

Teste positivo: qualquer escurecimento no meio, ao longo da linha de inoculação ou por todo o interior do meio.

Teste negativo: meio permanece na cor original.

2.5. Hidrólise da Gelatina

Meio de gelatina nutriente

Extrato de carne ----- 3g
Peptona ----- 5g
Gelatina ----- 120g
Água destilada ----- 1000ml

.Aquecer a água (50° C), colocar a gelatina e deixar descansar por 15 a 30 minutos;

.Adicionar o extrato de carne e a peptona;

.Aquecer novamente para dissolver todos os componentes;

.Ajustar o pH a 6,8-7,1;

.Distribuir em porções de 4 a 5ml por tubo com tampa de rosca (frouxas);

.Autoclavar a 121° C por 15 minutos;

.Resfriar na posição horizontal, apertar as tampas e estocar em refrigerador (4-10° C);

.pH final = 6,8 ± 0,2.

Inoculação e Incubação:

- . Cultura pura com 18-24h de incubação; semear por picada, com uma agulha de fio níquel-cromo, até uma profundidade de 1cm;
- . Foi utilizado inoculo pesado;
- . Foi a colocado um tubo controle, sem inoculo para correr paralelo com a amostra a ser testada;
- . Após o inoculo os tubos foram incubados a 35° C, por 7 dias;
- . No final de cada período de 24h, os tubos foram colocados no refrigerador por 2h, e analisados quanto a liquefação da gelatina;

Interpretação:

Teste positivo: Organismo teste: meio liquefeito

Teste negativo: Organismo teste: meio continua sólido e deve ser reincubado por um período adicional de até 14 dias.

2.6. Lisina /Arginina /Ornitina

Meio Básico de Moeller

Peptona -----	5g
Extrato de carne -----	5g
Púrpura de bromocresol -----	0,1g
Vermelho de cresol -----	0,005g
Piridoxal -----	0,5g
Glicose (dextrose) -----	0,5g
Água destilada -----	1000ml

Indicador de pH

Púrpura de bromocresol:

Ácido - cor amarela, pH = 5,2.

Alcalino - cor púrpura, pH = 6,8.

- . Suspender os componentes em água destilada;
- . Dissolver por aquecimento à ebulição;
- . Distribuir o meio pronto em quatro porções iguais;
- . Adicionar a três delas os aminoácidos (L - lisina, L - arginina e L - ornitina), na concentração final de 1%, deixando uma como controle;
- . Homogeneizar as soluções e distribuir em porções de 3 ml em tubos 13x100 mm;
- . Autoclavar a 121° C por 10 minutos;
- . Estocar em refrigerador (4-10° C); pH final = 6,0.

Inoculação e Incubação:

- . Cultura pura com 18-24h de incubação;
- . Foi realizado inóculo leve, com alça de fio níquel-cromo;
- . O tubo controle (sem aminoácido) foi inoculado em cada bateria de aminoácido sob investigação;
- . Todos os tubos, inclusive o controle, foram cobertos com 0,5ml de óleo mineral estéril;
- . Os tubos foram Incubados por 48h a 37° C, e examinados diariamente;

Interpretação:

Fermentadores da Glicose

Teste positivo: cor púrpura

Teste negativo: cor amarela

Tubo controle: cor amarela (glicose fermentada)

Não Fermentadores da Glicose

Teste positivo: cor púrpura escuro

Teste negativo: cor púrpura clara a cinza azulado

Tubo controle: cor púrpura clara a cinza azulado

2.7. Agar Mac Conkey

Peptona -----	17g
Protease peptona -----	3g
Lactose -----	10g
Sais de bile -----	1,5g
Cloreto de sódio -----	5g
Agar -----	13,5g
Vermelho neutro -----	0,03g
Cristal violeta -----	0,001g
Água destilada -----	1000ml

.Suspender os componentes em água destilada.

.Dissolver por aquecimento à ebulição.

.Autoclavar a 121° C por 15 minutos.

.Resfriar a 50° C.

.Distribuir em placas de Petri (15x100mm). pH final = 7,1 +/- 0,2.

Inoculação e Incubação

Inóculo em estria, a partir de uma cultura pura de 18-24h.

Incubar a 35-37° C por 24-48h.

Interpretação:

Lactose negativa (Lac -): Colônias transparentes

Lactose positiva (Lac +): Colônias escuras

2.8. Oxidase

Reagente de Kovacs

Dicloridrato de tetrametil-p-fenilenodiamina ----- 1g
Água destilada ----- 100ml

- . Dissolver 1g do reagente em menos de 100ml de água destilada.
- . Aquecer para solubilizar.
- . Transferir para um balão volumétrico e q.s.p. 100ml.
- . Deixar descansar por 15 minutos antes de usar.
- . Estocar em frasco escuro para evitar exposição à luz.

Procedimento indireto (Reagente de Kovacs)

- . Colocar um pedaço de papel de filtro Whatman em uma placa de Petri.
- . Adicionar 2 a 3 gotas do reagente de Kovacs no centro do papel.
- . Colocar uma alça de platina cheia com uma colônia suspeita sobre o papel impregnado de reagente.
- . Observar a reação

Interpretação

Teste positivo: cor rosa a púrpura em 10 segundos.

Teste negativo: ausência de troca de cor.

2.9. Crescimento 42°C

Caldo Nutriente

Na Cl.....5g
Peptona.....10g
Extrato de carne3g
H₂O q.s.p.....1000 ml

- . Pesar cada um dos reagentes separadamente;
- . Despejar os reagentes no Erlenmeyer maior solubilizando-os com água sob a placa de agitação e aquecimento, até o volume final de 1000 ml;
- . Ajustar o pH para 7.4 com NaOH ou HCl;
- . Autoclavar durante 15 minutos a 121° C.

Inoculação e cultivo

O meio líquido foi distribuído no volume de 5 ml em tubos de ensaio 18x160mm; A inoculação e semeadura foram realizadas em capela de fluxo laminar e incubada a 42°C por 24 horas.

3. Métodos de Preservação

3.1. Liofilização (Freeze-drying)

As culturas foram semeadas em meios de cultivo apropriados e após a incubação o crescimento foi coberto com "Skim Milk" (DIFCO 0001) a 10%, retirado com o auxílio de uma alça de "Drigalsky" e transferido para ampolas estranguladas, em volumes de 0.3 a 0.5 ml por ampola. Após a distribuição da suspensão em ampolas, estas foram colocadas em um banho de gelo seco e etanol absoluto, para congelamento rápido, onde a temperatura do banho chega a -70°C. Em 30 - 60 segundos de imersão no banho gelado, a suspensão estava

congelada e foi transferida para um freezer a -70°C , onde permaneceu por 24-48 horas, antes de ser liofilizada. Este congelamento rápido é importante para evitar a formação de cristais de gelo entre as membranas dos microrganismos, o que poderia inviabilizar as células, levando a ruptura de estruturas vitais das células.

Após 72h a -70°C as ampolas foram colocadas no liofilizador com o objetivo de retirar toda água da amostra por meio do congelamento à vácuo. O processo acontece por conta da pressão que o vácuo ocasiona no material fazendo com que haja a passagem da água em estado sólido para o estado gasoso. Após 18h, as ampolas foram transferidas para uma “árvore”, que permite a finalização do processo e o fechamento das ampolas com auxílio de um maçarico de chama dupla. Foram liofilizadas 10 ampolas de cada microrganismo.

4. Preparo de Géis e Tampões

4.1. Tampão

Tris-Borato – EDTA 10X (TBE 10X)

TRIS base _____	121.1g
Acido Bórico _____	61.8 g
NA ₂ EDTA _____	3.7g
Água MilliQ esterilizada q.s.p. _____	1000 mL

Tampão TBE 0.5X

Tampão TBE 10X _____	125 μL
Água MilliQ esterilizada q.s.p. _____	2500 mL

4.2. Gel de agarose (Sambrook, 1989).

.Agarose (sigma A-0169)-----	1,5 g
.TBE (0,5 x)-----	100 ml

.Brometo de etídio (10mg/ml)-----3,0 µl

**5 Esquema da Estação de tratamento de Esgotos das Unidades de Saúde:
Hospital Municipal Lourenço Jorge e Maternidade Leila Diniz**

