Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA
SERGIO AROUCA
ENSP

Circulação de Enterobactérias no Parque Nacional Serra da Capivara (PNSC), Piauí-Brasil: Sua Prospectiva do Trinômio Zoonótico Animal, Homem, Ambiente

por

Jacqueline Darc da Silva Thomé

Tese apresentada como vista à obtenção do título de Doutor em Ciências na área de Saúde Pública

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Augusto de Miranda Chaves

Rio de Janeiro, setembro de 2014

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA
SERGIO AROUCA
ENSP

Esta tese, intitulada

"Circulação de Enterobactérias no Parque Nacional Serra da Capivara (PNSC), Piauí-Brasil: Sua Prospectiva do Trinômio Zoonótico Animal, Homem, Ambiente"

apresentada por

Jacqueline Darc da Silva Thomé

foi avaliada pela Banca Examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Ernesto Hofer

Prof[a]. Dra. Eliane Moura Falavina dos Reis

Prof[a]. Dra. Joseli Maria da Rocha Nogueira

Prof. Dr. Valmir Laurentino Silva

Prof. Dr. Sérgio Augusto de Miranda Chaves - Orientador

Tese defendida e aprovada em 17 de setembro de 2014.

Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA
SERGIO AROUCA
ENSP

A U T O R I Z A Ç Ã O

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, por processos fotocopiadores.

Rio de Janeiro, 17 de setembro de 2014.

_____

Jacqueline Darc da Silva Thomé

A minha amada Família Thomé
Roberto, Pedro e Luiza

Família de amor
Pessoas de luz

AGRADECIMENTOS

A estrada foi longa... desafios inúmeros e de diversas naturezas, mas quando não estamos sozinhos tudo o que desejamos de coração se torna possível. Assim só me resta agradecer a cada um em especial e a todos que estiveram juntos comigo nesta jornada.

A Deus, agradeço por TUDO. Pelas oportunidades, dificuldades e desafios que resultaram em crescimento e aprendizado. Agradeço a Ele pela Força e Saúde que me fizeram despertar a cada dia para a realização deste trabalho. E ainda pela dádiva de conviver diariamente com o meu Bem maior – Meu presente de Deus – Minha família;

Agradeço a meus filhos, queridos, Pedro e Luiza, que apesar de não pedirem, participaram dessa viagem chamada Pós-graduação fazendo dessa fase sua rotina diária, pronunciado a palavra "bactéria" desde seus dois, três aninhos de idade e sabendo o que estavam falando. Obrigada pelos seus beijinhos, abraços e carinhos. Pelo cheirinho de amor eterno. Por existirem e fazer de mim uma pessoa melhor;

Ao meu amado marido e companheiro, Roberto Thomé, homem de força e lealdade mas também de ternura e carinho. Ao meu lado em todos os momentos sendo meu cúmplice, meu parceiro, meu grande amigo e meu grande amor;

A minha querida mãe, Angela Darc, pelo seu exemplo de garra e superação. Mulher de espírito livre e desprendido sempre pronto a ajudar. É maravilhoso ser sua filha;

Ao meu querido pai, Miguel Arcanjo, por me ensinar que sempre é possível achar uma solução para as adversidades.... "um jeito". Esse aprendizado eu devo a você.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Sérgio Augusto de Miranda Chaves, pela sua coragem e pelo aceite na orientação, por sua bondade e compreensão em todos os momentos, e por sua total disponibilidade. Pessoa de luz assim, não esqueço jamais;

Ao Dr. Ernesto Hofer, por prontamente me estender a mão quando mais precisei de ajuda, pelo seu auxílio de diversas formas, por sua sabedoria acadêmica e de vida. Obrigada por me conceder esta honra!

À Dra. Ana Luzia Lauria Filgueiras por permitir a realização dos experimentos em seu laboratório e por tantos anos de convivência e experiências compartilhadas. Para sempre o meu muito obrigada por tudo;

Ao Prof. Dr. Paulo Rubens Guimarães Barrocas por sua gentileza e colaboração, sempre prontamente atendendo aos pedidos de empréstimo de material quando solicitado.

Aos amigos e companheiros de laboratório Wagner Thadeu, Sheila Duque e Gabriella Carneiro pela total colaboração. Estávamos sempre "juntos" e "fechados" e isso foi o nosso diferencial. Obrigada pela ajuda e pelos dias agradáveis. Um agradecimento em especial a amiga Sheila Duque, corresponsável por meu ingresso no Doutorado. Sou muito grata amiga!

Aos colegas de turma pela convivência bastante agradável e aos Professores do curso que brilhantemente dividiram um pouco de seu conhecimento conosco. Em especial a Profa. Dra. e amiga Joseli Maria da Rocha Nogueira que estava sempre disposta a me ajudar a resolver qualquer pendência que aparecia;

Aos funcionários da SECA (Secretaria acadêmica) representados pelo Eduardo que sempre estavam dispostos a ajudar aos alunos em suas necessidades;

Agradeço à Fundação Museu do Homem Americano – FUMDHAM, representada pela Dra. Niède Guidon, por todo o apoio logístico utilizado para as coletas de campo bem como ao Chefe do Parque junto ao ICMBio, Fernando Tizianel, pela permissão da execução do trabalho no Parque Nacional Serra da Capivara;

A todas as pessoas maravilhosas que encontrei na caatinga. Aos meus guias respeitosos e profissionais Edivan e Rogério, as alegres guariteiras (D. Heloisa, Elizandra, Mazé) e tantas outras que me recebiam com um sorriso acolhedor, um café e até um cuscuz quentinho depois de um dia pesado de coleta, a D. Maura, mulher firme e doce que pra mim é a própria personificação da resistência do Sítio do Mocó; ao Sr. João da Borda e a sua esposa que faz o melhor doce de leite que já comi no mundo, a D. Nemezia que prontamente se mostrou alegre a ajudar uma "galega" que chegava em sua propriedade; e a tantos outros nomes, rostos e corações que encontrei no Parque Nacional Serra da Capivara – reduto da beleza natural incomensurável e de pessoas tão especiais;

E os amigos? São tantos e tão importantes! Não conseguirei citar todos e se faltar alguém não fiquem chateados, estão todos marcados em meu coração. Agradeço a ajuda e os momentos de descontração e alegria a todos os amigos de longa data da Fiocruz representados pelo pessoal do terceiro andar (Meninas da Lepto, Listeria´s Mafia, Sr. Evaldo, André Felipe, Dra. Eliane, Sônia e muitos outros) e do quinto andar (Marcos, Cris, e a todos) do Pavilhão Rocha Lima.

E claro que, falando de amigos, não poderia deixar de falar da Liga – Ana Paula, Ale, Bernadete, Carlão, Rossana, Cláudio, Roberta, Georgiana e Vanda – Agradeço por toda união, ajuda mútua, amizade verdadeira, cervejas, festas, confusões, churrascos, reuniões, complôs, risadas, viagens, chopps no Adão e mais amizade e muito mais união e mais alegria e tudo de bom que já passamos juntos e tudo mais que ainda virá;

Agradeço ao apoio desempenhado pelo DATT representado pela minha xará Jacqueline;

À Capes e ao CNPq pelo apoio financeiro e à ENSP / FIOCRUZ, pela oportunidade de participar do curso de doutorado e avançar na minha vida acadêmica;

E por todas as pessoas que cruzaram meu caminho e que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho, MUITO OBRIGADA!!!

Para viver e fazer, é necessário manter uma coragem constante e acesa.

João Ubaldo Ribeiro

RESUMO

Palavras-chave: Parque Nacional Serra da Capivara; bactérias; enteropatógenos.

O Parque Nacional Serra da Capivara (PNSC) é um ambiente propício para o desenvolvimento e conservação de grande número de espécies endêmicas da caatinga, além de ser uma região de importância ímpar, pois é o maior sítio arqueológico do Brasil. A água nesta região é escassa e o contato das pessoas e seus animais domésticos e de criação com os animais silvestres faz com que aumente a possibilidade de circulação de possíveis patógenos, possibilitando a emergência de doenças tanto no homem quanto em animais. Este trabalho teve como objetivo analisar a presença e circulação de bactérias potencialmente enteropatogênicas e zoonóticas na região do Parque Nacional Serra da Capivara, localizado no sudeste do Estado do Piauí – Brasil. Coletas de amostras de água, fezes humanas e de animais silvestres e de criação foram realizadas em diferentes regiões no interior e no seu entorno, durante as idas ao campo, computando um montante de 170 amostras coletadas. Obteve-se 522 isolados pertencentes aos seguintes gêneros/espécies da família Enterobacteriaceae: *Escherichia coli* (32,6%); *Enterobacter* spp. (22,8%); *Klebsiella* spp. (11,8%); *Salmonella* spp. (10%), *Citrobacter* spp. (9,2%) dentre outros. Não foi possível o isolamento de amostras do gênero *Campylobacter*, importante enteropatógeno de impacto para a Saúde Pública. O percentual de resistência das amostras a pelo menos uma das drogas testadas foi de 71% sendo mais representativos para os fármacos: penicilina, cefoxitina e tetraciclina. A vigilância dos sorovares de *Salmonella* em ambientes aquáticos constitui um importante elemento para o monitoramento de infecções humanas e animais. Neste estudo foram identificados 11 sorovares de *Salmonella:* Worthington, Panama, Brooklyn, Glasgow, Braenderup, Isangi, Grumpensis, Rubislaw, Miami, Cerro, Thompson e duas amostras identificadas como *Salmonella enterica* subsp. *houtenae*. Quando analisadas quanto ao seu perfil filogenético, observou-se 14 clones distintos. Isolados com mesma origem clonal circulam em diferentes pontos de coletas no interior e entorno do Parque Nacional Serra da Capivara. Os dados obtidos neste estudo são relevantes para a Saúde Pública, pois contribuem para o monitoramento ambiental a partir do conhecimento da epidemiologia dos enteropatógenos circulantes no ambiente, impactando animais e a população que habita na região do PNSC.

ABSTRACT

Keywords: Parque Nacional Serra da Capivara; bacteria; enteropathogens.

The National Park “Serra da Capivara” (PNSC) is a proper environment for the development and conservation of a great number of species of the caatinga and endemic species, it is also a region of singular importance for being the largest archaeological site in Brazil. The water in this region is scant and the contact of people and of their animal whether they are pets or for breeding, with the wild animals incresases the probability of circulation of pathogens, making it possible for the appearance of deseases in men and in other animals. This study had the objective of analisyng the presence and circulation of bacterias potencially enteropathenogenic and zoonotic in the region of the National Park “Serra da Capivara”, located in the southeast of the state of Piaui – Brazil. Water samples, feces of humans and of breeding and wild animals were collected in different regions inside and in the surroundings of the PNSC, during trips to the field mounting up to 170 samples collected. Five Hundred and twenty two isolated were obtained to the following genus/species of the family Enterobacteriaceae: *Escherichia coli* (32.6%); *Enterobacter* spp. (22.8%); *Klebsiella* spp (11.8%); *Salmonella* spp (10%), *Citrobacter* spp. (9.2%) amongst others. The isolation of the sample of the genus *Campylobacter*, important enteropathogen of public health impact, was not possible. The percentage of resistence of the samples to, at least, one of the drugs tested was from 71% and the percentages of resistence were more representative for the drugs: penicilin, cefoxitin and tetracyclin. The surveillance of *Salmonella* serovars in aquatic environment constitutes an important element for the monitoring of animal and human infections. In this study 11 different *Salmonella* serovars were identified: Worthington, Panama, Brooklyn, Glasgow, Braenderup, Isangi, Grumpensis, Rubislaw, Miami, Cerro, Thompson and 2 samples identified as *S. enterica* subsp. *houtenae*. When analysed according to their filogenetic profile, they produced 14 different clones. Isolate samples with same clonal origen circulate in distinct points of collect inside and in the surroundings of the PNSC. The data obtained in this study are relevant for public health, because they contribute to the environmental monitoring based on epidemiology knowledge of the enteropathogens circuling in the environment, causing impact on the animals and in the population living in the area. of the PNSC.

LISTA DE ABREVIATURAS

AA = adesão agregativa

AMP = Ampicilina

APA = Área de Proteção Ambiental

APEC = *Escherichia coli* patogênicas aviárias

APP = Área de Preservação Permanente

ARIE = Área de Relevante Interesse Ecológico

ATCC = *American Type Culture Collection*

BFP = *bundle-forming pilus*

BPF = Boqueirão da Pedra Furada

C = Cloranfenicol

CAAE = Certificado de Apresentação para Apreciação Ética

CAPES = Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CDC = Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos EUA

CEP = Comitê de Ética em Pesquisa

CIP = Ciprofloxacina

CLSI = *Clinical Laboratory and Standards Institute*

CN = Gentamicina

CNS = Conselho Nacional de Saúde

CAZ = Ceftazidima

CONAMA = Conselho Nacional do Meio Ambiente

DATT = Departamento de Apoio Técnico Tecnológico do IOC/Fiocruz

DENSP = Departamento de Endemias Samuel Pessoa da ENSP/Fiocruz

DNA = Ácido desoxirribonucleico

DTA = Doenças Transmitidas por Alimentos

EaggEC = *Escherichia coli* enteroagregativa

E. coli = *Escherichia coli*

EHEC = *Escherichia coli* enterohemorrágica

EIEC = *Escherichia coli* enteroinvasora

EMB = *Eosin Methylene Blue*

ENSP = Escola Nacional de Saúde Publica Sergio Arouca

EPEC = *Escherichia coli* enteropatogênicas

Esec = Estação Ecológica

ExPEC = *Escherichia coli* patogênica extra intestinal

F = Nitrofurantoína

Fago O1 = Vírus bacteriófagos *Salmonella* spp.

FIOCRUZ = Fundação Oswaldo Cruz

FOX = Cefoxitina

Flona = Floresta Nacional

FUMDHAM = Fundação Museu do Homem Americano

GBS = Síndrome de Güillain-Barré

H = antígeno flagelar

ha = hectare

IBDF = Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal

ICMBio = Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade

IMP = Imipenem

IOC = Instituto Oswaldo Cruz

LRNEB = Laboratório de Referência Nacional de Enteroinfecções Bacteriana

LT = Toxina termo lábil

MN = Monumento Natural

NA = Acido Nalidíxico

O = antígenos somáticos

O157:**H7** = sorotipo de *Escherichia coli* enterohemorrágicas

OMS = Organização Mundial de Saúde

Parna = Parque Nacional

PE = Pernambuco

PFGE = *Pulsed Field Gel Electrophoresis*

Plasmídeo EAF = plasmídeo carreador do gene EPEC *Adherence Factor*

PNSC = Parque Nacional Serra da Capivara

RDS = Reserva de Desenvolvimento Sustentável

Rebio = Reserva Biológica

Refau = Reserva de Fauna

Resex = Reserva Extrativista

RPPN = Reserva Particular do Patrimônio Natural

RVS = Refúgio de Vida Silvestre

S = Estreptomicina

SECA = Serviço de Gestão Acadêmica

SXT = Sulfametoxazol-Trimetoprim

SHU = Síndrome Hemolítica Urêmica

SINAN = Sistema de Informação de Agravos de Notificação

SISBIO = Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade

SNUC = Sistema Nacional de Unidades de Conservação

ST = Toxina termoestável

Stx = Toxina de Shiga

SIM = Médio de cultura H_2S - Indol - Motilidade

SUS = Sistema Único de Saúde

TE = Tetraciclina

TSA = Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos

TSI = *Triple Sugar Iron* Agar

UC = Unidade de Conservação

UNESCO = Organização das Nações Unidas para a Educação, a Ciência e a Cultura

VT = Verotoxina

XbaI = Endonuclease de restrição

SUMÁRIO

1. Introdução 22

1.1. Zoonoses 22

1.2. Zoonoses Bacterianas 24

1.2.1. *Campylobacter* spp. 25

1.2.2. *Escherichia coli* 26

1.2.3. *Salmonella* spp. 28

1.3. Circulação de Bactérias Zoonóticas no Ambiente 35

1.4. Saúde Ambiental sob a Perspectiva dos Patógenos Zoonóticos Bacterianos 38

1.5. Unidades de Conservação Brasileiras 40

1.6. Parque Nacional Serra da Capivara – Piauí/Brasil 44

2. Objetivos 47

2.1. Objetivos Gerais 47

2.2. Objetivos Específicos 47

3. Materiais e Métodos 48

3.1. Área de Estudo 48

3.2. Aspectos Éticos 52

3.3. Autorização para Coleta de Amostras Ambientais 52

3.4. Local de Execução das Análises Laboratoriais 53

3.5. Expedição de Ida a Campo 53

3.6. Amostragem 53

3.6.1. Amostras Humanas 54

3.6.2. Amostras Animais 54

3.6.3. Amostras Ambientais 55

3.7. Coleta das Amostras 61

3.7.1. Metodologia Empregada para a Coleta de Amostras Fecais de Origem Humana 61

3.7.2. Metodologia Empregada para a Coleta de Amostras Fecais de Origem Animal 61

3.7.3. Metodologia Empregada para a Coleta de Amostras Ambientais –Amostras de Água dos Corpos d´Água 62
3.8. Transporte das Amostras 62
3.9. Processamento das Amostras 63
3.9.1. Isolamento Bacteriano 63
3.9.2. Caracterização Bioquímica 64
3.9.3. Manutenção das Amostras Bacterianas 65
3.9.4. Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos (TSA) 65
3.10. Caracterização antigênica de *Salmonella* spp. 67
3.11. Eletroforese em Campo Pulsado (PFGE - *Pulsed Field Gel Eletrophoresis*) para Amostras de *Salmonella* spp. 67
4. Resultados e Discussão 68
4.1. Isolamento de Bactérias Gram-negativas nas Amostras de Diferentes Origens 68
4.2. Caracterização Bioquímica das Bactérias Gram-negativas 68
4.3. Avaliação da Suscetibilidade Bacteriana aos Antimicrobianos 84
4.4. Identificação dos Sorovares de *Salmonella* Isolados 97
4.5. Caracterização Filogenética dos Sorovares de *Salmonella* Isolados Utilizando a Técnica de PFGE (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*) 102
4.6. Aspectos Eco-epidemiológicos 112
5. Conclusões 114
6. Referências Bibliográficas 117
7. Anexos 132

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Número de Casos Confirmados de febre tifóide no Brasil e Notificados ao Sistema de Informação de Agravos de Notificação – SINAN-NET – Período 2001-2012 30

Tabela 2 – Número de Casos de Salmonelose Confirmados nos Estados e Notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação – SINAN-NET – Período 2001-2012 31

Tabela 3 – Agentes Etiológicos Associados aos Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil, Período 2000-2013 33

Tabela 4 – Total de Amostras Coletadas e suas Respectivas Fontes de Isolamento 53

Tabela 5 – Número de Amostras Fecais Provenientes de Animais e seus Respectivos Locais de Origem 55

Tabela 6 – Distribuição dos Isolados de Bactérias Gram-negativas em cada Período de Coleta segundo a Fonte de Origem 68

Tabela 7 – Número de Bactérias Gram-negativas Fermentadoras Isoladas de acordo com o Período de Coleta e Fonte de Isolamento 69

Tabela 8 – Número e Percentual de Isolados das Coproculturas Humanas Classificados nos Gêneros e/ou Espécies da Família Enterobacteriaceae Distribuídos segundo os Períodos de Coleta 70

Tabela 9 – Número e Percentual de Isolados das Coproculturas Animais Classificados nos Gêneros e/ou Espécies da Família Enterobacteriaceae Distribuídos segundo os Períodos de Coleta 72

Tabela 10 – Número e Percentual de Isolados das Amostras Ambientais Classificados nos Gêneros e/ou Espécies da Família Enterobacteriaceae Distribuídos segundo os Períodos de Coleta 73

Tabela 11 – Distribuição Numérica e Percentual de Gêneros e/ou Espécies da Família Enterobacteriaceae Isoladas das Diferentes Fontes de Isolamento (espécimes humanos e animais e do meio ambiente - água) 74

Tabela 12 – Número e Percentual de Gêneros e/ou Espécies da Família Enterobacteriaceae Isoladas Oriundas das Diferentes Fontes de Isolamento e Pontos de Coleta nos Dois Períodos 77

Tabela 13 – Nível de Resistência aos Antimicrobianos nas Amostras dos Gêneros/Espécies de Enterobactérias Isolados das Diferentes Fontes 90

Tabela 14 – Perfis de Resistência Distribuídos pelas Fontes de Isolamento e Respectivos Pontos de Coleta 93

Tabela 15 – Isolados Ambientais de *Salmonella* spp. Provenientes do Período de Junho de 2012, Distribuídos pelos Pontos de Coleta e a Respectiva Suscetibilidade Antimicrobiana 97

Tabela 16 – Sorovares de *Salmonella* spp. Isolados de Diferentes Fontes no Período de Janeiro de 2013 Analisados pela Técnica PFGE e a Respectiva Suscetibilidade aos Antimicrobianos 98

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Número de Surtos e de Doentes por Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil, Período 2000-2013 32

Gráfico 2 – Relação entre o Total de Isolados Bacterianos Analisados (n=169) e o Número de Isolados Bacterianos Resistentes a cada Antimicrobiano Testado (Junho/2012) 85

Gráfico 3 – Relação entre o Total de Isolados Bacterianos Resistentes (n=108) e o Número de Isolados Bacterianos Resistentes a cada Antimicrobiano Testado (Junho/2012) 86

Gráfico 4 – Relação entre o Total de Isolados Bacterianos Analisados (n=353) e o Número de Isolados Bacterianos Resistentes a cada Antimicrobiano Testado (Janeiro/2013) 87

Gráfico 5 – Número e Percentual de Resistência aos Antimicrobianos nas Amostras Coletadas no Período de Janeiro de 2013 88

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Localização do Parque Nacional Serra da Capivara – PI/Brasil 48

Figura 2 – Imagens do Parque Nacional Serra da Capivara – PI/Brasil 51

Figura 3 – Demonstração dos Locais de Coleta 57

Figura 4 – Mapa dos Pontos de Coleta 58

Figura 5 – Coleta de Água Utilizando Sistema de Filtração 62

Figura 6 – Distribuição dos Grupos Filogenéticos de *Salmonella* spp. Avaliados através de PFGE Digeridos pela Enzima XbaI (Homologia entre 55% e 100%) e Padrões Calculados pelo Coeficiente de Dice 103

Figura 7 – Distribuição dos Grupos Filogenéticos de *Salmonella* ser. Braenderup Avaliados através de PFGE Digeridos pela Enzima XbaI (Homologia = 100%) e Padrões Calculados pelo Coeficiente de Dice 104

Figura 8 – Distribuição dos Grupos Filogenéticos de *Salmonella* ser. Cerro Avaliados através de PFGE Digeridos pela Enzima XbaI (Homologia = 100%) e Padrões Calculados pelo Coeficiente de Dice 105

Figura 9 – Distribuição dos Grupos Filogenéticos de *Salmonella* ser. Brooklyn Avaliados através de PFGE Digeridos pela Enzima XbaI (Homologia = 100%) e Padrões Calculados pelo Coeficiente de Dice 106

Figura 10 – Distribuição dos Grupos Filogenéticos de *Salmonella* ser. Glasgow Avaliados através de PFGE Digeridos pela Enzima XbaI (Homologia entre 50% e 100%) e Padrões Calculados pelo Coeficiente de Dice 106

Figura 11 – Distribuição dos Grupos Filogenéticos de *Salmonella* ser. Isangi Avaliados através de PFGE Digeridos pela Enzima XbaI (Homologia entre 70% e 100%) e Padrões Calculados pelo Coeficiente de Dice 107

Figura 12 – Distribuição dos Grupos Filogenéticos de *Salmonella* ser. Miami Avaliados através de PFGE Digeridos pela Enzima XbaI (Homologia = 94%) e Padrões Calculados pelo Coeficiente de Dice 108

Figura 13 – Distribuição dos Grupos Filogenéticos de *Salmonella* ser. Grumpensis avaliados através de PFGE digeridos pela enzima XbaI (Homologia entre 70% e 100%) e padrões calculados pelo Coeficiente de Dice. 108

Figura 14 – Distribuição dos Grupos Filogenéticos de *Salmonella* ser. Panama Avaliados através de PFGE Digeridos pela Enzima XbaI (Homologia entre 60% e 100%) e Padrões Calculados pelo Coeficiente de Dice 109

Figura 15 – Distribuição dos Grupos Filogenéticos de *Salmonella* ser. Rubislaw Avaliados através de PFGE Digeridos pela Enzima XbaI (Homologia = 66%) e Padrões Calculados pelo Coeficiente de Dice 110

Figura 16 – Distribuição dos Grupos Filogenéticos de *Salmonella* ser. Thompson Avaliados através de PFGE Digeridos pela Enzima XbaI (Homologia entre 60% e 100%) e Padrões Calculados pelo Coeficiente de Dice 110

Figura 17 – Distribuição dos Grupos Filogenéticos de *Salmonella* ser. Worthington Avaliados através de PFGE Digeridos pela Enzima XbaI (Homologia = 100%) e Padrões Calculados pelo Coeficiente de Dice 111

Figura 18 – Pontos de Coleta Positivos para Isolamento de *Salmonella* spp. 113

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Categorias de Unidades de Conservação previstas pelo Sistema Nacional de Unidades de Conservação – SNUC 42

Quadro 2 – Locais e Período de Coleta de Amostras Ambientais, com sua Respectiva Origem e Utilização 59

Quadro 3 – Sistema Simplificado de Provas Bioquímicas para a Identificação dos Principais Gêneros da Família Enterobacteriaceae 64

Quadro 4 – Fármacos Utilizados para a Avaliação do Perfil de Suscetibilidade aos Antimicrobianos 66

LISTA DE FOTOS

Foto 1 – Área Urbana do Município de São Raimundo Nonato – PI/Brasil 49

Foto 2 – Município de Coronel José Dias – PI/Brasil 49

Foto 3 – Município de João Costa – PI/Brasil 49

Foto 4 – Vista do Sítio do Mocó – Município de Coronel José Dias – PI/Brasil 54

Foto 5 – Amostra de Origem Animal à Beira do Caldeirão do Gado (Município de Coronel José Dias – PI/Brasil) e o Dispositivo Utilizado para a Coleta (*swab* com meio de transporte) 61

1. INTRODUÇÃO

Sob os preceitos da saúde ambiental como área interdisciplinar contribuindo para o desenvolvimento humano sustentável, do ponto de vista da questão da saúde, a influência e a interferência do ambiente podem ser positivas ou negativas, na medida em que promovam condições que propiciem o bem-estar e a plena realização das capacidades humanas para todas as populações ou contribuam para o aparecimento e manutenção de doenças, agravos e lesões traumáticas, colaborando para estado de doença, aniquilamento e morte da população como um todo ou de grupos populacionais particulares[1].

Segundo definição da Organização Mundial de Saúde[2], a Saúde ambiental compreende aqueles aspectos da saúde humana, das enfermidades, dos danos e do bem-estar que são determinados ou influenciados por fatores do meio ambiente. Saúde ambiental também se refere à teoria e prática de avaliar, prevenir, corrigir e controlar os riscos do ambiente que potencialmente podem prejudicar a saúde individual e coletiva de gerações atuais e futuras. Seu estudo inclui tanto os efeitos patológicos diretamente relacionados aos fatores físicos, químicos, radiológicos e biológicos quanto aos efeitos na saúde e bem-estar derivados do meio físico, psicológico, social e estético em geral, compreendendo a habitação, desenvolvimento urbano, uso da terra e transporte[3].

Neste cenário, relacionando-se com os efeitos patológicos dos fatores biológicos contidos no estudo da saúde ambiental, as doenças se transmitem sob condições naturais, desempenhando e cumprindo, enquanto hospedeiros ou reservatórios ou como fonte de infecção, importantes e fundamentais papéis na manutenção e persistência desses agravos na natureza. Tanto os animais como o homem podem contrair as infecções das mesmas fontes, como o solo, a água, os animais invertebrados e as plantas, daí a questão das zoonoses[4].

1.1. Zoonoses

As doenças infecciosas ainda encontram-se entre as principais causas de mortes no mundo. O custo dos novos casos de infecção para as sociedades em termos de recursos humanos podem representar enormes impactos nas taxas de mortalidade e morbidade[5].

As doenças transmissíveis dos animais aos seres humanos, que podem ser adquiridas diretamente ou através da ingestão de alimentos contaminados, são denominadas zoonoses. A maioria dos patógenos humanos são zoonóticos e muitos têm suas origens na vida selvagem.

A gravidade dessas doenças para o homem pode variar de sintomas leves a condições de ameaça à vida. Para prevenir a ocorrência das zoonoses, é importante identificar as fontes de infecção e os mecanismos de propagação dessas infecções[5, 6].

Em 1958, um comitê de especialistas da Organização Mundial de Saúde conceituou zoonoses como as enfermidades transmissíveis dos animais vertebrados ao homem, e as que são comuns ao homem e aos animais. No primeiro grupo, os animais desempenham uma função essencial para que a infecção se mantenha na natureza, sendo o homem apenas um hospedeiro acidental; no segundo grupo, tanto os animais quanto os homens contraem a infecção das mesmas fontes, tais como o solo, a água, animais invertebrados e as plantas; nesta situação os animais, via de regra, não desempenham papel essencial no ciclo vital do agente etiológico, contudo, podem contribuir em grau variável para a distribuição e a transmissão das infecções. Esta definição continua sendo válida até hoje[7].

Mais de 200 zoonoses são conhecidas passando pelos diferentes níveis taxonômicos como bactérias, vírus, protozoários e helmintos, sendo causa de consideráveis morbidade e mortalidade em grupos demográficos vulneráveis, especialmente crianças, idosos e trabalhadores ligados às áreas da saúde pública e veterinária[8, 9, 10].

Doenças de vultuosa importância para a Saúde Pública como a raiva, doença provocada por vírus e transmitida através da mordida de um animal contaminado; dengue, virose transmitida pela picada do mosquito *Aedes aegypti*; histoplasmose, fungos presentes em fezes secas de aves e mamíferos voadores e Toxoplasmose, doença transmitida principalmente por alimentos/água contaminados com fezes de felinos (oocistos), são exemplos da grande diversidade dos grupos de agentes etiológicos relacionadas às zoonoses[8, 9, 11].

As doenças transmitidas entre as espécies animais, tanto silvestres quanto domésticas e o homem, têm impactos importantes na Saúde Pública, no setor da economia movimentado pelo comércio de animais domésticos e na proteção e preservação dos animais silvestres. Num panorama global, estima-se que 61% de todos os agentes patogênicos do homem e 75% daqueles emergentes são zoonóticos[12, 13]. Devido à natureza destes patógenos, há uma necessidade crescente para a implantação das boas práticas de manejo e programas de saúde animal, com o objetivo de preservar a saúde e o bem-estar animal, com reflexos na saúde humana e no meio ambiente[8].

A questão da presença dos animais no ambiente é de suma importância, sendo que sua adaptação dos animais às áreas urbanas está associada a diversas relações ecológicas, como

simbioses, parasitismos e outros fenômenos vinculados à presença do homem. Atualmente, o homem e os animais compartilham o mesmo ambiente e os mesmos perigos nas cidades, pois as populações que se transferem para as cidades levam consigo os seus animais domésticos. Especialmente nas periferias dessas regiões, os serviços de coleta e destinação do lixo são precários e há carência de aterros sanitários, fornecimento de água potável e drenagens das águas residuais, o que dificulta a ocupação do solo pelo homem e favorece a proliferação de insetos e roedores[14, 15].

Outros fatores que têm contribuído para a expansão das zoonoses se relacionam com a penetração do homem em novas áreas geográficas e zonas ecológicas, para colonização ou desmatamento, e a disseminação de novas espécies de animais entre as populações humanas. Além do agente infeccioso, dos hospedeiros e do meio ambiente, os fatores sociais, políticos e econômicos, são responsáveis pelo aparecimento ou recrudescimento das zoonoses na comunidade, levando à baixa qualidade de vida de uma grande parte da população e favorecendo o desenvolvimento de enfermidades[10, 16].

Outro aspecto a analisar, relaciona-se aos danos provocados pelas zoonoses à economia, principalmente em países em desenvolvimento, onde sua incidência é mais significativa, podendo causar a incapacitação física ou mental de grande número de indivíduos na faixa etária mais produtiva[15]. Entre as zoonoses, destacam-se os agentes bacterianos das doenças diarreicas, que constituem um dos mais significativos problemas de Saúde Pública, sendo responsabilizados por elevadas taxas de morbi-mortalidade em humanos[10].

1.2. Zoonoses Bacterianas

Doenças transmitidas dos animais vertebrados para o homem tendo uma bactéria como agente etiológico responsável são denominadas zoonoses bacterianas. As zoonoses bacterianas sempre foram um grande problema para a Saúde Pública e durante o século XX diversas infecções zoonóticas de ocorrência bacterianas ditas controladas tiveram o seu ressurgimento. Como principais exemplos podemos citar a tuberculose causada pelas micobactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis, M. bovis* e *M. africanum*), a listeriose que é uma zoonose de grande importância em Saúde Pública, visto que pode ocasionar aborto, septicemias e meningites e a leptospirose causada por diversas espécies do gênero *Leptospira;* mas ainda temos as doenças que são transmitidas pelo contato

próximo com animais domésticos ou selvagens, como peste (*Yersinia pestis*) e outras yersinioses, febre Q (*Coxiella burnetii*), brucelose (gênero *Brucella*) e a salmonelose (*Salmonella* spp.)[17].

Há ainda doenças transmissíveis associados com estados de imunossupressão do hospedeiro como pneumonias causadas por *Rhodococcus equi* ou angiomatose bacilar causada por *Bartonella henselae,* sem deixar de citar as zoonoses transmitidas por vetores, tais como a doença de lyme (*Borrelia burgdorferi*), erliquiose humana (*Ehrlichia chaffeensis*) ou ainda a doença da febre maculosa (*Rickettsia rickettsii*) e a tularemia (*Francisella tularensis*) dentre outras inúmeras zoonoses de importância relevante[10].

Os patógenos bacterianos zoonóticos são micro-organismos que podem ter distribuição ubíqua, sobrevivendo sob condições favoráveis e reproduzindo-se em ambientes terrestres e aquáticos. As bactérias zoonóticas são aquelas que têm um ciclo tipicamente em animais domésticos ou silvestres podendo ou não causar a doença em seus hospedeiros específicos, além de veicular direta ou indiretamente os agentes nas populações humanas. Dentre as clássicas bactérias zoonóticas enteropatogênicas com impacto expressivo na saúde da população humana, podemos citar: *Campylobacter* spp, *Escherichia coli* pertencentes às categorias patogênicas e *Salmonella* spp.[16].

1.2.1. *Campylobacter* spp.

O gênero *Campylobacter* compreende um grupo de bactérias Gram-negativas que colonizam o trato gastrintestinal de uma variedade de hospedeiros. Apresentam morfologia celular típica de bastonetes curvos, espiralados ou em forma de "**S**"[18].

A partir de 2007, a campilobacteriose foi a doença zoonótica bacteriana mais frequentemente registrada no homem na União Europeia, com mais de dois mil casos confirmados e com tendência a aumento, seguido pela salmonelose, que foi a segunda zoonose mais registrada, com 151.995 isolados humanos confirmados[19].

As espécies do gênero *Campylobacter* não produzem endósporos, são quimiorganotróficos, produzem a enzima oxidase, são urease negativas (exceção de algumas cepas de *Campylobacter lari*) e não utilizam a via oxidativa e/ou fermentativa de carboidratos (oxidam aminoácidos e ácidos tricarboxílicos). A maioria é microaerófila, necessitando de 3-15 % O_2 e de 3-5% CO_2 e metabolismo do tipo respiratório[20].

No que concerne aos fatores de virulência, os dois mecanismos clássicos de agressão

dos enteropatógenos são utilizados, isto é, por ação de enterotoxinas e pela capacidade invasiva[21]. Em amostras recentemente isoladas de animais, esses dois mecanismos foram detectados, o que reforça a importância dos animais como hospedeiros e possíveis veiculadores da infecção para o homem[22].

Todavia o que se observa com infecções experimentais, com *Campylobacter jejuni,* é que nem sempre existe uma reprodução do quadro agudo apresentado pelo homem. Os animais comportam-se, nestas infecções experimentais, de modo similar aos portadores humanos assintomáticos frequentes nos países tropicais, mantendo a infecção de forma endêmica e carreando diferentes sorotipos de *C. jejuni* [23].

Os sintomas da campilobacteriose podem se confundir com aqueles causados, por outros enteropatógenos como *Salmonella* spp., embora a doença possa ter um período de incubação maior (2-11 dias), duração mais prolongada (3 dias a 3 semanas) e febre mais intensa[24]. A dor abdominal pode ser violenta, a ponto de o paciente ser hospitalizado com suspeita de apendicite e chegar a um procedimento cirúrgico desnecessário[25].

Em algumas situações, 7-10 dias após o aparecimento da infecção entérica cerca de 1% ou mais dos pacientes tem como consequência a Síndrome de Reiter (artrite reativa) que mesmo sendo benigna, implica na incapacidade dos portadores por várias semanas ou mesmo meses[26].

Outro dado importante a se assinalar é a ocorrência de casos da Síndrome de Güillain-Barré (GBS) dias ou semanas após infecção intestinal causada por *C. jejuni*. Essa síndrome autoimune é uma doença inflamatória aguda desmielinizante do sistema nervoso periférico, que leva a paralisia flácida podendo comprometer os músculos da respiração e levar à morte. Desde a erradicação da poliomielite, a GBS é a causa mais frequente de paralisias neuromusculares flácidas em países industrializados, ocasionando recomendações tanto sobre a notificação de casos quanto aos procedimentos de controle dessa infecção[27].

1.2.2. *Escherichia coli*

Escherichia coli é um membro da microbiota intestinal normal do homem e animais, sendo encontrada nas fezes de indivíduos com excelente estado de saúde, mas também pode se apresentar como um patógeno importante[28].

Também pertencente à família Enterobacteriaceae e a diversidade patogênica de *E. coli* é notável. A espécie compreende ao menos cinco categorias que causam infecção intestinal por diferentes mecanismos e várias outras associadas a quadros clínicos como infecções

urinárias, meningite dentre as infecções extra intestinais. As categorias que causam infecção intestinal são coletivamente denominadas *E. coli* diarreiogênicas[28]. Os grupos de *E. coli* que causam diarréia são classificados em grupos de patogenicidade com base nas propriedades de virulência, mecanismos de patogenicidade, sintomas clínicos e sua sorologia. Os cinco patotipos principais incluem *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enteroagregativa (EAggEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC) e *E. coli* enterohemorrágicas (EHECs)[29].

De um ponto de vista zoonótico, EHEC é o único grupo de patogenicidade de *E. coli* de grande interesse, pois é neste grupo que cepas produtoras de toxinas Shiga são capazes de causar doença grave em humanos quando estão sendo transmitidos através da cadeia alimentar de seus reservatórios animais. Um foco de estudo são os fatores de patogenicidade, as doenças, os reservatórios e ecologia na exploração, transmissão na cadeia alimentar, crescimento e sobrevivência em alimentos e no meio ambiente[29].

As *E. coli* enterohemorrágicas (EHECs) estão relacionadas a surtos epidêmicos de diarreia em países desenvolvidos. A maioria dos surtos de infecções por EHEC é causada por amostras do sorotipo O157:H7; no entanto, mais de 100 sorotipos de *E. coli* produtoras da toxina de Shiga já foram associados à colite hemorrágica e/ou síndrome hemolítica urêmica (SHU)[30].

O fator-chave para a virulência das EHEC é a produção da toxina de Shiga (Stx) ou verotoxina (VT) que possuem efeito citotóxico em células Vero. As EHECs colonizam exclusivamente o cólon, onde liberam a toxina Stx. Uma vez liberada, a Stx atinge a corrente sanguínea é transportada até os rins, onde produzirá danos às células do endotélio renal, obstruindo a microvascularidade por ação direta de sua toxicidade, acompanhado da indução de citocinas locais e produção de quimiocina, culminando na inflamação renal. Esse dano pode levar à Síndrome Hemolítica Urêmica (SHU), que é caracterizada por anemia hemolítica e trombocitopenia, acompanhadas de insuficiência renal aguda, potencialmente fatal[28].

Categorias patogênicas de *E. coli* como as encontradas em aves domésticas são chamadas *E coli* patogênicas aviárias (APEC). As bactérias APEC pertencem a um grupo diferente de *E. coli* patogênica extra intestinal (ExPEC). Como a expressão sugere, estas bactérias causam infecções externas ao trato gastrointestinal, exemplificando as infecções no trato urinário, cavidade abdominal e meninges. Alguns estudos têm sugerido um possível potencial zoonótico dessas estirpes de APEC[31].

1.2.3. *Salmonella* spp.

O gênero *Salmonella* é constituído por bacilos não esporulados, Gram-negativos, medindo 0,7 –1,5μm por 2-5μm, a maioria é móvel com flagelos peritríquios, exceção dos sorovares Gallinarum e Pullorum[32], com metabolismo anaeróbio facultativo. São fermentadores de glicose produzindo ácidos e gás (com exceção da *Salmonella* ser. Typhi e Gallinarum) e raramente fermentam a sacarose, lactose ou adonitol. Crescem à temperatura de 37º C e dentre as características bioquímicas principais, as salmonelas são oxidase negativo, catalase positivo, indol e Voges-Proskauer negativo, não hidrolisam a ureia e ainda positivas nas provas de sulfeto de hidrogênio, citrato de Simmons, lisina e ornitina descarboxilase[33].

Não apresentam exigências nutricionais específicas, e se destacam por crescimento em meios seletivos diferenciais, devido a sua capacidade de se desenvolver na presença de impedientes como, por exemplo, sais biliares, verde brilhante, dentre outros. Apresentam variável adaptação fisiológica demonstrada pela habilidade de alguns sorovares sobreviverem em condições ambientais variáveis como pH entre 7,0 a 7,5 mas podem chegar aos extremos 3,8 a 9,5; temperatura adequada de crescimento de 35 a 43ºC mas também se desenvolvem nas temperaturas mais extremas de 7 a 49,5ºC e na presença ou ausência de O_2, inclusive em atmosfera com 20 a 50% de CO_2 e atividade hídrica de $\geq 0{,}94$[32].

A classificação das salmonelas é muito complexa e, apesar de discordâncias entre os autores ao longo de anos, aproximadamente a partir de 1970, com o uso de métodos moleculares de homologia de DNA pode se definir mais claramente o quadro taxonômico deste gênero[34].

Estudos baseados na hibridização do DNA, permitem a classificação do gênero *Salmonella* em duas espécies geneticamente distintas: *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*[35]. Particularmente *Salmonella enterica*, de acordo com seu perfil bioquímico e a capacidade de lise do fago O1, se divide em seis subespécies: *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, *Salmonella enterica* subsp. *salamae*, *Salmonella enterica* subsp. *arizonae*, *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae*, *Salmonella enterica* subsp. *houtenae* e *Salmonella enterica* subsp. *indica*[36, 37].

Na nomenclatura atual, de acordo com as modificações taxonômicas estabelecidas, as antigas espécies são agora consideradas sorovares ou sorotipos, razão pela qual os sorovares da subespécie entérica devem ser designados da seguinte maneira: *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhi, ou de maneira simplificada, *Salmonella* ser. Typhi ou ainda *S*. Typhi, para uso intralaboratorial[35, 36].

Como a categoria taxonômica deste gênero é definida com base em suas características bioquímicas e antigênicas,a taxonomia e nomenclatura de *Salmonella* spp. vem se alterando ao longo do tempo, proposta por diferentes autores. Existe uma proposta atual, mas que ainda não é totalmente aceita de que a classificação do gênero *Salmonella* seja composta por duas espécies, *Salmonella bongori* e *Salmonella enterica*, mas ainda não existe total concordância no meio acadêmico[38, 39].

A salmonelose constitui-se em importante problema de saúde pública, sendo a forma de gastroenterite aguda a mais comum[30]. As formas de bacteremias com focos de infecção extra intestinais são menos frequentes. Dentre as Salmonelas adaptadas ao homem destaca-se a *S. enterica* ser. Typhi, agente da febre tifóide, doença infecciosa aguda e sistêmica[39].

Confrontando a configuração clínica clássica das infecções produzidas pelas salmonelas, observam-se distintas constatações que levam em conta as diferenças de virulência das salmonellas e sua maior ou menor capacidade de adaptação para a espécie humana e outras espécies animais. Assim, não se pode deixar de citar a Doutrina de Kiel que em linhas gerais demostra a diferença de virulência de salmonelas de origem humana, podendo invadir de forma mais global o organismo, e as salmonelas de origem animal que se restringem a localização intestinal. Porém a Doutrina de Kiel sofre severas restrições devido ao fato das salmonelas adaptadas as espécies animais produzirem infecções graves com poder septicêmico, levando em consederação a epdemiologia desses sorovares e a dose infectante e, ainda, a diferença na evolução das salmonelas em adultos e crianças, que é contemplada na Doutrina de Montevidéu[40].

Na Doutrina de Montevidéu considera-se que as Salmonellas animais e/ou ubiquitárias, quando infectam animais jovens e crianças até 2-3 anos, podem produzir o quadro sistêmico e, nos indivíduos adultos, processos gastroentéricos[40].

Assim as salmonelas podem ser divididas em três categorias, com base na especificidade do hospedeiro e padrão clínico por eles determinado: na primeira categoria estão as salmonelas altamente adaptadas ao homem, incluindo *S.* Typhi e *S.* Paratyphi A, B e C, agentes da febre entérica (febre tifóide e paratifóide), responsáveis por infecções sistêmicas que determinam quadros septicêmicos graves; na segunda categoria estão as salmonelas altamente adaptadas aos animais, representadas por *S.* Dublin (bovinos), *S.* Choleraesuis e *S.* Typhisuis (suínos), *S.* Pullorum e *S.* Gallinarum (aves), responsáveis pelo paratifo dos animais. Contudo, em particular os sorovares *S.* Dublin e *S.* Choleraesuis podem provocar no homem em determinadas situações (idade jovem, idosos, pacientes com doenças crônicas e

imunocomprometidos), um quadro septicêmico mais grave do que a febre tifóide[41].

A terceira categoria inclui a maioria dos sorovares que atingem indiferentemente o homem e animais, designadas salmonelas zoonóticas, as quais são responsáveis por quadro de gastrenterite (enterocolites) ou Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA). As espécies zoonóticas representam na atualidade um sério problema de Saúde Pública em todo o mundo, pois estando associadas aos quadros de gastrenterite, são responsáveis por significantes índices de morbidade e mortalidade, tanto nos países emergentes como desenvolvidos, determinando pequenos e grandes surtos envolvendo, principalmente, o consumo de alimentos de origem animal como ovos, carnes e produtos lácteos além de água contaminada[42].

No Brasil, a febre tifoide é de notificação obrigatória e na última década constata-se uma tendência de declínio nos coeficientes (Tabela 1), entretanto os números devem ser vistos com cautela pelas razões relacionadas aos números de óbitos com causa ignorada, dificuldade de diagnostico laboratorial e problema no sistema de informação[43].

Estes indicadores apresentam importantes variações quando analisados por regiões e unidades da federação. As regiões Norte e Nordeste registram sempre números mais elevados (Tabela 2) devido à precariedade de suas condições sanitárias, onde menos de 50% de sua população dispõe de algum tipo de abastecimento de água[43].

Tabela 1 – Número de Casos Confirmados de Febre Tifóide no Brasil e Notificados ao Sistema de Informação de Agravos de Notificação – SINAN-NET – Período 2001-2012.

ANO	NÚMERO DE CASOS
2001	1
2003	1
2006	22
2007	402
2008	339
2009	300
2010	158
2011	152
2012	83
Total	1458

Fonte: SVS, Ministério da Saúde, Brasil, 2012[42]

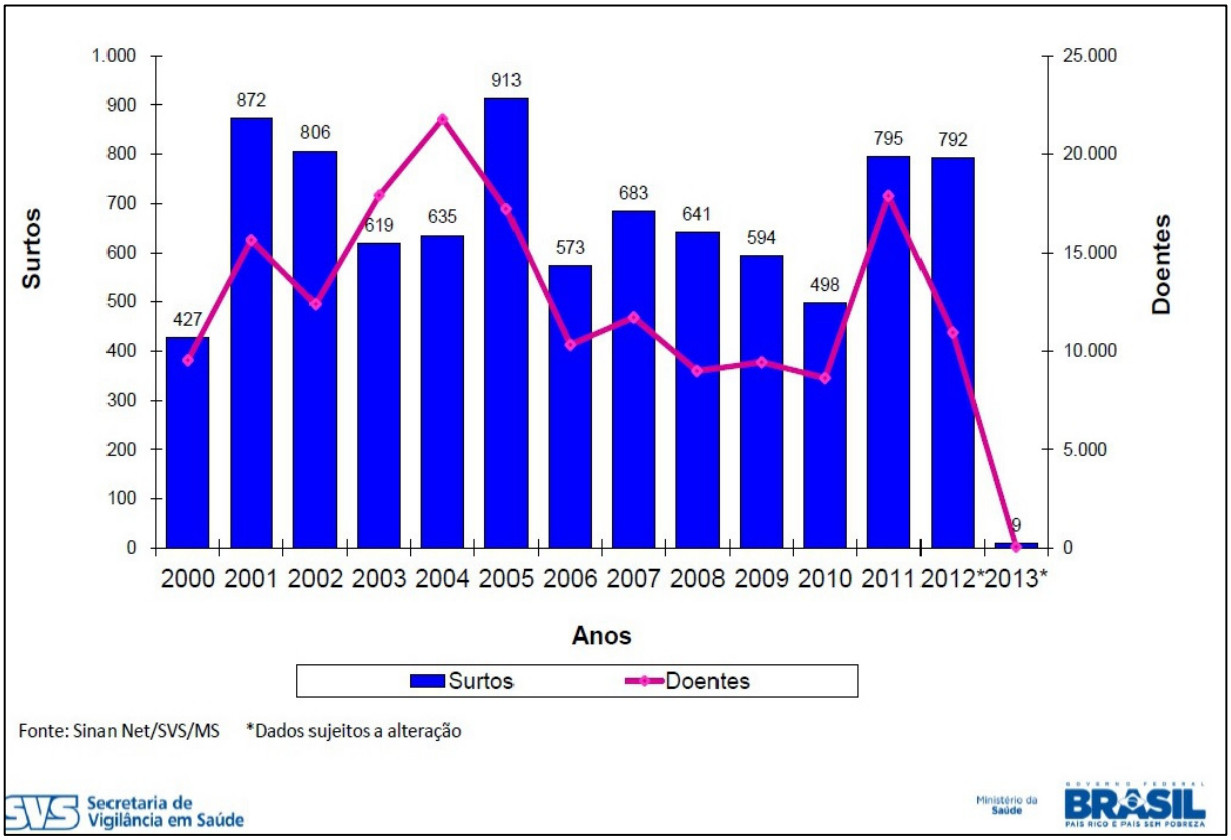
Tabela 2 – Número de Casos de Salmoneloses Humanas Confirmados nos Estados e Notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação – SINAN-NET – Período 2001-2012.

ESTADO	NÚMERO DE CASOS
Rondônia	8
Acre	30
Amazonas	92
Roraima	1
Pará	298
Amapá	86
Tocantins	40
Maranhão	362
Piauí	9
Ceará	45
Rio Grande do Norte	9
Paraíba	8
Pernambuco	19
Alagoas	110
Sergipe	17
Bahia	168
Minas Gerais	11
Espírito Santo	15
Rio de Janeiro	32
São Paulo	53
Paraná	11
Santa Catarina	16
Rio Grande do Sul	4
Mato Grosso	9
Goiás	2
Distrito Federal	3
Total	1458

Fonte: SVS, Ministério da Saúde, Brasil, 2012[42]

Outra problemática relacionada a questão da salmonelose é a sua transmissão por alimentos (Gráfico 1). As DTAs são caracterizadas por uma síndrome geralmente constituída por diarreia e/ou vômitos, anorexia, náuseas, relacionada à ingestão de alimentos ou água contaminados [42, 43].

Gráfico 1 – Número de Surtos e de Doentes por Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil, Período 2000-2013.



Os agentes etiológicos associados aos casos de DTA são os mais diversos como bactérias, vírus, parasitas, toxinas, *prions*, agrotóxicos, produtos químicos, ainda metais pesados e entre os agentes etiológicos bacterianos, o gênero *Salmonella* é o mais incriminado (Tabela 3). O quadro clínico depende do agente etiológico envolvido e varia desde leve desconforto intestinal até quadros extremamente graves, podendo levar a desidratação grave, diarreia mucopurulenta e insuficiência renal aguda [42, 43].

Tabela 3 - Agentes Etiológicos Associados aos Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil, Período 2000-2013.

	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012*	2013*	Total	%
Salmonella spp.	140	206	218	139	155	161	111	119	108	77	35	28	28	0	1.525	39,39
S. aureus	35	96	89	51	60	103	46	50	53	65	41	38	36	0	763	19,71
B. cereus	6	23	29	21	24	34	40	19	29	25	15	22	8	0	295	7,62
E. coli	14	44	33	31	41	65	43	20	27	38	28	50	46	0	480	12,40
Campylobacter spp.	0	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0,08
C. perfringens	9	14	19	8	21	30	18	12	11	12	19	15	10	0	198	5,11
C. botulinum	0	1	1	0	0	1	6	0	0	1	1	0	0	0	11	0,28
Shigella spp.	7	22	17	10	7	9	1	1	0	4	1	4	6	0	89	2,30
V. cholerae O1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0,05
V. parahaemolyticus	0	0	0	2	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	4	0,10
Cryptosporidium spp.	0	6	1	4	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	13	0,34
Rotavirus	2	38	24	27	38	33	2	4	4	1	3	12	4	0	192	4,96
Norovirus	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	6	9	8	0	24	0,62
Hepatite A	46	71	38	19	7	37	4	5	2	1	3	1	2	0	236	6,10
Enterobacter spp.	0	1	0	0	3	1	0	0	0	0	0	0	1	0	6	0,15
T. gondii	0	1	0	0	1	2	0	0	0	1	0	0	0	0	5	0,13
Giardia	1	4	3	2	1	1	0	2	6	0	0	1	1	0	22	0,57
T. cruzi	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	2	0	0	4	0,10
Inconsistência	5	12	15	15	4	7	2	15	8	15	8	6	21	0	133	1,52
Inconclusivo	3	22	12	8	7	26	11	18	116	77	54	194	143	0	691	7,90
Ignorado	155	303	300	265	258	399	275	413	270	280	272	383	468	9	4.050	46,31
Total de agentes identificados	262	528	472	316	358	479	272	232	240	226	153	184	150	0	3.872	44,27
Total geral	425	865	799	604	627	911	560	678	634	598	487	767	782	9	8.746	100,00

Fonte: Sinan Net/SVS/MS *Dados sujeitos a alteração

Salmonella é o gênero bacteriano pertencente à família Enterobacteriaceae e apresentam significado importante tanto na patologia humana como animal. Usando-se a caracterização antigênica das Salmonelas por meio do esquema de Kauffmann & White[28], são reconhecidos atualmente 2.610 sorovares, dentre os quais 2.587 pertencem à *Salmonella entérica* subsp. *enterica*, e são considerados como potencialmente patogênicos tanto para o homem como para animais[35, 37, 44].

O esquema de identificação de Kauffmann & White[28] classifica as Salmonelas em sorovares, tendo como base a composição dos antígenos somáticos (O) de natureza polissacarídica, designado por número arábico e identificam os sorogrupos de *Salmonella* (A a Z), o capsular (Vi) encontrado em três sorovares (*S*. Typhi, *S*. Paratyphi C e *S*. Dublin) e o antígeno flagelar (H) constituído de proteína (flagelina), que ocorrem em duas fases (1 e 2), identificados por letras minúsculas (fase 1) e por números arábicos (fase 2). A síntese dos diferentes antígenos H, fase 1 e fase 2 são codificadas pelos genes H1 e H2, respectivamente, e o gene H2 pode ou não se expressar, e quando isso ocorre ele forma o flagelo de fase 2, bem como, uma proteína repressora do gene H1. A maioria das Salmonelas apresenta as duas fases (bifásicas), outras uma só fase (monofásica) e existem àquelas que perderam o flagelo (imóveis)[45].

A salmonelose é uma doença de distribuição cosmopolita, acometendo crianças e adultos, tanto nos países desenvolvidos como em desenvolvimento. O habitat das salmonelas é o trato intestinal dos animais e do homem podendo ser considerados portadores. A patogenicidade e a virulência da *Salmonella* estão relacionadas com o tipo sorológico da bactéria. Alguns sorovares podem estar associados a determinado hospedeiro animal ou humano, por exemplo, a S. Typhi, S. Paratyphi A, B e C, respectivamente agentes das febres tifóide e paratifóides, são adaptadas ao hospedeiro humano. Outros sorovares são adaptados ao hospedeiro animal, como *S*. Pullorum e *S*. Gallinarum (aves domésticas), *S*. Choleraesuis (porcos) e *S*. Abortusovis (carneiro)[46].

Nas salmonelas ubiquitárias, geralmente se tem a figura do portador temporário configurada pelo Homem por até 6 meses sendo que este papel também pode ser desenvolvido pelos animais, com a eliminação deste agente pelas fezes. Nas *Salmonellas* spp. adaptadas as espécies animais (*S*. Typhi, *S*. Pullorum/Gallinarum) se tem a figura de portador crônico e geralmente em animais de sangue-frio como Ofídios, Anuros e Peixes inclusive de aquário, estes são considerados como reservatórios deste micro-organismo, funcionando inclusive como uma forma de manutenção da bactéria no ambiente[46].

A maioria dos sorovares de *Salmonella* são patogênicos para animais, sejam domésticos ou silvestres, os quais podem atuar como portadores da infecção humana[47], e caracteriza a salmonelose como importante zoonose. Entretanto, a maioria dos sorovares infectam, indistintamente, o homem e animais, e se manifestam como síndromes gastrointestinais causadas pela ingestão de alimentos, particularmente de origem animal ou pelo consumo de águas contaminadas com diferentes sorovares de *Salmonella*.

As fezes de origem humana e animal são os materiais biológicos mais importantes na contaminação de veículos de propagação de uma variedade de enfermidades transmissíveis, com destaque para a febre tifóide, febres paratifoides, salmoneloses por outros sorovares, e outros enteropatógenos[28, 48].

Os animais silvestres representam reservatórios naturais importantes das salmonelas e se destacam na cadeia epidemiológica da salmonelose de forma bastante conhecida, porém a água também representa um veículo impactante na propagação da salmonelose. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), 80% das doenças que ocorrem nos países em desenvolvimento são ocasionadas pela contaminação da água[49, 2].

1.3. Circulação de Bactérias Zoonóticas no Ambiente

A luta contra as zoonoses no Brasil está apenas no começo, pois as informações disponíveis não mostram a verdadeira situação existente, principalmente em se tratando das zoonoses bacterianas, pois os dados sobre sua ocorrência, incidência e prevalência são raros ou inexistentes. Apesar das zoonoses mais conhecidas serem trabalhadas com certa intensidade, muitas outras não menos importantes para a Saúde Pública, não são notificadas e não têm programas de controle para que possam ser avaliadas[17].

Os animais silvestres representam um importante papel na transmissão de agentes de doenças infecciosas no homem. Uma das vias de transmissão em potencial envolve atividades comumente desenvolvidas por certas populações, como a caça e a pesca, enquanto que em outros mecanismos prevalecem em ambientes urbanos assim como rurais, onde se observa uma grande relação entre humanos e animais. Tal situação agrava-se pela escassez de conhecimento das doenças incidentes nas populações de animais, principalmente, silvestres e a frequente falta de métodos de manejo dos animais dentro daqueles ambientes[50].

Dentro do contexto das doenças bacterianas causadas por patógenos entéricos zoonóticos, não podemos deixar de analisar um importante aspecto para a efetiva veiculação destes patógenos, a veiculação hídrica.

A promoção do acesso à água de qualidade e a proteção contra os riscos decorrentes da presença de contaminantes de importância na Saúde Pública na água são de grande relevância para a humanidade[51, 52]. Nesse aspecto, o Conselho Nacional de Saúde apresenta à sociedade brasileira os maiores desafios atuais para o Sistema Único de Saúde (SUS): estruturação do novo modelo de atenção à saúde que, a partir da grande função de Saúde Pública, subordine os conceitos e programas de assistência médica individual aos preceitos e programas dos interesses coletivos e direitos da cidadania, e realize, efetivamente, as ações de promoção e proteção à saúde, incluindo acesso à água potável a todos[53].

A água é um recurso indispensável para a sobrevivência de todas as espécies, exercendo uma influência decisiva na qualidade de vida das populações. Contudo, o modo como são utilizados e gerenciados os recursos hídricos tem levado a um aumento do nível de degradação ambiental e a um risco de escassez de água, o que compromete a qualidade de vida das gerações futuras[54,55].

As doenças de veiculação hídrica são causadas principalmente por micro-organismos patogênicos de origem entérica, animal ou humana, transmitidos basicamente pela via fecal-oral[56]. Estes patógenos bacterianos são excretados nas fezes de indivíduos infectados e

disseminados a partir da ingestão da água poluída e do alimento contaminado[57]. Muitos são os patógenos de origem entérica veiculados pela água e, dentre eles, citam-se vírus, como enterovírus e rotavírus; bactérias, como *Salmonella spp.*, *Shigella* spp. *Vibrio* spp. e *Campylobacter jejuni;*e certos protozoários, como *Giardia intestinalis, Cryptosporidium parvum, Entamoeba histolytica;* e os helmintos, *Ascaris lumbricoides* e *Trichuris trichiura*[58].

No Brasil, no município de São Bento do Una - Pernambuco, ocorreu um surto de diarréia no de 2004, registrando-se 2.170 casos. Nas 582 coproculturas realizadas, 145 (25%) revelaram um enteropatógeno bacteriano, destacando 114 casos (19,5%) com a participação de *Aeromonas* spp. e nos 31 episódios restantes (5,3%), foram detectados: *V. cholerae* O_1 Ogawa toxigênico (18/3,1%), *Salmonella* spp (8/1,4%), *Shigella* spp (3/0,5%) e *Vibrio cholerae* não O_1/não O_{139} (2/0,3%). As condições de saneamento básico eram bastante precárias, em vista do fornecimento de água potável à população ser escasso e intermitente, obrigando os consumidores recorrer à água colhida em barreiros (pequenos açudes) além daquela distribuídas por veículos carros-pipa particulares, todas sem controle microbiológico. O esgotamento sanitário de um modo geral apresenta extravasamento do conteúdo para o meio ambiente (valas a céu-aberto) nos bairros fora do perímetro urbano e, via de regra, as águas residuais não tratadas são lançadas diretamente no rio Una, que banha a cidade[59].

Um estudo realizado por Isaac-Marquez e colaboradores[60], chama a atenção para a importância da água na veiculação de doenças diarreicas nos países de economia periférica, onde essas enfermidades representam um dos problemas de Saúde Pública mais importante, com repercussões econômicas, sociais e políticas. Outros estudos estimam que as doenças diarreicas de natureza infecciosa são responsáveis pela morte de 2,2 milhões de pessoas nos países em desenvolvimento[58]. No Brasil, a alta mortalidade causada por diarreias infecciosas representa um grave problema de Saúde Pública, principalmente na região nordeste do país[61].

Se consultarmos os dados oficiais liberados pelo Ministério da Saúde, nos anos de 2.000 a 2.010, foram notificados 29.491.078 casos de doenças diarreicas agudas no Brasil. Em 2006 a incidência aumentou nas regiões Sul (13 por 1.000), Centro-oeste (25 por 1.000) e Nordeste (28 por 1.000). Em 2008 a incidência aumentou na região Norte (33 por 1.000) e em 2009 a estimativa de incidência aumentou na região Sudeste (15 por 1.000). No ano de 2011 o registro é de mais de 3.000.000 casos notificados de diarreia aguda e no ano de 2012 são registrados mais de 217.169 casos sendo 17.987 em crianças menores de 1 ano, 44.595 casos entre crianças de 1 a 4 anos, 24.392 entre crianças de 5 a 9 anos, 121.764 em maiores de 10 anos e o restante com faixa etária ignorada[61].

Segundo dados do sistema de informação de mortalidade disponível no site do Ministério da Saúde, de 2000 a 2009, o Brasil teve 49.603 óbitos por diarreia e gastroenterite de origem infecciosa presumível. A taxa de mortalidade, de 2000 a 2009, para cada 100.000 habitantes, variou de 27,18 a 85,21 em crianças menores de 1 ano, de 2,37 a 4,11 na faixa etária de 1 a 4 anos, de 0,18 a 0,38 na faixa etária de 5 a 9 anos e de 1,58 a 2,18 em maiores de 10 anos. A taxa de mortalidade por doenças diarreicas para cada 100.000 habitantes, de 2000 a 2009, na Região Norte variou de 2,80 a 3,88, na Região Nordeste alternou de 3,53 a 5,89, na Região Sudeste variou de 1,34 a 2,07, na Região Sul variou de 1,21 a 2,30 e variou de 1,82 a 3,02 na Região Centro-Oeste[61].

Em áreas rurais, muitas vezes não se encontra um abastecimento de água adequado, o que leva os moradores a utilizar fontes bastante susceptíveis à contaminação, como poços e nascentes, como os principais meios de abastecimento[56]. Segundo Stukel *et al.*[62], o risco de ocorrência de surtos de doenças de veiculação hídrica no meio rural é alto, principalmente em função da possibilidade de contaminação bacteriana das águas, que muitas vezes são captadas em poços inadequadamente vedados e próximos a fontes de contaminação, como fossas e áreas de abrigo ocupadas por animais.

Muitos micro-organismos (ex: *Aeromonas* spp., *Campylobacter* spp., *Yersinia* spp., *Clostridium* spp., *Staphylococcus* spp., *E. coli*, *Pseudomonas* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp., *Candida albicans* e *Vibrio* spp.) estão presentes em esgotos domésticos, os quais podem ser eliminados no meio ambiente de diversas maneiras. O grupo das bactérias, o mais numeroso entre os citados, pode causar sérios agravos na população que tenha contato com a água contaminada resultando em enfermidades, como gastrenterites, inclusive cólera, dermatites, entre outras[59, 63].

A contaminação microbiana em sistemas aquáticos assume destacada relevância no âmbito da Saúde Pública pelo risco de transmissão de agentes patogênicos aos humanos e animais, causando doenças de natureza e complexidade diversas. De acordo com a Organização Mundial de Saúde[58], os indivíduos com maior risco de contrair doenças relacionadas com a água são as crianças, os idosos e as pessoas debilitadas ou que vivem em condições insalubres.

Porém, quando se trata da constatação da presença e impacto de bactérias potencialmente patogênicas em um ambiente natural, algumas outras questões devem ser levantadas, através do seu rastreamento epidemiológico e os aspectos que envolvem a resistência antimicrobiana e da patogenicidade.

1.4. Saúde Ambiental sob a Perspectiva dos Patógenos Zoonóticos Bacterianos

A origem e o aumento das desigualdades sociais desempenham um papel importante no padrão de doenças desde as populações pré-históricas até as contemporâneas. O conceito de transição epidemiológica pode ser utilizado para compreender as mudanças das relações ecológicas entre os seres humanos, os patógenos e a doença por eles desenvolvidos[8].

Desde a era Paleolítica observa-se que as relações ecológicas e sociais se relacionam com o impacto de doenças infecciosas[64]. Populações do Paleolítico teriam mantido muitos dos patógenos que eles compartilharam com seus ancestrais primatas e teriam sido expostos a diversas zoonoses como adaptação da prática do forrageamento, zoonoses essas de localização intestinal[8].

Há cerca de 10.000 anos, a mudança para uma economia de subsistência agrícola cria a primeira transição epidemiológica, marcada pelo surgimento de infecções, em um padrão que continua até o presente. Porém, iniciada há um século, algumas populações foram submetidas a uma segunda transição epidemiológica. Neste contexto as medidas de saúde pública que incluem melhoria da nutrição e avanços na medicina resultam em quedas nas doenças infecciosas e um aumento das doenças não-infecciosas, doenças crônicas e doenças degenerativas[8].

Recentemente, as populações humanas estão entrando na terceira transição epidemiológica na qual existe um ressurgimento de doenças infecciosas que se pensava estarem sob controle e o surgimento de novas doenças. Muitos dos patógenos emergentes e reemergentes são resistentes aos antibióticos e alguns são multirresistentes às drogas disponíveis[8].

O desenvolvimento dos antibióticos, a partir da descoberta da penicilina em 1928, por Alexander Fleming, tornou possível não só o tratamento como a prevenção de infecções humanas e animais. Como consequência, ao longo dos anos tem ocorrido a liberação de grandes quantidades de antibióticos no ambiente, levando a mudanças radicais na microbiota dos ecossistemas poluídos, resultando em problemas para a biodiversidade e acima de tudo, favorecendo ou incrementando a resistência antimicrobiana[65].

O papel do uso indiscriminado de antibióticos no desenvolvimento de resistência a antibióticos por meio de práticas médicas e agrícolas é um exemplo do impacto antropogênico sobre a dinâmica dos patógenos.

O aumento dos níveis de resistência aos antibióticos em patógenos humanos e de animais tem despertado uma preocupação crescente, pois não só interfere no tratamento de

doenças infecciosas, como também nos casos em que a profilaxia com antibióticos é necessária para evitar infecções[58]. A maioria dos estudos realizados sobre os efeitos dos antibióticos sobre a saúde humana concentra-se na disseminação da resistência entre bactérias patogênicas e/ou potencialmente patogênicas.

Além disso, os antibióticos liberados nos solos e águas podem modificar a microbiota ambiental local, produzindo mudanças na sua atividade ou composição. As alterações nas populações bacterianas incluem a seleção de mutantes resistentes, de tal maneira que a composição total da microbiota é modificada. A presença dos antibióticos no ambiente gera uma forte pressão seletiva sobre os micro-organismos, promovendo a transferência de genes que determinam a resistência aos antibióticos nas populações bacterianas, de forma cada vez mais eficiente. É importante ressaltar que, devido à transferência destes genes, bactérias patogênicas podem adquirir resistência a antibióticos[66].

Assim, para os estudos dos processos de produção de doenças incluindo as zoonoses é de suma importância introduzir os aspectos relacionados aos territórios e aos espaços Sociais. Seguindo Santos[67], o espaço deve ser considerado como um conjunto indissociável de quem participa, de um lado, um certo arranjo de objetos geográficos, e de outro, a vida que o preenche e anima, ou seja, este autor já referendava a sociedade em movimento. O território é um conjunto de fixos, o espaço tem histórico e, apesar de representar este fixo pode ainda compor o enfoque ecossistêmico, se relacionando com a História Ambiental no lugar[68].

Dessa perspectiva, deve-se entender a relação saúde/doença como um processo coletivo, recuperando o "lugar" de forma interdisciplinar, como o espaço organizado para síntese e intervenção, buscando identificar as relações estabelecidas entre as condições de saúde e seus determinantes culturais, sociais e ambientais, dentro dos ecossistemas modificados pelo trabalho humano. Para que isto ocorra, é essencial que a novidade emergente não seja considerada apenas como um atributo das populações de parasitas, mas essencialmente como uma propriedade de ecossistemas complexos, em que as condições de estabilidade estão sendo produzidas e os riscos amplificados. Da mesma forma, os lugares devem ser vistos como sistemas organizados e não meramente comunidades isoladas, dinâmicos e complexos, com características únicas resultando de suas histórias[4].

A questão da desigualdade e da persistência da pobreza, apesar do contínuo desenvolvimento dos meios de produção ainda mantêm um círculo vicioso entre Doença – Pobreza/ Pobreza – Doenças sendo esta uma metáfora que preside as discussões sobre saúde e desenvolvimento[4].

A desigualdade continua a aumentar dentro e entre as sociedades, acelerando a propagação de doenças emergentes e reemergentes. Porém, o que se observa é que as doenças negligenciadas ficam limitadas a territórios habituais, atingindo pessoas de baixo poder político e econômico e ainda; novos espaços sociais que ainda podem ser impactados ou totalmente modificados pelos desastres estão se habilitando a novos processos infecciosos.

1.5. Unidades de Conservação Brasileiras

O território brasileiro é enorme, quase todo tropical, e povoado por uma imensa variedade de seres vivos, espalhada por vários biomas e ecossistemas com uma diversidade singular. Entretanto, ele vem sofrendo com sucessivos episódios de degradação, alteração e conversão da sua biota, para dar lugar a atividades produtivas.

A criação de Unidades de Conservação (UC) nos últimos 70 anos tem caminhado na contramão dessa tendência mercadológica, utilizando uma estratégia importante para conter os impactos desse padrão de ocupação desenfreada do território e de uso desmedido dos recursos naturais. As UCs permite a sobrevivência de espaços nos quais os processos de reprodução da biodiversidade e da evolução biológica transcorram sem abalos impactantes da ocupação antrópica[69].

Segundo o Instituto Chico Mendes de conservação da Biodiversidade – ICMBio, as unidades de conservação são definidas como porções do território nacional, incluindo as águas territoriais, com características naturais de relevante valor, de domínio público ou propriedade privada, legalmente instituídas pelo poder público, com objetivos e limites definidos, e sob regimes especiais de administração, às quais se aplicam garantias adequadas de proteção[69, 70].

A dificuldade em sistematizar a criação e o gerenciamento de UCs no Brasil se expressou acima de tudo no longo trâmite – durante toda a década de 1990 – da Lei no 9.985, de 18 de julho de 2000[71], chamada Lei do Sistema Nacional de Unidades de Conservação - SNUC, regulamentada pelo Decreto no 4.340, de 22 de agosto de 2002.

A Lei do SNUC inovou ao dividir as UCs em dois grandes grupos, com características específicas: as de proteção integral, cujo objetivo básico é preservar a natureza, admitindo-se apenas o uso indireto dos recursos naturais, e as de uso sustentável, cuja finalidade é compatibilizar a conservação da natureza com o uso sustentável de parcela dos seus recursos naturais (Quadro 1). Cinco categorias pertencem ao primeiro grupo: Estação Ecológica

(Esec); Reserva Biológica (Rebio); Parque Nacional (Parna) – quando criado pelo estado ou município é denominado Parque Estadual ou Parque Natural Municipal; Monumento Natural (MN); e Refúgio de Vida Silvestre (RVS). Sete categorias fazem parte do segundo grupo: Área de Proteção Ambiental (APA); Área de Relevante Interesse Ecológico (Arie); Floresta Nacional (Flona) – quando criada pelo estado ou município é denominada Floresta Estadual ou Municipal; Reserva Extrativista (Resex); Reserva de Desenvolvimento Sustentável (RDS); Reserva de Fauna (Refau); e Reserva Particular do Patrimônio Natural (RPPN).

Quadro 1 – Categorias de Unidades de Conservação previstas pelo Sistema Nacional de Unidades de Conservação – SNUC.

CATEGORIA	GRUPO	OBJETIVOS
Estacão Ecológica (Esec)	Proteção Integral	Preservação da natureza e realização de pesquisas científicas.
Reserva Biológica (Rebio)	Proteção Integral	Preservação integral da biota e dos atributos naturais existentes em seus limites, sem interferência humana ou modificações ambientais, excetuando medidas de recuperação de seus ecossistemas alterados e as ações de manejo necessárias.
Parque Nacional (Parna), Estadual ou Municipal	Proteção Integral	Preservação de ecossistemas naturais de grande relevância ecológica e beleza cênica, possibilitando a realização de pesquisas científicas e o desenvolvimento de atividades de educação e interpretação ambiental, de recreação em contato com a natureza e de turismo ecológico.
Monumento Natural (MN)	Proteção Integral	Preservar sítios naturais raros, singulares ou de grande beleza cênica.
Refúgio de Vida Silvestre (RVS)	Proteção Integral	Proteger ambientes naturais assegurando condições para a existência ou reprodução de espécies da flora local e da fauna residente ou migratória.
Área de Proteção Ambiental (APA)	Uso Sustentável	Proteger a diversidade biológica, disciplinar o processo de ocupação e assegurar a sustentabilidade do uso dos recursos naturais.
Área de Relevante Interesse Ecológico (Arie)	Uso Sustentável	Manter os ecossistemas naturais de importância regional ou local e regular o uso admissível dessas áreas, compatibilizado com os objetivos de conservação.
Floresta Nacional (Flona), Estadual ou Municipal	Uso Sustentável	Uso múltiplo sustentável dos recursos florestais e a pesquisa científica, com ênfase em métodos para exploração sustentável de florestas nativas.
Reserva Extrativista (Resex)	Uso Sustentável	Proteger os meios de vida e a cultura de populações extrativistas tradicionais e assegurar o uso sustentável dos recursos naturais da unidade.
Reserva de Desenvolvimento Sustentável (RDS)	Uso Sustentável	Preservar a natureza assegurando as condições de qualidade de vida e exploração dos recursos naturais das populações tradicionais, bem como valorizar e aperfeiçoar o conhecimento de manejo do ambiente, desenvolvido por estas populações.
Reserva de Fauna (Refau)	Uso Sustentável	Manter populações animais de espécies nativas, terrestres ou aquáticas, residentes ou migratórias, adequadas para estudos técnico-científicos sobre o manejo econômico sustentável de recursos faunísticos.
Reserva Particular do Patrimônio Natural (RPPN)	Uso Sustentável	Conservar a diversidade biológica.

Lei no 9.985, de 18 de julho de 2000 - Lei do Snuc, Ministério do Meio Ambiente, Brasil[71].

O marco fundador mais reconhecido da moderna política da instalação das UCs foi a criação, nos EUA, do Parque Nacional de Yellowstone, em 1872. Dos fins do século XIX até hoje, os parques nacionais multiplicaram-se por todo o planeta e são hoje o tipo mais conhecido e tradicional de espaço natural protegido. No entanto, foram surgindo outras categorias (reservas biológicas, refúgios de vida silvestre, florestas nacionais dentre outros), com os mais variados objetivos de preservação e conservação, e de controle da exploração dos recursos[69].

No Brasil, foi somente no ano de 1937 que foi criado o primeiro parque nacional, o Parque Nacional de Itatiaia, no Rio de Janeiro. Este parque foi criado com base no Código Florestal de 1934. No entanto, as primeiras unidades de conservação foram criadas sem nenhum tipo de critério técnico e científico, ou seja, foram estabelecidas meramente em razão

de suas belezas cênicas, ou por algum fenômeno geológico espetacular, ou ainda, por puro oportunismo político. Assim uma inevitável ineficiência no processo de criação e gestão das unidades, seja quanto à consecução de suas finalidades, confusão de regimes, como ainda a uma sobreposição de unidades[72].

Na intenção de nortear a criação de Novas Unidades de conservação, o IBDF – Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal (órgão criado em 1967 e extinto em 1989) propôs uma primeira etapa sugerindo 13 áreas, das quais nove foram oficialmente criadas, a maioria em 1979. São elas: 1) Parque Nacional do Pico da Neblina – AM, em 05 de junho de 1979, com 2.200.000 ha; 2) Reserva Biológica do Rio Trombetas – PA, em 21 de setembro de 1979 com 407.754.230 ha; 3) Parque Nacional dos Lençóis Maranhenses – MA, em 02 de junho de 1981, com 155.000 ha; **4) Parque Nacional Serra da Capivara – PI, em 05 de junho de 1979, com 100.000 ha**; 5) Parque Nacional do Jaú – AM, em 24 de setembro de 1980, com 2.272.000 ha; 6) Parque Nacional do Cabo Orange – AP, de 15 de julho de 1980, com 619.000 ha; 7) Reserva Biológica do Lago Piratuba – AP, de 16 de julho de 1980, com 395.000 ha; 8) Reserva Biológica do Atol das Rocas, na costa potiguar, 05 de junho de 1979, com 36.349 ha e 9) Parque Nacional de Pacás Novos – RO, de 21 de setembro de 1979, com 764.801 ha[72].

Ao todo, o país abriga hoje mais de 70 Parques Nacionais, incluindo áreas no oceano Atlântico, em ecossistemas tropicais, na floresta amazônica, no sertão da caatinga e até mesmo em um grande centro urbano.

A questão fundiária dos Parna é um assunto de alta complexidade envolvendo interesses financeiros, uso da terra, estabelecimento de comunidades, fluxo de visitações e empreendedorismo turístico; sendo que uma das questões mais delicadas sejam a especulação imobiliária e o apossamento ilegal de terras públicas que por vezes deflagraram procedimentos duvidosos nas indenizações configurando um quadro de "indústria das desapropriações"[70].

Estas questões fundiárias ainda persistem nos Parnas e dentre outros impactos se ressalta a ampliação da presença humana com utilização e construção de benfeitorias que consequentemente interferem neste ecossistema. Essas tentativas de incorporar valor à terra contribui para o desmembramento e venda de terrenos do entorno dos Parnas para a sua utilização ou para pessoas "de fora", interessadas em construir casas de veraneio ou segunda residência, suscitando a aparição de novos atores que impactam de forma diferenciada[70].

A gestão dos Parnas também repercute em elementos complicadores. Um dos maiores

problemas consiste em convencer os tomadores de decisão e a sociedade a respeito da necessidade de conservar a biodiversidade dentro e fora das unidades de conservação. A necessidade da implementação de uma estrutura física e humana que efetivamente possa atender aos objetivos de conservação da biodiversidade deve ser prioritária. Portanto, para que tais objetivos sejam alcançados de forma mais eficiente, é necessário que as unidades de conservação estejam inseridas nos planejamentos socioeconômicos regionais e integradas ao ordenamento geral do território.

1.6. Parque Nacional Serra da Capivara – Piauí/Brasil

O Parque Nacional Serra da Capivara e seu entorno foi criado em 1979 com a finalidade de garantir e preservar a maior concentração de sítios arqueológicos pré-históricos da América, e a proteção do ambiente específico, a caatinga. Foi declarado Patrimônio Cultural da Humanidade pela UNESCO em 1991 por conta da evidencia de vestígios da mais antiga presença humana em toda a América[72].

Para o Ministério do Turismo, a capacidade de recepção do PNSC é de dois milhões de turistas por ano. Possui uma infraestrutura de acesso com 16 circuitos ou 128 sítios arqueológicos abertos à visitação, com três guaritas de entrada com guardas permanente, rádio para comunicação e toaletes, loja de souvenir, um Centro de Visitantes com auditório, exposição e lanchonete, 300 km de trilhas carroçáveis, mais de 100 km de trilhas para pedestres, placas indicativas e setas ao longo dos circuitos turísticos e 35 condutores de turistas.

O Parque Nacional Serra da Capivara é um ambiente propício para o desenvolvimento e conservação de grande número de espécies da caatinga e espécies endêmicas. Área de importância ímpar, é o maior sítio arqueológico do Brasil, e devido a sua classificação de Parque Nacional (Parna) não deveriam habitar no local nem animais domésticos, nem animais de criação, nem seres humanos, pois tais populações causam impactos ambientais e ocupam a biocenose da fauna silvestre[72].

A água na região é escassa e o contato das pessoas e de seus animais domésticos e de criação com os silvestres faz com que aumente a circulação de possíveis patógenos, possibilitando a emergência de doenças tanto no homem quanto em outros animais.

O significado do acesso à água muda drasticamente nos ecossistemas áridos e semiáridos. Por ser um elemento limitante, pequenas mudanças na qualidade e quantidade de

água podem gerar significativas mudanças na vegetação, na vida silvestre, nas condições micro-climáticas e na saúde de seus usuários[73]. Sendo a água um elemento natural essencial à vida, fatores relacionados à qualidade da água são uma ameaça constante em muitos lugares do planeta, principalmente em regiões de clima semiárido, como é o caso da região sudeste do Piauí, onde está localizado o Parque Nacional Serra da Capivara.

Nesse contexto, o Parque Nacional Serra da Capivara e o seu entorno são ambientes propícios à emergência ou reemergência de zoonoses e doenças de veiculação hídrica, uma vez que os reservatórios de água são utilizados por homens e animais. Esse uso comum da água pode promover o fluxo de patógenos entre humanos e animais e vice-versa. No entorno do parque, é possível observar a prática comum de criação de animais domésticos e a condução de rebanhos inteiros aos reservatórios de água que também são utilizados para o abastecimento da população.

Em relação à saúde humana, não só a qualidade da água deve ser considerada, como também a quantidade[74]. De acordo com White *et al*.[75], os casos de diarreia parecem diminuir quando o suprimento de água é mais acessível. Algumas características climáticas, como a predominância de um clima quente e seco, associadas a condições sanitárias insatisfatórias, estão presentes nas localidades do entorno do Parque Nacional Serra da Capivara, o que agrava ainda mais a possibilidade de veiculação de patógenos e consequentemente um aumento no número de casos de diarreia no local.

No entorno do Parque, comunidades humanas estão situadas em localidades que em quase sua totalidade estão desprovidas de abastecimento público de água, fazendo com que as famílias residentes tenham que suprir suas necessidades hídricas utilizando a água de poços, quando existentes, e outras fontes alternativas como caldeirões, açudes, tanques, barreiros e barragens[73].

A pressão antrópica impossibilita a busca de água por parte da fauna silvestre em áreas mais distantes, pois os locais onde havia o acúmulo de água por um período um pouco maior, foram ocupados por populações humanas. Estas utilizam a venda da lenha como fonte de renda, provocando a perda de habitat por queimadas e desmatamentos aumentando a pressão da caça.

Os Parnas são localizados em ecossistemas específicos tendo certa parcela de sua área aberta à visitação pública. O aumento de circulação nos ambientes naturais deve ser manejado, comprometido com vigilância em saúde, no que se refere à emergência ou à reemergência de doenças infecciosas. A vigilância precisa ser feita de forma a prevenir

alterações negativas tanto para os visitantes quanto para a comunidade do entorno e para a biota local[73].

O Parque Nacional Serra da Capivara, localizado no sertão do Piauí, é a única Unidade de Conservação brasileira destinada à preservação do bioma da caatinga, extremamente importante pela sua biodiversidade, mas que corre sério risco de extinção. A gestão do Parque é de responsabilidade do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio)/ Ministério do Meio Ambiente e conta com um escritório local que mantém funcionários responsáveis pela vigilância armada e pela prevenção de incêndios[76].

Por situar-se em zona extremamente carente, onde as pessoas enfrentam as dificuldades típicas das regiões semiáridas do nordeste brasileiro, a constituição do Parque contribui sensivelmente para a melhoria das condições de vida das populações locais. Entre as principais limitações da região está a inexistência de saneamento ambiental, que interfere negativamente na salubridade do meio físico e do bem-estar da população local[76].

Grande parte do que já se escreveu sobre o PNSC está relacionado à infecção e morbidade da doença de Chagas na região[77, 78], estudo da vegetação de caatinga[79] e da flora específica[80]. Outros estudos estão relacionados à pré-história, estilos tecnológicos da cerâmica desta época, conflitos e práticas territoriais, processo de constituição e atividade ecoturística no Parque e estudos específicos sobre a fauna local. Existe na literatura o registro de apenas um trabalho científico realizado sobre o tema do uso da água e sua relação com a saúde da população no entorno do PNSC[73].

De acordo com o Plano de Manejo do PNSC, a meta principal do plano de manejo do Parque é recuperar o estado de equilíbrio entre proteção do patrimônio cultural e os aspectos ecológicos do Parque de forma ainda a criar condições para que ele seja um polo de turismo ecológico explorado eficientemente e para isso a saúde ambiental deve estar assegurada[76].

O monitoramento do fluxo de bactérias enteropatogênicas potencialmente intercambiáveis entre animais e humanos por veiculação hídrica é imprescindível para permitir a previsão da ocorrência de surtos de agravos à saúde humana.

Analisar a presença destas bactérias potencialmente patogênicas circulando na região do Parque da Serra da Capivara possibilitará o monitoramento da saúde ambiental, além de alertar a possíveis agravos para os animais e o homem. Dessa forma, estudos sobre a diversidade de patógenos em áreas de conservação são ainda pioneiros e importantes na construção de futuros diagnósticos de saúde ambiental em áreas de proteção como o Parque Nacional Serra da Capivara.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral:

- Analisar a presença e circulação de bactérias potencialmente enteropatogênicas e zoonóticas na região do Parque Nacional Serra da Capivara, localizado no sudeste do Estado do Piauí – Brasil.

2.2. Objetivos Específicos:

- Detectar a diversidade de enteropatógenos e bactérias potencialmente patogênicas encontradas nas amostras coletadas;
- Determinar o padrão de susceptibilidade aos antimicrobianos das cepas isoladas;
- Determinar o polimorfismo genético das amostras de *Salmonella* spp., através da análise dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico após eletroforese em campo pulsado (PFGE).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Visando a contextualização deste trabalho, o mesmo é um desdobramento do projeto "Sustentabilidade e manejo dos reservatórios de água no semi-árido do Piauí", desenvolvido junto ao Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Saúde Pública – PDTSP, da Fundação Oswaldo Cruz desenvolvidos por uma equipe da qual participa o Profº Dr. Sergio Augusto de Miranda Chaves, pesquisador do Departamento de Endemias Samuel Pessoa (DENSP) / Escola Nacional de Saúde Publica Sérgio Arouca (ENSP) / Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

3.1. Área de Estudo

Com uma área de 129.953 ha e um perímetro de 214.235 m, o Parque Nacional Serra da Capivara – PNSC, localizado na região sudeste do estado do Piauí (Figura 1), ocupa porções dos territórios dos municípios de São Raimundo Nonato (Foto 1), Coronel José Dias (Foto 2), João Costa (Foto 3) e Brejo do Piauí com acesso através das rodovias BR-020 e PI-040.

Figura 1 – Localização do Parque Nacional Serra da Capivara – PI/Brasil.

Foto 1 – Área urbana do Município de São Raimundo Nonato – PI/Brasil
(http://www.portalserradacapivara.com.br)

Foto 2 – Município de Coronel José Dias – PI/Brasil
(foto do autor)

Foto 3 – Município de João Costa – PI/Brasil
(http://180graus.com/joao-costa)

O Parque Nacional Serra da Capivara – PNSC, localizado na região sudeste do estado do Piauí, ocupa porções dos territórios dos municípios de São Raimundo Nonato, Coronel José Dias, João Costa. Criado em 1992, o município de Coronel José Dias (Foto 2) surgiu devido ao desmembramento do município de São Raimundo Nonato (Foto 1). Possui uma população de 3.606 habitantes dos quais 1.082 vivem na área de proteção permanente, ou seja, 30% da população total. Esse município é composto por 25 povoados: 1) Sítio do Mocó; 2) Barreirinho; 3) Barreirão Grande; 4) Coronel José Dias; 5) Limoeiro; 6) Queimada Nova; 7) Maquiné; 8) Sanharó; 9) Casa Nova; 10) Baixa da Queda; 11) Limpo Grande; 12) Barra do Antonião; 13) Boi; 14) Lagoa; 15) Serrote; 16) Borda; 17) São Miguel; 18) Lagoinha; 19) Veneza; 20) Barreirinho II; 21) Lagoa do Inácio; 22) Poço do Angico; 23) Barra da Umburana; 24) Santo Antônio e 25) Saco.

Dentre esses povoados, destaca-se o Sítio do Mocó (Foto 4), onde nos últimos dez anos foram realizados diversas atividades de apoio à comunidade, desenvolvidas pela FUMDHAM com a colaboração técnica do governo da Itália propiciando melhor infra-estrutura, o que permitiu criar uma estrutura de serviços que beneficiou todo o povoado.

O município de São Raimundo Nonato possui uma superfície de aproximadamente 2.433,55 Km² e uma população de 32.347 habitantes[81]. Sua densidade demográfica é de 13,29 habitantes por km², sendo que 499,3 km² correspondem à superfície do município que está enquadrada à Área de Preservação Permanente.

A população dos dois municípios tem como principal fonte de sobrevivência os ativos do Parque e, ainda que proibido, se utilizam da caça inclusive por uma questão cultural, principalmente a caça de tatu. Existe na região uma grande quantidade de caçadores profissionais que caçam por encomenda no interior da unidade. A repressão contra os caçadores tem gerado atritos entre a cultura tradicional e o modelo de proteção que funciona na unidade, o que muitas vezes bloqueia a aproximação de ações educativas junto a estas populações.

A criação do Parque, em 1979, teve como principal motivação a preservação de sítios arqueológicos ricamente ornamentados com pinturas rupestres, entre eles os mais antigos das Américas[82]. O Parque é denominado Patrimônio Cultural da Humanidade pela Unesco desde 1991.

O PNSC está inserido no domínio morfo-climático das caatingas, sendo ambiente propício para o desenvolvimento de grande número de espécies da fauna que servem de abrigo para espécies endêmicas da caatinga, como o mocó (*Kerodon rupestris*), espécies

endêmicas da caatinga que classicamente representam a imagem do Parque, dentre outras, inclusive espécies ameaçadas de extinção, como a onça-pintada (*Panthera onca*)[82]. Estendendo-se por uma área de 73.082 ha, encontramos a Área de Preservação Permanente – APP do PNSC, ou zona de amortecimento (Lei 9.985/00)[71]. De acordo com a Resolução do CONAMA 013/90, esta área é delimitada por um cinturão de 10 Km de largura que circunda o Parque e é designada como "entorno do Parque".

O relevo do PNSC (Figura 2) se mostra em forma de chapadas e serras, ao norte, e de planícies ao sul. As serras, em virtude do processo erosivo a que foram submetidas pela água e pelo vento há mais de 40.000 anos, são recortadas formando "*canyons*", ou boqueirões, como são chamados localmente, com aspecto ruiniforme onde são encontrados cavernas e abrigos[83].

Figura 2 – Imagens do Parque Nacional Serra da Capivara – PI/Brasil (fotos do autor)

O clima é semi-árido, quente e seco e a precipitação média anual é de 600 mm, com o período chuvoso de dezembro a março. Não há rios perenes na região e o parque encontra-se exatamente na zona de contato da bacia Maranhão-Piauí com a depressão periférica do médio São Francisco[84].

As rochas encontradas na região, em sua maioria são gnaisses, filitos, mármores, xistos e quartzitos, rochas que apresentam baixa porosidade, possibilitando o acúmulo de água subterrânea apenas em suas fraturas e fendas. Ao sul e a nordeste do PNSC, os solos são areno-argilosos, claros na superfície e avermelhados nos horizontes inferiores[79].

Na região do Parque, o principal refúgio para a fauna são os boqueirões que no período da seca se assumem importante papel para conservação da fauna. A fauna da caatinga é muito rica e com muitas espécies endêmicas, aproximadamente mais de trinta espécies de mamíferos não-voadores, mais de vinte espécies de quirópteros, mais de duzentas espécies de aves, vinte espécies de lagartos, ofídios e anfíbios. Estes números não são definitivos, pois novas

espécies são encontradas com frequência e alguns grupos ainda são conhecidos muito superficialmente[83].

A fauna de mamíferos da região é composta pelos seguintes grupos: Cervidae (família de mamíferos ungulados representados pelos veados), Tayassuidae (família de mamíferos, como os porcos selvagens), Carnivora (ordem de mamíferos placentários, amplamente difundidos), Didelphidae (família de mamíferos, a qual pertencem os gambás), Primata (ordem de mamíferos comumente conhecidos como macacos), Rodentia (ordem de mamíferos representando os roedores), Cingulata (ordem de mamíferos, que incluem os tatus) e Pilosa (ordem de mamíferos que incluem preguiças e tamanduás). A mastofauna de animais domésticos da região é composta por caprinos, ovídeos, e por pequenos rebanhos de bovinos e suínos assim como de cães e gatos. Os animais de tração, principalmente os jumentos (jegues) são abundantes e utilizados pela maioria dos moradores locais, sem contar a criação de galináceos[85].

3.2. Aspectos Éticos

Todas as atividades relacionadas a este trabalho de pesquisa só foram realizadas depois de solicitadas as respectivas autorizações ao Comitê de Ética em Pesquisa - CEP, a fim de garantir o bem-estar dos envolvidos e o cumprimento da legislação em vigor, e em consonância com as Diretrizes e Normas Reguladoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos, estabelecidas pela Resolução CNS 196/96, sob cadastro e liberação concedida pela Plataforma Brasil – CAAE: 02222712.5.0000.5240.

3.3. Autorização para Coleta de Amostras Ambientais

Foram também solicitadas e concedidas autorização para as atividades com finalidade científica em área de preservação ambiental para o órgão governamental competente – Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – ICMBio – Ministério do Meio Ambiente, através do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade – SISBIO, sob número de autorização 34514-1.

3.4. Local de Execução das Análises Laboratoriais

As análises laboratoriais referentes ao isolamento, identificação, pesquisa de suscetibilidade antimicrobiana e biologia molecular foram realizadas no Laboratório de Zoonoses Bacterianas, IOC/Fiocruz,RJ.

3.5. Expedição de Ida a Campo

A obtenção dos dados primários foi realizada através de duas idas a campo que duraram aproximadamente oito dias cada uma, realizadas nos meses de julho de 2012 e janeiro de 2013, respectivamente.

Após deslocamento aéreo entre as cidades do Rio de Janeiro/RJ e de Petrolina/PE, utilizou-se transporte rodoviário para percorrer aproximadamente 300 Km até a chegada à cidade de São Raimundo Nonato/PI, localidade com maior infraestrutura próxima do Parque Nacional Serra da Capivara. Para cumprir este trajeto, foi necessário um dia para a viagem de ida e um dia para a viagem de volta.

Para a realização das coletas na extensão de todo o PNSC e seu entorno foi necessário a utilização de um veículo 4x4 e o auxílio de um motorista e guia autorizado para execução de tal tarefa. Ao longo do período de seis dias, foram percorridos aproximadamente 600 km para que todas as áreas representativas do PNSC estivessem contempladas nas coletas.

3.6. Amostragem

Com a realização de duas idas a campo, foram coletadas um total 170 amostras divididas em: 55 de origem humana, 29 de origem animal e 86 de origem ambiental (Tabela 4).

Tabela 4 – Períodos e Amostras Coletadas e suas Respectivas Fontes de Isolamento.

PERÍODO	HUMANA	ANIMAL	AMBIENTAL	N (%)
Junho – 2012	28 (50,9%)	14 (48,3%)	43 (50%)	85 (50%)
Janeiro – 2013	27 (49,1%)	15 (51,7%)	43(50%)	85 (50%)
Total n (%)	55 (100%)	29 (100%)	86 (100%)	170 (100%)

3.6.1. Amostras Humanas

Em se tratando da coleta do material humano, na primeira ida a campo (junho de 2012) foram realizadas coletas de amostras fecais de 28 indivíduos que se dispuseram a participar de livre e espontânea vontade do estudo em questão (Anexo I - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido). Já na segunda expedição (janeiro de 2013), o montante de amostras fecais coletadas foi de 27 indivíduos, pois um dos indivíduos não estava presente na localidade para ceder o material, totalizando 55 amostras fecais humanas coletadas.

Os indivíduos que aceitaram participar do estudo não relataram nenhum tipo de sintomas ou quadro clínico compatível com gastroenterite sendo este um critério de inclusão. A idade variou de dias/meses a 60 anos de idade e todos moradores da localidade: Sítio do Mocó (Foto 4), o povoado mais próximo da entrada principal para os turistas no Parque Nacional Serra da Capivara.

Foto 4 – Vista do Sítio do Mocó - Município de Coronel José Dias – PI/Brasil (foto do autor).

3.6.2. Amostras Animais

As amostras fecais de origem animal foram coletadas diretamente do ambiente, onde se encontravam disponíveis, sem a captura dos animais, desde que apresentassem aspectos como cor e umidade que levassem à percepção de que se tratavam de fezes frescas.

A coleta foi realizada durante o percurso da expedição e foram coletados exemplares fecais tanto de animais silvestres quanto de animais de criação. No caso das amostras dos animais silvestres, algumas características foram utilizadas para o auxílio da identificação das fezes, como a forma, a presença de pelos e marcas de pegadas e rastros dos animais[86].

No total, foram coletadas 29 amostras fecais nas duas expedições de campo, sendo 7 de animais silvestres e 7 de animais de criação na primeira expedição, e 8 de animais silvestres e 7 de animais de criação na segunda expedição (Tabela 5).

Tabela 5 – Distribuição das Amostras Fecais Provenientes de Animais e seus Respectivos Locais de Origem.

COLETA	ORIGEM DAS AMOSTRAS		LOCAL DE COLETA	Nº DE AMOSTRAS
Junho - 2012 (14 amostras)	**Animais Silvestres** (n = 7)	Primata (Macaco prego)	Guarita Serra Vermelha	2
		Kerodon rupestris (Mocó)	Boqueirão da Pedra Furada	2
		Aves (Cancão)	Guarita Serra Vermelha	2
		Carnívoro (Onça)	Olho d água da cocheira	1
	Animais de Criação (n = 7)	Suínos (Porcos)	Fazenda Esperança	3
		Aves (Galinhas)	Fazenda Esperança	2
			Sítio do Mocó	2
Janeiro - 2013 (15 amostras)	**Animais Silvestres** (n = 8)	Primata (Macaco prego)	Guarita Serra Vermelha	2
		Kerodon rupestris (Mocó)	Boqueirão da Pedra Furada	2
		Aves (Cancão)	Guarita Serra Vermelha	2
		Anuro (sapo)	Caldeirão do Gado	2
	Animais de Criação (n = 7)	Suínos (Porcos)	Fazenda Esperança	3
		Aves (Galinhas)	Fazenda Esperança	2
			Sítio do Mocó	2
TOTAL				29

3.6.3. Amostras Ambientais

Como o recurso hídrico é escasso na localidade do PNSC e seu entorno, fontes alternativas de suprimento de água são necessárias no cotidiano da população, que utiliza as seguintes formas de armazenamento de água:

Barreiros, açudes, tanques e barragens: Escavações antrópicas em terrenos argiloso que acumulam água da chuva, ou deposições de terra com o intuito de barrar o escoamento da água de chuva, acumulando-a;

Cisternas: Reservatório de alvenaria ou fibra que armazena água da chuva captada por um sistema de calhas, com capacidade para 10.000 a 16.000 litros;

Caldeirão: Depressões escavadas naturalmente no afloramento rochoso que acumulam água de chuva;

Poços profundos: Perfurações no terreno que captam água subterrânea.

Neste estudo, as amostras de águas coletadas foram provenientes de fonte de consumo humano e animal e ainda águas destinadas a diversos outros usos provenientes de caldeirões, cisternas, barreiros, barragens e poços no interior e entorno do Parque Nacional Serra da Capivara abrangendo tanto áreas de baixada quanto áreas de maior altitude, como as chapadas (Figura 3).

Ao todo, foram coletadas 43 amostras de água superficial em diversos corpos d´água encontrados nas duas expedições. Cada amostra de água coletada correspondeu a um dos pontos de coleta marcado na Figura 4, os quais são descritos no Quadro 2.

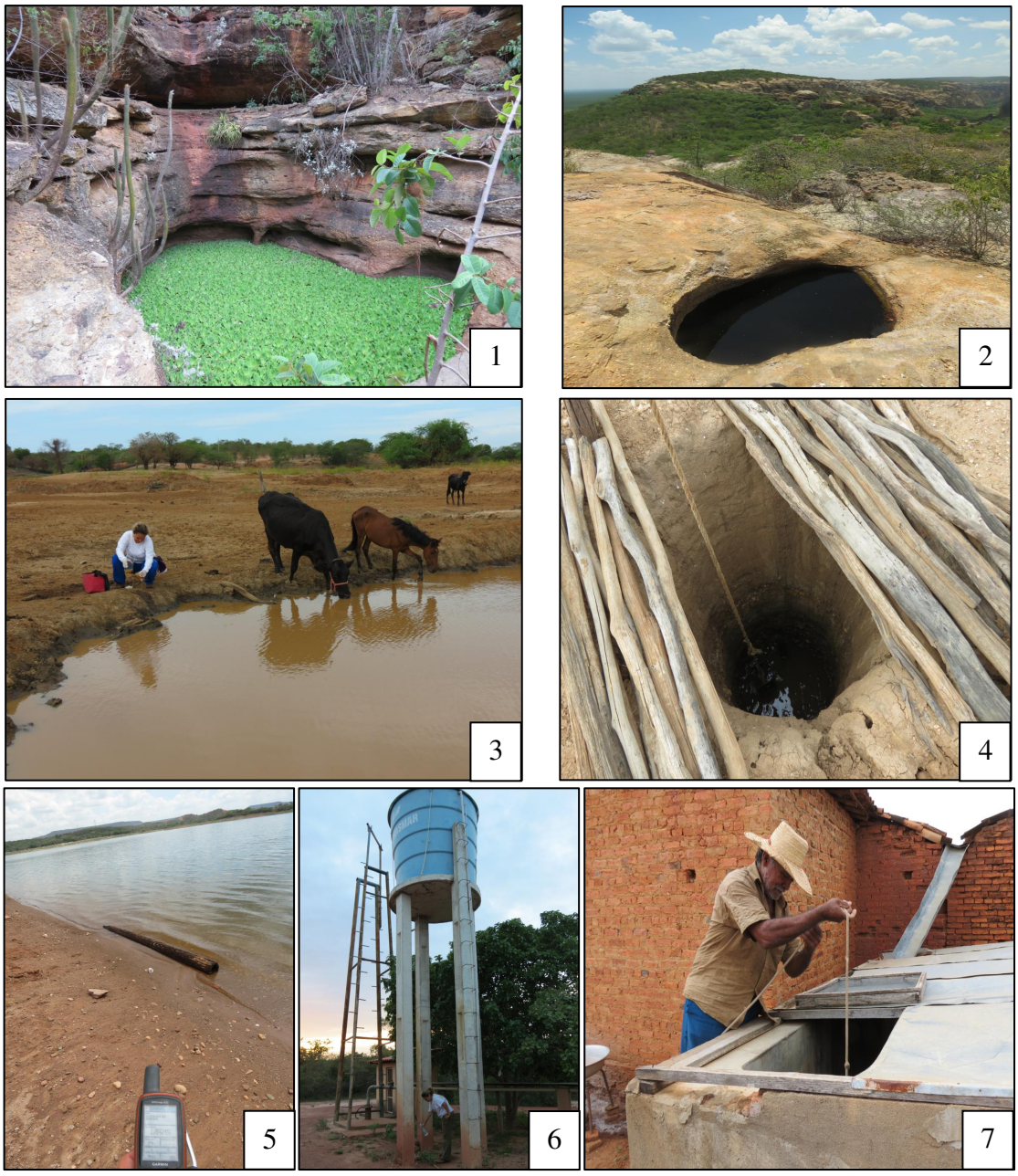


Figura 3 – Demonstração dos locais de coleta - **Caldeirão**: 1) Caldeirão do Perna, 2) Caldeirão do Alto da Serrinha; **Barreiro**: 3) Barragem da Lagoinha, 4) Cisterna da Lagoinha; **Barragem**: 5) Barragem do Jenipapo; **Poço**: 6) Poço do FUMDHAM; **Cisterna**: 7) Cisterna Joãozinho da Borda (fotos do autor).

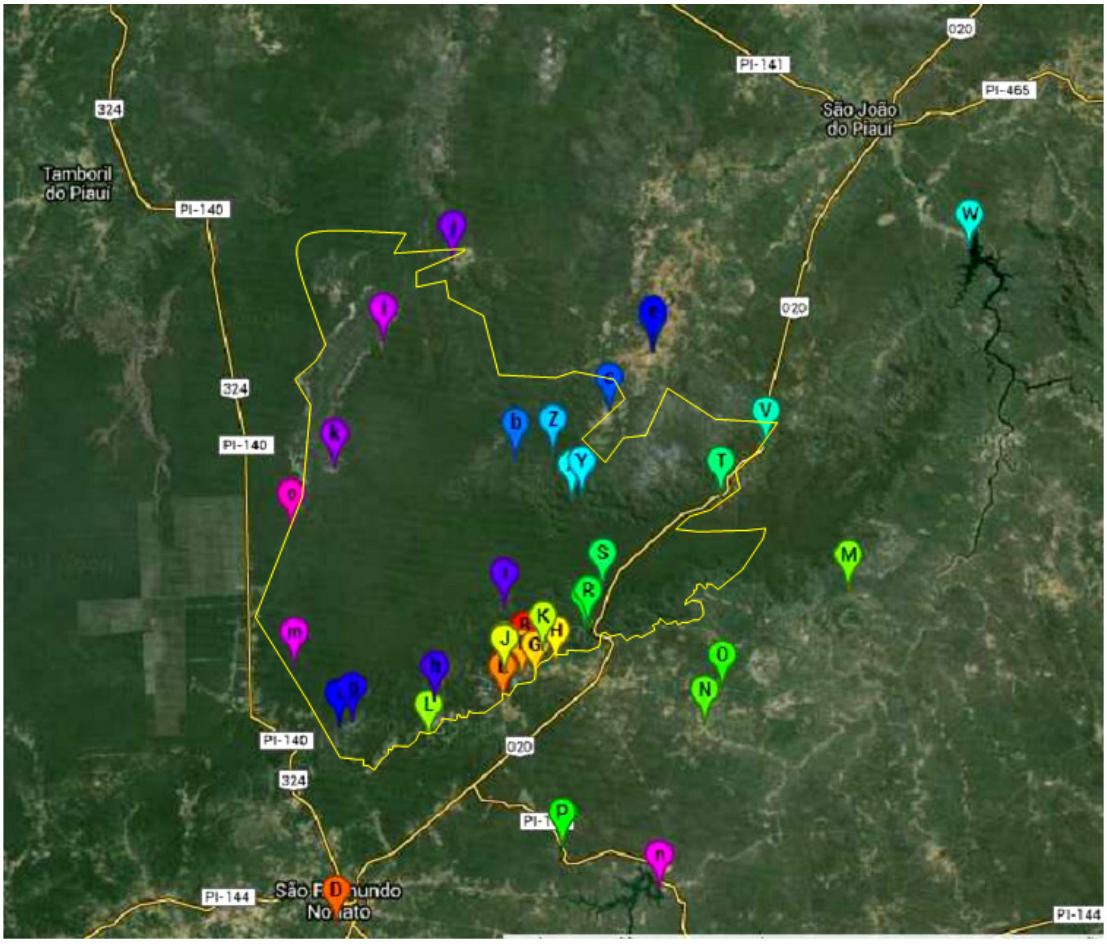


Figura 4 – Mapa dos Pontos de Coleta. A – Caldeirão Boqueirão da Pedra Furada; B – Caldeirão Grotão da Esperança; C – Baixão das Mulheres; D – Caldeirão do anfiteatro – Museu; E – Sítio do Moco; F – Caldeirão do Vilmar; G – Fazenda Esperança; H - Caldeirão da Cerâmica; I - Caldeirão do Fundo do Boqueirão da Pedra Furada; J – Caldeirão do Apertado; K – Caldeirão do alto da Serrinha; L - Barragem dos 80, M - Barragem da Veneza; N – Lagoinha (Cisterna e Barragem); O - Joãozinho da Borda (Poço para uso em geral; Poço para consumo doa animais e Cisterna); P – Caldeirão do Rogério; Q - Caldeirão do Paraguaio; R - Baixão da Vaca; S - Caldeirão do Urubu; T - Caldeirão da beirada; U - Caldeirão do Veredão Paraguaio; V - Olho d'água do Cezario; W - Barragem do Jenipapo; X - Olho d'água da Cocheira; Y - Caldeirão/Olho d'água da Cacimba; Z - Caldeirão do fundo do Boqueirão do Gongo; a - Tanque de cimento do Gongo; b - Olho d'água do Gongo; c- Barragem do São João Vermelho; d - Barragem do Cambraia; e - Morro do Severo; f - Caldeirão do Muriçoca; g – Caldeirão das Andorinhas; h - Caldeirão do Perna; i – Zabelê, j – Tanque do Alegre (Não foi realizada coleta – Tanque seco); k - Caldeirão/Olho d'água da Serra Branca; l - Caldeirão do Nezinho; m - Poço da FUMDHAM; n - Barragem do Onça; o - Guarita da Serra Vermelha; p – Caldeirão da Barriguda.

Quadro 2 – Locais e Período de Coleta de Amostras Ambientais, com suas Respectivas Origens e Utilizações.

Período – Junho 2012 e Janeiro 2013				
Ponto de coleta	**Forma de Armazenamento**	**Origem da água**	**Local**	**Utilização**
Caldeirão do Museu – Anfiteatro (D)*	Caldeirão	chuva	Interior PNSC	Consumo por animais silvestres
Caldeirão Cerâmica (H)	Barreiro	chuva	Entorno PNSC	Consumo por animais de criação
Caldeirão do Alto da Serrinha (K)	Caldeirão	chuva	Interior PNSC	Consumo por animais silvestres
Caldeirão Grotão da esperança (B)	Caldeirão	chuva	Interior PNSC	Consumo por animais silvestres
Caldeirão da Esperança (G)	Barreiro	chuva	Entorno PNSC	Consumo por animais de criação e silvestres
Caldeirão do Vilmar - Cald. do Sítio do Meio (F)	Caldeirão	chuva	Interior PNSC	Consumo por animais silvestres
Caldeirão BPF (A)	Caldeirão	chuva	Interior PNSC	Consumo por animais silvestres
Caldeirão Fundos do BPF (I)	Caldeirão	chuva	Interior PNSC	Consumo por animais silvestres
Caldeirão do Apertado (J)	Caldeirão	chuva	Interior PNSC	Consumo por animais silvestres
Caldeirão do Gado - Baixão das Mulheres (C)	Caldeirão	chuva	Interior PNSC	Consumo por animais silvestres
Poço Joãozinho da Borda (uso em geral) (O)	Poço	Poço semi-artesiano	Entorno PNSC	Uso em geral e consumo por animais de criação
Poço Joãozinho da Borda (consumo animais) (O)	Poço	Poço semi-artesiano	Entorno PNSC	Consumo por animais de criação
Cisterna Joãozinho da Borda (O)	Cisterna	chuva	Entorno PNSC	Consumo humano
Cisterna da Lagoinha (N)	Barreiro	chuva	Entorno PNSC	Uso humano e consumo por animais de criação
Barragem da Lagoinha (N)	Barragem	chuva	Entorno PNSC	Uso humano e consumo por animais de criação
Barragem da Veneza (M)	Barragem	chuva	Entorno PNSC	Uso humano e consumo por animais de criação
Caldeirão do Rogério (P)	Caldeirão	chuva	Entorno PNSC	Consumo por animais de criação
Barragem do Onça (n)	Barragem	Bacia Canidé - Piauí	Entorno PNSC	Uso e consumo humano e por animais de criação
Barragem dos 80 (L)	Barragem	chuva	Interior PNSC	Consumo por animais silvestres
Baixão da Vaca (R)	Caldeirão	chuva	Interior PNSC	Consumo por animais silvestres
Caldeirão do Paraguaio (Q)	Caldeirão	chuva	Interior PNSC	Consumo por animais silvestres
Caldeirão da beirada (T)	Barreiro	chuva	Entorno PNSC	Uso humano e consumo por animais de criação
Caldeirão do Veredão Paraguaio (U)	Barreiro	chuva	Entorno PNSC	Uso humano e consumo por animais de criação
Olho d'água do Cezario (V)	Barreiro	fonte natural	Entorno PNSC	Uso humano e consumo por animais de criação
Barragem do Jenipapo (W)	Barragem	Bacia Canindé - Piauí	Entorno PNSC	Uso e consumo humano e por animais de criação
Barragem do Cambraia (d)	Barragem	chuva	Entorno PNSC	Consumo por animais de criação

Período – Junho 2012 e Janeiro 2013				
Ponto de coleta	**Forma de Armazenamento**	**Origem da água**	**Local**	**Utilização**
Poço do Morro do Severo (e)	Poço	Poço artesiano	Entorno PNSC	Uso e consumo humano e por animais de criação
Barragem do São João Vermelho (c)	Barragem	chuva	Entorno PNSC	Consumo por animais de criação
Caldeirão do fundo do Boqueirão do Gongo (Z)	Caldeirão	chuva	Interior PNSC	Consumo por animais silvestres
Tanque de cimento do Gongo (a)	Caldeirão	chuva	Interior PNSC	Consumo por animais silvestres
Olho d'água do Gongo (b)	Caldeirão	fonte natural	Interior PNSC	Consumo por animais silvestres
Caldeirão/Olho d'água da Cacimba (Y)	Caldeirão	chuva	Interior PNSC	Consumo por animais silvestres
Olho d'água da Cocheira (X)	Caldeirão	chuva	Interior PNSC	Consumo por animais silvestres
Caldeirão do Urubu (S)	Caldeirão	chuva	Interior PNSC	Consumo por animais silvestres
Zabelê (i)	Caldeirão	chuva	Interior PNSC	Consumo por animais silvestres
Olho d'água da Serra Branca (k)	Caldeirão	fonte natural	Interior PNSC	Consumo por animais silvestres
Caldeirão/Olho d'água da Serra Branca (k)	Caldeirão	fonte natural	Interior PNSC	Consumo por animais silvestres
Caldeirão do Nezinho (l)	Caldeirão	chuva	Interior PNSC	Consumo por animais silvestres
Caldeirão do Muriçoca (f)	Barreiro	chuva	Entorno PNSC	Consumo por animais de criação
Caldeirão das Andorinhas (g)	Caldeirão	chuva	Interior PNSC	Consumo por animais silvestres
Caldeirão da Barriguda (p)	Caldeirão	chuva	Interior PNSC	Consumo por animais silvestres
Caldeirão do Perna (h)	Caldeirão	chuva	Interior PNSC	Consumo por animais silvestres
Poço do FUMDHAM (m)	Poço	Poço artesiano	Interior PNSC	Uso e consumo humano e por animais silvestres

*( )-Localização no mapa na Figura 4.

3.7. Coleta das Amostras

3.7.1. Metodologia Empregada para a Coleta de Amostras Fecais de Origem Humana

As amostras fecais humanas foram coletadas pelos próprios participantes do estudo, após explicitação da pesquisa, leitura e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Também foram fornecidas orientações claras e objetivas sobre os procedimentos para a coleta do material (Anexo I - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido). Como critério de inclusão ficou estabelecido que, para participar da pesquisa, o indivíduo apresenta-se perfeito estado físico de saúde.

3.7.2. Metodologia Empregada para a Coleta de Amostras Fecais de Origem Animal

As amostras de fezes, tanto de animais silvestres quanto de criação, foram obtidas por intermédio de *swabs* e conservadas utilizando meio de transporte Cary-Blair durante as duas expedições ao PNSC (Foto 5). Para a coleta, as fezes foram impregnadas em *swabs* por contato e em seguida introduzidas no tubo contendo o meio de transporte (Cary-Blair).

Foto 5 - Amostra de Origem Animal à Beira do Caldeirão do Gado (Município de Coronel José Dias – PI/Brasil) e o Dispositivo Utilizado para a Coleta (*swab* com meio de transporte) (fotos do autor).

3.7.3. Metodologia Empregada para a Coleta de Amostras Ambientais – Amostras de Água dos Corpos d´Água

Para a coleta das amostras de água, foram utilizadas seringas (60 mL) acopladas a suportes de filtração estéreis contendo uma membrana de éster celulose com porosidade de 0,22 µm e 47 mm de diâmetro (Swinnex®, Millipore, USA), seguindo metodologia adaptada de Ramaiah e De[87] (Figura 5).

Figura 5 – Coleta de Amostra Ambiental Utilizando Sistema de Filtração (fotos do autor).

3.8. Transporte de Amostras

Após a coleta das amostras de água, cada suporte de filtração contendo a membrana filtrante onde as células bacterianas ficaram retidas e os *swabs* contendo os materiais fecais humanos e animais foram armazenados imediatamente em caixas térmicas de transporte e conservados a cerca de 10ºC com gelo reciclável (Figura 11) até a chegada dos materiais ao laboratório de Zoonoses Bacterianas, IOC/Fiocruz,RJ (aproximadamente de 72 h a 96 h).

3.9. Processamento das Amostras

Após a chegada ao laboratório, os suportes de filtração foram abertos dentro da cabine de segurança biológica e a membrana foi removida assepticamente com o auxílio de uma pinça. Em seguida, cada membrana foi introduzida em tubos contendo 40 mL de Caldo Nutriente (Difco, USA) e incubadas em estufa bacteriológica a 37°C durante 18 a 24 horas[88].

Os *swabs* utilizados para a coleta de material fecal, tanto animal quanto humano, foram mantidos em temperatura de geladeira (4°C) por até 2 horas, antes de serem utilizados para semeadura nos meios de cultura específicos.

Para os *swabs* contendo as amostras fecais coletadas, utilizou-se o esquema clássico para pesquisa de Enterobactérias potencialmente patogênicas com meios de enriquecimento (Caldo Rappaport/ Merck e Água Peptonada Alcalina/ pH 8,4-8,6) e posterior semeadura em meios seletivos, e também, a semeadura direta em meios seletivos (ágar EMB – Eosin Methylene Blue Agar/ Difco, USA e ágar Hektoen – Hektoen Enteric Agar/ Difco, USA)[89]. Para a pesquisa de bactérias do Gênero *Campylobacter*, utilizou-se semeadura direta em ágar Columbia com Carvão (Difco, USA)[90].

3.9.1. Isolamento Bacteriano

A semeadura do inóculo, realizada com o próprio *swab*, bem como das alíquotas de 10µL do caldo de enriquecimento pós-incubação, foi realizada no meio de cultura com baixa seletividade (Meio EMB) e no meio de cultura com média seletividade (ágar Entérico Hektoen) e ágar Colúmbia com carvão para a pesquisa do gênero *Campylobacter*.

A partir do crescimento de 24 horas à temperatura de 37^{o}C, observou-se as características das colônias, tanto das bactérias fermentadoras de lactose com coloração rosa/rosa escura (Lac+) quanto das bactérias não fermentadoras de lactose, que se apresentam como claras ou transparentes (Lac-)

Foram definidos alguns critérios para a seleção de colônias, visando obter uma amostra representativa da população presente em cada placa semeada: a apresentação de aspectos macro-morfológicos diferentes (tamanho, bordos, elevação e pigmentação) e o número de colônias em cada placa semeada (3 a 5 colônias, dependendo da quantidade de crescimento). Em sequência, as colônias selecionadas foram repicadas para nova placa contendo os meios de cultura ágar EMB, ágar Hektoen e ágar Colúmbia com carvão, visando à confirmação da pureza das colônias.

3.9.2. Caracterização Bioquímica

Após a semeadura e a obtenção do crescimento bacteriano em forma de colônias isoladas, as amostras de interesse foram classificadas taxonomicamente através da utilização de testes e provas que determinam seu metabolismo bioquímico. As provas utilizadas foram baseadas na fermentação, oxidação, degradação e hidrólise de vários substratos, destinados à identificação de bactérias aeróbias Gram-negativas pertencentes à família Enterobacteriaceae e do gênero *Campylobacter*, além de bacilos Gram-negativos não fermentadores da glicose. Para os bacilos Gram-negativos, fermentadores ou não, as técnicas de isolamento e identificação obedeceram a orientações metodológicas clássicas[89, 91].

Colônias isoladas foram transferidas para tubos de ensaios contendo os meios para as análises bioquímicas: TSI (Triple Sugar Iron Agar/ Difco, USA), SIM (H_2S - Indol – Motilidade/ Himedia, IND), Citrato de Simmons (Himedia, IND), descarboxilação da lisina (L-lisina/ Difco, USA) e para pesquisa de urease (Caldo Uréia/ Himedia, IND), todos incubados a 37ºC durante o período de 24 a 48h.

Na análise do grupo dos coliformes, as colônias foram transferidas para o meio de triagem TSI e paralelamente foram semeadas em meio de cultura cromogênico (Agar HiCrome ECC/ Himedia, IND) visando a identificação presuntiva de coliformes oriundos das coproculturas e do meio ambiente.

Após a leitura dos testes bioquímicos, as amostras foram identificadas conforme gênero e/ou espécie bacteriana (Quadro 3). Além desse esquema bioquímico simplificado, foi necessário acrescentar outros testes para algumas cepas, como o de fermentação de maltose, descarboxilação de outras fontes de aminoácidos (arginina e ornitina), utilização de malonato, provas de Vermelho de metila e Voges-Proskauer e o teste de fenilalanina-desaminase.

Quadro 3 – Sistema Simplificado de Provas Bioquímicas para a Identificação dos Principais Gêneros da Família Enterobacteriaceae.

TESTES\ ESPÉCIES	*Escherichia*	*Shigella*	*Salmonella*	*Citrobacter*	*Klebsiella*	*Enterobacter*	*Hafnia*	*Serratia*	*Proteus*	*Yersinia*
GLICOSE (Gás)	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
LACTOSE (ácido)	+	-	-	V	+	+	-	-	-	-
CITRATO SIMMONS	-	-	+	+	+	+	-	+	v	v
H_2S	-	-	+	V	-	-	-	-	v	-
INDOL	+	v	-	V	-	-	-	-	v	v
LISINA DESCARBOXILASE	+	-	+	-	+	V	+	+	-	-
UREASE	-	-	-	V	+	V	-	v	+	+
MOTILIDADE A 37 ºC	v	-	+	+	-	+	+	+	+	v

Legenda: + Positivo; - Negativo; v variável dependendo da espécie. Fonte Koneman *et al*., 2008[39]

Para o estudo das bactérias do gênero *Campylobacter*, o material foi semeado no meio de cultura ágar Columbia acrescido de 4% de carvão inativado, e incubado em atmosfera de microaerofilia por período de 48 horas a 42°C. Findo o período de incubação, observou-se como triagem o crescimento característico das colônias com brilho d´água, constatando-se através da coloração de Gram a morfologia celular típica do gênero *Campylobacter* [92].

O diagnóstico presuntivo do gênero *Campylobacter* baseia-se na observação microscópica das colônias suspeitas, através de esfregaço corado pelo método de Gram e na produção ou não das enzimas oxidase e catalase. Acrescentam-se ainda os testes de hidrólise do acetado de indoxila e do hipurato de sódio, visando identificar as três principais espécies incriminadas nos processos gastroentéricos: *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* e *Campylobacter lari*[22].

3.9.3. Manutenção das Amostras Bacterianas

Após a identificação bioquímica, as cepas foram repicadas em microtubos de centrífugas contendo ágar estoque (Difco) e em seguida foram incubadas a 35ºC por 24h. Os microtubos foram identificados e envolvidos com fita do tipo parafilme, para melhor vedação, e foram armazenados em sala refrigerada, ao abrigo da luz.

3.9.4. Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos (TSA)

O perfil de resistência antimicrobiana foi realizado através do método de difusão em ágar[93, 94], segundo as recomendações do Clinical and Laboratoty Standardas[95], utilizando-se discos (Oxoid) impregnados com as seguintes drogas e respectivas concentrações apresentadas no Quadro 4.

O critério de escolha destes fármacos tomou por referência, as drogas de última geração empregadas na terapêutica humana e veterinária, e áquelas recomendadas pela Organização Mundial de Saúde – OMS[95] quanto aos antimicrobianos utilizados no monitoramento da resistência bacteriana. Os fármacos utilizados foram Ampicilina, Ácido Nalidíxico, Cefoxitina, Ceftazidima, Ciprofloxacina, Gentamicina, Imipenem, Estreptomicina, Cloranfenicol, Sulfametoxazol-Trimetoprim, Tetraciclina e Nitrofurantoina, que são representativos das seguintes classes de antimicrobianos: beta-lactâmicos (penicilinas e cefalosporinas), fenicóis, tetraciclinas, quinolonas, aminoglicosídeos, carbapenens, inibidores

de folatos e nitrofuranos (Quadro 4).

A cepa padrão associada ao controle da qualidade do meio de cultura e discos antimicrobianos foi a *Escherichia coli* ATCC 25922 que é utilizada para avaliação geral da bateria de discos, inclusive associações de inibidores da Beta-lactamase; controle negativo para Beta-lactamase.

A partir da cultura de 24 horas a 37°C em placas de ágar Nutriente (Difco), foram selecionadas de 5 a 10 colônias, as quais foram inoculadas em Caldo Muiller-Hinton (Oxoid) e incubadas a 37°C até atingir densidade ótica correspondente a turvação 0,5 da escala de MacFarland (BioMerieux). O inóculo foi padronizado através do espectofotômetro (Unico-1100, EUA). Este crescimento bacteriano foi semeado na superfície das placas contendo Agar Mueller-Hinton (Oxoid) com uso de *swab* esterelizado. Após 15 minutos, os discos foram depositados sobre o meio (Anexo II).

As placas foram incubadas a 35°C por 16-18 horas, sendo observada a presença ou não de halos de inibição, assim como seu diâmetro através do uso de um paquímetro digital (Mitutoyo, Japão) comparando-os com a tabela dos valores de referência[95].

Quadro 4 – Drogas Antimicrobianas Utilizadas na Avaliação do Perfil de Suscetibilidade Antimicrobiana.

Antimicrobianos (Oxoid)		**Concentração**	**Sigla**
Beta-lactâmicos			
Penicilina	Ampicilina	10 µg	AMP
Cefalosporina	Cefoxitina	30 µg	FOX
	Ceftazidima	30 µg	CAZ
Quinolonas	Acido Nalidíxico	30 µg	NA
	Ciprofloxacina	10 µg	CIP
Aminoglicosídeos	Gentamicina	10 µg	CN
	Estreptomicina	10 µg	S
Carbapenens	Imipenem	10 µg	IMP
Fenicois	Cloranfenicol	30 µg	C
Antifolatos	Sulfametoxazol-Trimetoprim	25 µg	SXT
Tetraciclinas	Tetraciclina	30 µg	TE
Nitrofuranos	Nitrofurantoina	300 µg	F

3.10. Caracterização antigênica de *Salmonella* spp.

A partir da confirmação do perfil bioquímico, as amostras foram semeadas em Agar Nutriente inclinado (Difco) e incubadas a 37°C durante 18 a 24 horas. O crescimento obtido foi suspenso em 1 a 2 mL de solução 0,85% de cloreto de sódio. A caracterização antigênica foi realizada após a verificação da estabilidade da suspenção, visando eliminar as formas rugosas (auto-aglutinação), através da técnica de soroaglutinação rápida em lâmina. Foram utilizados os antissoros polivalentes e monovalentes somáticos (O) e flagelares (H) para a identificação da estrutura antigênica[96].

A identificação antigênica foi realizada no Laboratório de Referência Nacional de Enteroinfecções Bacteriana (LRNEB), do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ/RJ, realizada com base no esquema sorológico de Kauffmann-White e Le Minor e repersentada de acordo com as orientações de Grimont e Weill[35] Todos os antissoros empregados foram produzidos pelo LRNEB/IOC/FIOCRUZ.

3.11. Eletroforese em Campo Pulsado (PFGE – *Pulsed-Field Gel Eletrophoresis*) para Amostras de *Salmonella* spp.

A técnica de eletroforese em campo pulsado, do inglês *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE) é usada para separar grandes fragmentos de DNA por meio da reorientação do DNA em gel pela ação de campos elétricos alternados. Esta técnica é reconhecida como padrão ouro para a caracterização de linhagens bacterianas[97].

Os ensaios foram baseados no procedimento operacional padrão preconizado pela *PulseNet PFGE* para subtipagem molecular de sorovares de *Salmonella* spp., disponíveis no sítio eletrônico do Centro de Controle e Prevenção de Doenças – CDC (http://www.cdc.gov/pulsenet). Este procedimento é preconizado pelo CDC com o propósito de fornecer aos participantes do *PulseNet* a garantia de que o mesmo procedimento esteja sendo realizado para a realização de PFGE de *Salmonella* em diferentes laboratórios, de forma a garantir a comparação interlaboratorial dos resultados gerados (Anexo III).

Tal procedimento utiliza o sistema CHEF-DR III para a eletroforese em gel de campo pulsado e conta com três etapas principais, descritas suscintamente no Anexo III: i) Lise celular; ii) Digestão do DNA a ser analisado com enzima de restrição (XbaI); e iii) Preparação e carga do gel de agarose. A interpretação dos resultados da análise é realizada por meio da visualização dos fragmentos de DNA em gel de agarose, corados por brometo de etídio, que emite fluorescência ao ser submetido à luz ultravioleta[98].

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Isolamento de Bactérias Gram-negativas nas Amostras de Diferentes Origens

Conforme descrito, as coletas foram realizadas em diferentes regiões no interior e entorno do PNSC, durantes as idas ao campo (junho de 2012 e janeiro de 2013), computando um montante de 170 amostras coletadas.

Como resultado, foi obtido um total de 522 isolados de bactérias Gram-negativas provenientes das 86 amostras de água, 55 amostras fecais de origem humana e 29 amostras fecais de origem animal. Foram obtidos 169 isolados bacterianos a partir do processamento do material coletado na primeira expedição e 353 isolados do material resultante da segunda ida a campo, como pode ser observado na Tabela 6.

Em todas as 170 amostras coletadas, obteve-se o isolamento de bactérias Gram-negativas potencialmente patogênicas, pertencentes à família Enterobacteriaceae, independente do local de coleta ou fonte de isolamento.

Tabela 6 – Distribuição dos Isolados de Bactérias Gram-negativas em Cada Período de Coleta Segundo a Fonte de Origem.

PERÍODOS	ORIGEM	Nº AMOSTRAS (%)	Nº DE ISOLADOS (%)	TOTAL (%)
Junho 2012	Humana	28 (16,5)	68 (13)	
	Animal	14 (8,2)	22 (4,2)	169
	Ambiental	43 (25,3)	79 (15,3)	(32,4)
Janeiro 2013	Humana	27 (15,9)	91 (17,4)	
	Animal	15 (8,8)	28 (5,3)	353
	Ambiental	43 (25,3)	234 (44,8)	(67,6)
TOTAL		170 (100)	522 (100)	522 (100)

4.2. Caracterização Bioquímica das Bactérias Gram-negativas

A maioria das bactérias isoladas (60%) foi oriunda dos ecossistemas aquáticos, seguido das amostras de origem humana (30,5%) e de origem animal (9,5%). Como o número de coletas ambientais superou o número de coletas de amostras humanas e animais, é possível que isso possa ter impactado o número de isolamentos (Tabela 7).

Tabela 7 – Número de Bactérias Gram-negativas Fermentadoras Isoladas de acordo com o Período de Coleta e Fonte de Isolamento.

ORIGEM DO MATERIAL	PERÍODOS	TOTAL (%)
Água coletada (60%)	Junho 2012 (1ª coleta)	79 (15,2)
	Janeiro 2013 (2ª coleta)	234 (44,8)
Fezes humanas (30,5%)	Junho 2012 (1ª coleta)	68 (13)
	Janeiro 2013 (2ª coleta)	91 (17,5)
Fezes animais (9,5%)	Junho 2012 (1ª coleta)	22 (4,2)
	Janeiro 2013 (2ª coleta)	28 (5,3)
100%	**TOTAL**	522

A presença de bactérias Gram-negativas fermentadoras de lactose em amostras de água coletadas em áreas rurais não é incomum, pois muitas vezes não encontramos um abastecimento de água adequado nestas áreas, levando os moradores a utilizarem poços e nascentes como as principais fontes de abastecimento, fontes estas bastante susceptíveis à contaminação[56].

Por se tratar de uma região com falta de abastecimento público de água, baixa pluviosidade e nenhum curso d'água permanente, o fornecimento de água para a área do PNSC é feito a partir de um poço artesiano perfurado de 800 metros de profundidade situado na baixa da Serra Branca (Poço do FUMDHAM). Este poço é utilizado para o abastecimento de água nas guaritas do Parque, realizado por caminhão-pipa.

A oferta da água de poço para os animais de criação em algumas localidades demonstra a grande importância dos rebanhos, que representam uma fonte essencial de alimentos para a população do semiárido, tendo em vista as dificuldades de manutenção da agricultura de subsistência, conforme registrado por Silva *et al*.[99] em toda a região semiárida nordestina.

Em algumas localidades, a água da cisterna é usada de forma alternada à água de poço. Isso pode representar um risco, visto a manutenção pouco frequente das cisternas que são usadas por algumas famílias de forma esporádica, pois a falta de higienização adequada contribui para um ambiente propício para a multiplicação e a disseminação de patógenos entéricos.

Em se tratando das amostras de origem animal, Jacobsen[100] destaca a importância dos animais silvestres no papel da transmissão de infecções humanas. Porém, como este estudo partiu do pressuposto de não utilizar a captura dos animais para coleta das amostras, a

obtenção das amostras diretamente do ambiente se apresenta como um fator complicador no processo de esclarecimento da circulação de patógenos zoonóticos.

Do total de 522 isolados bacterianos, foi possível classificar 508 (97,3%) isolados quanto ao gênero e/ou espécie da família Enterobacteriaceae. As bactérias classificadas inicialmente como bastonetes ou cocobacilos Gram-negativos foram submetidas a testes bioquímicos para a identificação conclusiva, com a utilização dos métodos tradicionais de identificação, não sendo usados os sistemas de identificação disponíveis comercialmente. Apenas 2,7% da amostragem total apresentou identificação inconclusiva, sendo a maioria de origem ambiental, provavelmente representando um universo amostral composto por bactérias bastante incomuns na sua classificação.

É importante ressaltar que muitos micro-organismos de origem ambiental não apresentam crescimento quando cultivados em meios de cultura usuais e os métodos fenotípicos de identificação bacteriana somente podem ser empregados em amostras cultivadas *in vitro* que exibam características metabólicas de acordo com os padrões observados nos gêneros e espécies já descritos. Deste modo, considera-se que os micro-organismos cultiváveis e identificáveis devem representar uma pequena fração da diversidade bacteriana presente no ambiente[101].

Como resultado da primeira coleta realizada no PNSC, em junho de 2012, foram isoladas 68 amostras bacterianas de origem humana, representando 13% dos isolados. Nesse montante, foi possível identificar 67 isolados das seguintes espécies e/ou gêneros da família Enterobacteriaceae: *Citrobacter* spp. (3 / 4,4%); *Citrobacter freundii* (5 / 7,3%); *Escherichia coli* (33 / 48,5%); *Enterobacter* spp. (13 / 19,2%); *Enterobacter cloacae* (1 / 1,4%); *Klebsiella oxytoca* (2 / 3%); *Klebsiella pneumoniae* (2 / 3%); *Proteus* spp. (1 / 1,4%); *Proteus mirabilis* (2 / 3%) e *Serratia* spp. (5 / 7,4%) sendo que em uma amostra (1,4%) não foi posssível chegar a identificação (Tabela 8).

Tabela 8 – Número e Percentual de Isolados das Coproculturas Humanas Classificados nos Gêneros e/ou Espécies da Família Enterobacteriaceae Distribuídos segundo os Períodos de Coleta.

IDENTIFICAÇÃO	AMOSTRAS COLETADAS		TOTAL (%)
	JUNHO 2012 (N = 28)	JANEIRO 2013 (N = 27)	
	Nº DE ISOLADOS (%)	Nº DE ISOLADOS (%)	
Citrobacter spp.	3 (4,4)	2 (2,2)	5 (3,15)
Citrobacter freundii	5 (7,3)	1 (1,1)	6 (3,9)
E.coli	33 (48,5)	49 (53,8)	82 (51,1)
Enterobacter spp.	13 (19,2)	1 (1,1)	14 (9)
Enterobacter agglomerans	-	14 (15,4)	14 (9)
Enterobacter cloacae	1 (1,4)	-	1 (0,6)
Enterobacter sakazakii	-	1 (1,1)	1 (0,6)
Klebsiella oxytoca	2 (3)	3 (3,3)	5 (3,15)
Klebsiella pneumoniae	2 (3)	8 (8,8)	10 (6,5)
Proteus spp.	1 (1,4)	-	1 (0,6)
Proteus mirabilis	2 (3)	2 (2,2)	4 (2,5)
Proteus vulgaris	-	2 (2,2)	2 (1,25)
Salmonella spp.	-	1 (1,1)	1 (0,6)
Serratia spp.	5 (7,4)	3 (3,3)	8 (5)
Serratia rubidaea	-	2 (2,2)	2 (1,25)
Sem identificação	1 (1,4)	2 (2,2)	3 (1,8)
TOTAL	68 (100)	91 (100)	159 (100)

Já na coleta realizada em janeiro de 2013, o número e percentual de isolamento foram os seguintes: *Citrobacter* spp. (2 / 2,2%); *Citrobacter freundii* (1 / 1,1%); *Escherichia coli* (49 / 53,8%); *Enterobacter* spp. (1 / 1,1%); *Enterobacter agglomerans* (14 / 15,4%); *Enterobacter sakazakii* (1 / 1,1%); *Klebsiella oxytoca* (3 / 3,3%); *Klebsiella pneumoniae* (8 / 8,8%); *Proteus mirabilis* (2 / 2,2%); *Proteus vulgaris* (2 / 2,2%); *Salmonella* spp. (1 / 1,1%); *Serratia* spp. (3 / 3,3%) e *Serratia rubidaea* (2 / 2,2%). Nesta coleta em duas amostras (2,2%) não foi possível chegar à identificação (Tabela 8).

Em relação às coproculturas animais, nas coletas realizadas em junho de 2012, foram identificados 22 isolados (4,2% do total de amostras isoladas), sendo que 20 se caracterizaram nas seguintes espécies e/ou gêneros: *Citrobacter* spp. (2 / 9%); *E.coli* (7 / 31,9%); *Enterobacter* spp. (7 / 31,9%); *Klebsiella pneumoniae* (2 / 9%); *Proteus* spp. (1 / 4,5%); tendo

três amostras (13,7%) sem identificação conclusiva (Tabela 9). Para os resultados relacionados à coleta realizada em janeiro de 2013, temos: *Citrobacter* spp. (2 / 7,1%); *Citrobacter freundii* (1 / 3,6%); *Escherichia coli* (15 / 53,5%); *Enterobacter* spp. (1 / 3,6%); *Enterobacter cloacae* (3 / 10,7%); *Enterobacter agglomerans* (1 / 3,6%); *Klebsiella pneumoniae* (1 / 3,6%); *Proteus mirabilis* (2 / 7,1%) e *Salmonella* spp. (2 / 7,1%) (Tabela 9).

Quanto aos isolamentos ambientais, na coleta realizada em junho de 2012, foram obtidos 79 isolados (15,2 %) e identificados bioquimicamente 76 amostras nas seguintes espécies e/ou gêneros da Família Enterobacteriaceae: *Citrobacter* spp. (3 / 3,8%); *Citrobacter freundii* (7 / 8,8%); *Escherichia coli* (18 / 22,7%); *Enterobacter* spp. (17 / 21,5%); *Hafnia alvei* (2 / 2,6%); *Klebsiella* spp. (12 / 15,2%); *Klebsiella pneumoniae* (1 / 1,3); *Proteus* spp. (1 / 1,3%); *Proteus vulgaris* (1 / 1,3%); *Salmonella* spp. (9 / 11,4%) e *Serratia* spp. (5 / 6,3%) e ainda em três amostras (3,8%) não foi possível chegar a identificação (Tabela 9).

Tabela 9 – Número e Percentual de Isolados das Coproculturas Animais Classificados nos Gêneros e/ou Espécies da Família Enterobacteriaceae Distribuídos segundo os Períodos de Coleta.

IDENTIFICAÇÃO	**AMOSTRAS COLETADAS**		**TOTAL (%)**
	JUNHO 2012 (N = 14)	**JANEIRO 2013 (N = 15)**	
	Nº DE ISOLADOS (%)	**Nº DE ISOLADOS (%)**	
Citrobacter spp.	2 (9)	2 (7,1)	4 (8)
Citrobacter freundii		1 (3,6)	1 (2)
E.coli	7 (31,9)	15 (53,5)	22 (44)
Enterobacter spp.	7 (31,9)	1 (3,6)	8 (16)
Enterobacter agglomerans	-	1 (3,6)	1 (2)
Enterobacter cloacae	-	3 (10,7)	3 (6)
Klebsiella pneumoniae	2 (9)	1 (3,6)	3 (6)
Proteus mirabilis	-	2 (7,1)	2 (4)
Proteus spp.	1 (4,5)	-	1 (2)
Salmonela spp.	-	2 (7,1)	2 (4)
Sem identificação	3 (13,7)	-	3 (6)
TOTAL	22 (100)	28 (100)	50 (100)

Contabilizando os resultados provenientes do segundo período de coleta, correspondente a janeiro de 2013: *Citrobacter* spp. (10 / 4,3%); *Citrobacter freun*dii (12 / 5,2%); *E.coli* (48 / 20,6%); *Enterobacter* spp. (50 / 21,4%); *Enterobacter aerogenes* (1 / 0,4%); *Enterobacter agglomerans* (6 / 2,5%); *Enterobacter cloacae* (3 / 1,4%); *Hafnia alvei* (4 / 1,8%); *Klebsiella* spp. (15 / 6,4%); *Klebsiella pneumoniae* (16 / 6,8%); *Proteus* spp. (1 / 0,4%); *Proteus mirabilis* (5 / 2,1%); *Proteus vulgaris* (11 / 4,7%); *Salmonella* spp. (40 / 17%) e *Serratia* spp. (6 / 2,5%) e ainda em seis amostras (2,5%) onde não foi possível chegar a identificação (Tabela 10).

Tabela 10 – Número e Percentual de Isolados das Amostras Ambientais Classificados nos Gêneros e/ou Espécies da Família Enterobacteriaceae Distribuídos segundo os Períodos de Coleta.

IDENTIFICAÇÃO	**AMOSTRAS COLETADAS**		**TOTAL (%)**
	JUNHO 2012 (N = 43)	**JANEIRO 2013 (N = 43)**	
	Nº DE ISOLADOS (%)	**Nº DE ISOLADOS (%)**	
Citrobacter spp.	3 (3,8)	10 (4,3)	13 (4,2)
Citrobacter freundii	7 (8,8)	12 (5,2)	19 (6)
E.coli	18 (22,7)	48 (20,6)	66 (21)
Enterobacter spp.	17 (21,5)	50 (21,4)	67 (21,4)
Enterobacter aerogenes	-	1 (0,4)	1 (0,3)
Enterobacter agglomerans	-	6 (2,5)	6 (1,9)
Enterobacter cloacae	-	3 (1,4)	3 (0,9)
Hafnia alvei	2 (2,6)	4 (1,8)	6 (1,9)
Klebsiella spp.	12 (15,2)	15 (6,4)	27 (8,6)
Klebsiella pneumoniae	1 (1,3)	16 (6,8)	17 (5,4)
Proteus spp.	1 (1,3)	1 (0,4)	2 (0,6)
Proteus mirabilis	-	5 (2,1)	5 (1,6)
Proteus vulgaris	1 (1,3)	11 (4,7)	12 (3,9)
Salmonella spp.	9 (11,4)	40 (17)	49 (15,7)
Serratia spp.	5 (6,3)	6 (2,5)	11 (3,6)
Sem identificação	3 (3,8)	6 (2,5)	9 (3)
TOTAL	79 (100)	234 (100)	313 (100)

Analisando todo o material isolado e com respectiva identificação de todos os gêneros e espécies encontrados, nos 522 isolados destacam-se como mais incidentes os seguintes gêneros e espécies da família Enterobacteriaceae: 170 (32,6%) de *E.coli*; 119 (22,8%) do gênero *Enterobacter* spp.; 62 (11,8%) de *Klebsiella* spp.; 52 (10%) de *Salmonella* spp.; 48 (9,2%) de *Citrobacter* spp.; 29 (5,5%) *Proteus* spp.; 6 (1,2%) de *Hafnia alvei*; 21 (4%) de *Serratia* spp. e 15 (2,9%) sem identificação, como apresentado na Tabela 11.

Tabela 11 – Distribuição Numérica e Percentual de Gêneros e/ou Espécies da Família Enterobacteriaceae Isoladas das Diferentes Fontes de Isolamento (espécimes humanos e animais e do meio ambiente - água).

ESPÉCIES	Nº DE ISOLADOS (%)	Nº (%) POR GÊNERO/ESPÉCIE
Citrobacter spp.	22 (4,2)	48 (9,2)
Citrobacter freundii	26 (5)	
E.coli	170 (32,6)	170 (32,6)
Enterobacter spp.	89 (17)	119 (22,8)
Enterobacter aerogenes	1 (0,2)	
Enterobacter agglomerans	21 (4)	
Enterobacter cloacae	7 (1,3)	
Enterobacter sakazakii	1 (0,2)	
Hafnia alvei	6 (1,2)	6 (1,2)
Klebsiella spp.	27 (5,2)	62 (11,8)
Klebsiella oxytoca	5 (0,9)	
Klebsiella pneumoniae	30 (5,7)	
Proteus spp.	4 (0,7)	29 (5,5)
Proteus mirabilis	12 (2,3)	
Proteus vulgaris	13 (2,5)	
Salmonella spp.	52 (10)	52 (10)
Serratia spp.	19 (3,6)	21 (4)
Serratia rubidaea	2 (0,4)	
Sem identificação	15 (2,9)	15 (2,9)
TOTAL	522 (100)	522 (100)

As bactérias do grupo dos coliformes fecais são utilizadas para a avaliação das condições sanitárias da água, como indicadores de poluição fecal, devido a sua presença no trato gastrintestinal de humanos e de outros animais de sangue quente e sua eliminação em grande número pelas fezes, que podem conter micro-organismos patogênicos e tornarem-se veículos para transmissão de doenças[28].

A presença de coliformes é bastante relatada tanto em coproculturas, pois fazem parte da microbiota normal de humanos e animais, quanto no ambiente. É sabido que os micro-organismos quando em deposição na natureza podem interagir com sedimentos e que aqueles que são adsorvidos podem ser ressuspensos depois de uma tempestade[102, 103] e durante o aumento do fluxo de água[104]. Em alguns casos, estes sedimentos podem ser reservatórios de coliformes, dando-lhes a maior persistência no ambiente[104,105].

Em todos os pontos de coleta pesquisados, foi possível o isolamento de representantes da família Enterobacteriaceae, inclusive no poço artesiano da FUMDHAM com aproximadamente 800m de profundidade. É importante ressaltar que a análise deste ponto foi realizada da água contida no interior da caixa d´água do poço o que justifica o isolamento de amostras de *E. coli* neste ponto. Salienta-se a ausência de isolamento em qualquer dos espécimes analisados de amostras do gênero *Campylobacter*, importante enteropatógeno com ampla repercussão em Saúde Pública. Independente da fonte de isolamento, e do período de coleta, a não detecção deste gênero bacteriano não configura sua ausência no ambiente pesquisado.

Estudos recentes, como o realizado por Esteves *et al.*[90], relatam o isolamento de *Campylobacter* spp. a partir de amostras de água coletadas em rios e água de abastecimento. De acordo com os autores, os baixos índices de isolamento de *Campylobacter* spp. a partir da análise de amostras de água poderiam resultar da elevada sensibilidade destas bactérias a alterações ambientais, o que influenciaria a manutenção da viabilidade celular e resultaria na baixa recuperação das amostras durante o processamento das amostras em laboratório.

A água representa um poderoso meio de veiculação do gênero espécies de *Campylobacter*, ainda que esse ambiente se apresente, via de regra, inóspito para a bactéria[23] A presença deste micro-organismo em tal habitat pode ser utilizada como indicador biológico de contaminação fecal recente, já que o tempo de sobrevivência da bactéria neste ambiente é menor que indicadores bacterianos usuais[106].

Se o foco das atenções está voltado para os pontos de coleta e respectivos isolamentos, não se nota uma marcada discrepância quanto à frequência de isolamento das bactérias do

grupo de coliformes, embora seja importante destacar a presença de bactérias patogênicas, representadas pelo gênero *Salmonella*, provenientes principalmente de fonte ambiental e em áreas com relativa proximidade geográfica (Tabela 12).

A vigilância dos sorovares de *Salmonella* em ambientes aquáticos constitui um dos principais elementos do monitoramento das infecções humanas e animais[107, 108]. A grande diversidade de sorovares de *Salmonella* em ecossistemas aquáticos natural é resultante de diferentes fontes de contaminação, que incluem infecções humanas, animais domésticos, insetos, e particularmente os animais silvestres que agem, de fato, como importantes reservatórios na natureza[46, 47, 109].

Tabela 12 – Número e Percentual de Gêneros e/ou Espécies da Família Entrobacteriaceae Isoladas Oriundas das Diferentes Fontes de Isolamento e Pontos de Coleta nos Dois Períodos.

PONTOS	GÊNEROS / ESPÉCIES (N)						TOTAL	
	HUMANA		ANIMAL		AMBIENTAL		N	%
	JUNHO - 2012	JANEIRO – 2013	JUNHO - 2012	JANEIRO - 2013	JUNHO - 2012	JANEIRO – 2013		
Sítio do Mocó	*Citrobacter* spp. (3) *Citrobacter freundii* (5) *E.coli* (33) *Enterobacter* spp. (13) *Enterobacter cloacae* (1) *Klebsiella oxytoca* (2) *Klebsiella pneumoniae* (2) *Proteus* spp. (1) *Proteus mirabilis* (2) *Serratia* spp. (5) sem ident. (1)	*Citrobacter* spp. (2) *Citrobacter freundii (1)* *E.coli* (49) *Enterobacter* spp. (1) *Enterobacter agglomerans* (14) *Enterobacter sakazakii* (1) *Klebsiella oxytoca* (3) *Klebsiella pneumoniae (8)* *Proteus mirabilis* (2) *Proteus vulgaris* (2) *Salmonella* spp. (1) *Serratia* spp. (3) *Serratia rubidaea* (2) sem ident. (2)	*Klebsiella pneumoniae* (1) sem ident. (2)	*E.coli* (2) *Citrobacter freundii* (1) *Proteus mirabilis* (1)			166	32
Guarita Serra Vermelha			*Citrobacter* spp. (2) *E.coli* (4) *Enterobacter* spp. (4)	*Citrobacter* spp. (1) *E.coli* (3) *Enterobacter agglomerans* (1) *Enterobacter cloacae* (3)			18	3,7
Caldeirão do Museu – Anfiteatro					*E.coli* (2)	*Enterobacter agglomerans* (1) *Salmonella* spp. (4)	7	1,3
Caldeirão Cerâmica					*E.coli* (1) *Klebsiella* spp. (1)	*E.coli* (3) *Klebsiella* spp. (1) *Proteus vulgaris* (1)	7	1,3
Caldeirão do Alto da Serrinha					*E.coli* (1) *Serratia* spp. (1)	*Hafnia alvei* (2) *Proteus vulgaris* (1) *Enterobacter* spp. (1) *Enterobacter aerogenes* (1)	7	1,3

PONTOS	GÊNEROS / ESPÉCIES (N)						TOTAL	
	HUMANA		ANIMAL		AMBIENTAL			
	JUNHO - 2012	JANEIRO – 2013	JUNHO - 2012	JANEIRO – 2013	JUNHO - 2012	JANEIRO - 2013	N	%
Caldeirão Grotão da esperança					*Enterobacter* spp. (1) *Salmonella* spp. (2)	*Enterobacter* spp. (2) Serratia spp. (1)	6	1,1
Caldeirão da Esperança / Fazenda Esperança			*E.coli* (1) *Enterobacter* spp. (2) *Klebsiella pneumoniae* (1) sem ident. (1)	*E.coli* (5) *Enterobacter* spp. (1) *Klebsiella pneumoniae* (1)	*E.coli* (1)	*Salmonella* spp. (3)	16	4
Caldeirão do Vilmar - Cald. do Sítio do Meio					*E.coli* (1)	*Citrobacter freundii* (2) *Enterobacter* spp. (3)	6	1,1
Caldeirão BPF (Boqueirão da Pedra Furada)			*E.coli* (2) *Proteus* spp. (1)	*E.coli* (4) *Citrobacter* spp. (1)	*Enterobacter* spp. (2)	*Enterobacter cloacae* (3) *Proteus vulgaris* (4) *Enterobacter* spp. (2) *Enterobacter agglomerans* (3) *Salmonella* spp. (1)	23	5,2
Caldeirão Fundos do BPF					*Enterobacter* spp. (1) sem ident. (2)	*Enterobacter* spp. (1) sem ident. (1)	5	0,9
Caldeirão do Apertado					*Citrobacter* spp. (1)	*Enterobacter* spp. (2) *Proteus vulgaris* (1)	4	0,7
Caldeirão do Gado - Baixão das Mulheres				*E.coli* (1) *Proteus mirabilis* (1) *Salmonella* spp. (2)	*E.coli* (1) *Enterobacter* spp. (1) *Salmonella* spp. (1)	*Citrobacter freundii* (2) *E.coli* (1) *Hafnia alvei* (1) *Salmonella* spp. (3)	14	2,6
Poço Joãozinho da Borda (água de uso em geral)					*Citrobacter* spp. (1)	*E.coli* (1) *Enterobacter* spp. (1) *Klebsiella pneumoniae* (1)	4	0,7

PONTOS	GÊNEROS / ESPÉCIES (N)						TOTAL	
	HUMANA		ANIMAL		AMBIENTAL			
	JUNHO – 2012	JANEIRO – 2013	JUNHO - 2012	JANEIRO – 2013	JUNHO – 2012	JANEIRO – 2013	N	%
Poço Joãozinho da Borda (consumo de animais)					*Enterobacter* spp. (1) *Klebsiella* spp. (4) *Serratia* spp. (1)	*Enterobacter* spp. (2) *Enterobacter agglomerans* (1) *Klebsiella pneumoniae* (1)	10	1,9
Cisterna Joãozinho da Borda (consumo humano)					*E.coli* (1) *Klebsiella* spp. (1)	*E.coli* (1) *Serratia* spp. (1)	4	0,7
Cisterna da Lagoinha					*Klebsiella pneumoniae* (1)	*Citrobacter spp.* (1) *Enterobacter* spp. (1)	3	0,5
Barragem da Lagoinha					*Proteus vulgaris* (1) *Klebsiella* spp. (1)	*E.coli* (1) *Enterobacter* spp. (2) *Proteus mirabilis* (1)	6	1,1
Barragem da Veneza					*Citrobacter freundii* (1) *Enterobacter* spp. (1)	*E.coli* (2) *Klebsiella* spp. (1) *Proteus mirabilis* (1) *Serratia* spp. (1)	7	1,3
Caldeirão do Rogério					*Enterobacter* spp. (1) *Klebsiella* spp. (1)	*E.coli* (1) *Klebsiella* spp. (1) *Klebsiella pneumoniae* (1)	5	0,9
Barragem do Onça					*Enterobacter* spp. (1)	*Enterobacter* spp. (2) *Enterobacter agglomerans* (1) *Citrobacter freundii* (1) *Salmonella* spp. (2) *Proteus vulgaris* (1)	8	1,5
Barragem dos 80					*E.coli* (1)	*E.coli* (2) *Enterobacter* spp. (3) *Serratia* spp. (1)	7	1,3

PONTOS	GÊNEROS / ESPÉCIES (N)						TOTAL	
	HUMANA		ANIMAL		AMBIENTAL			
	JUNHO - 2012	JANEIRO – 2013	JUNHO - 2012	JANEIRO – 2013	JUNHO – 2012	JANEIRO – 2013	N	%
Baixão da Vaca					*Citrobacter freundii* (1) *E.coli* (2) *Salmonella* spp. (1)	*Enterobacter* spp. (2) *Proteus mirabilis* (2) *Salmonella* spp. (1)	9	1,7
Caldeirão do Paraguaio					*Citrobacter freundii* (1) *E.coli* (1) *Enterobacter* spp. (1) *Proteus spp*. (1) *Hafnia alvei* (1)	*Serratia* spp. (1) *E.coli* (2)	8	1,5
Caldeirão da beirada					*Serratia* spp. (1)	*Enterobacter* spp. (3) *Proteus mirabilis* (1) *Proteus vulgaris* (3)	8	1,5
Caldeirão do Veredão Paraguaio					*Enterobacter* spp. (1)	*Citrobacter freundii* (1)	2	0,3
Olho d'água do Cezario					*E.coli* (1)	*E.coli* (3) *Citrobacter freundii* (2) *Klebsiella pneumoniae* (2)	8	1,5
Barragem do Jenipapo					*Serratia* spp. (1)	*E.coli* (1) *Klebsiella pneumoniae* (4)	6	1,1
Barragem do Cambraia					*Enterobacter* spp. (1) *Salmonella* spp. (1)	*E.coli* (1) *Enterobacter* spp. (1) *Klebsiella pneumoniae* (1) *Serratia* spp. (1)	6	1,1
Poço do Morro do Severo					*Klebsiella* spp (1) *Serratia* spp. (1)	*Enterobacter* spp. (5) *Klebsiella* spp (1) *Klebsiella pneumoniae* (2) sem ident. (3)	13	2,4
Barragem do São João Vermelho					*Citrobacter freundii* (1) *Klebsiella* spp (1)	*E.coli* (2)	4	0,7

PONTOS	GÊNEROS / ESPÉCIES (N)						TOTAL	
	HUMANA		ANIMAL		AMBIENTAL			
	JUNHO – 2012	JANEIRO – 2013	JUNHO - 2012	JANEIRO – 2013	JUNHO - 2012	JANEIRO - 2013	N	%
Caldeirão do fundo do Boqueirão do Gongo					*Hafnia alvei* (1)	*E.coli* (1) *Enterobacter* spp. (2) *Klebsiella pneumoniae* (2)	6	1,1
Tanque de cimento do Gongo					*Citrobacter spp. (1)* *Salmonella* spp. (1)	*E.coli* (2) *Salmonella* spp. (7)	11	2,1
Olho d'água do Gongo					*E.coli* (1) Enterobacter spp. (1)	*E.coli* (3) *Klebsiella* spp (2) *Klebsiella pneumoniae* (1) *Enterobacter* spp. (1) *Salmonella* spp. (4)	13	2,4
Caldeirão/Olho d'água da Cacimba					*Citrobacter freundii* (2)	*Citrobacter* spp.(1) *E.coli* (2) *Enterobacter* spp. (2) *Klebsiella* spp (1) *Salmonella* spp. (3)	11	2,1
Olho d'água da Cocheira			*Enterobacter* spp. (1)		*Enterobacter* spp. (1)	*Citrobacter freundii* (4) *E.coli* (2) *Enterobacter* spp. (1) *Salmonella* spp. (5)	14	2,6
Caldeirão do Urubu					*Enterobacter* spp. (1) *Salmonella* spp. (2)	*E.coli* (2) *Enterobacter* spp. (1) *Klebsiella pneumoniae* (1) *Salmonella* spp. (4)	11	2,1
Zabelê					*E.coli* (1)	*E.coli* (2) *Enterobacter* spp. (1)	4	0,7

PONTOS	GÊNEROS / ESPÉCIES (N)						TOTAL	
	HUMANA		ANIMAL		AMBIENTAL			
	JUNHO – 2012	JANEIRO – 2013	JUNHO - 2012	JANEIRO – 2013	JUNHO - 2012	JANEIRO - 2013	N	%
Olho d'água da Serra Branca					*Enterobacter* spp. (1) *Klebsiella* spp (1)	*E.coli* (5) *Enterobacter* spp. (4) *Klebsiella* spp (1) *Hafnia alvei* (1) *Proteus* spp. *(1)* sem ident. (1)	15	2,8
Caldeirão/Olho d'água da Serra Branca					*Klebsiella* spp (1)	*Citrobacter* spp.(1)	2	0,3
Caldeirão do Nezinho					*Salmonella* spp. (1*)*	sem ident. (1) *E.coli* (2)	4	0,7
Caldeirão do Muriçoca					*Enterobacter* spp. (1)	*Citrobacter* spp.(2) *E.coli* (1) *Enterobacter* spp. (1) *Klebsiella* spp (2) *Salmonella* spp. (3)	10	1,9
Caldeirão das Andorinhas					*Citrobacter freundii* (1)	*Citrobacter* spp.(1)	2	0,3
Caldeirão da Barriguda					*E.coli* (2)	*Citrobacter* spp.(1) *E.coli* (1) *Enterobacter* spp. (4) *Klebsiella* spp (4)	12	2,2
Caldeirão do Perna					sem ident. (1)	*Citrobacter* spp.(1) *E.coli* (3)	5	0,9
Poço do FUMDHAM					*E.coli* (1)	*Citrobacter* spp.(2) *E.coli* (1) *Klebsiella* spp (1)	5	0,9

As pesquisas de *Salmonella* spp.em ecossistemas aquáticos realizadas em outros países mostram a importância do monitoramento ambiental para a vigilância das doenças de veiculação hídrica, pois indicam que as águas superficiais e esgotos são fontes potenciais de contaminação para o homem. Na Espanha, Martinez-Urtaza *et al*.[110], avaliaram 707 amostras de água do mar e obtiveram 2,5% de amostras positivas para *Salmonella* spp. A incidência de *Salmonella* spp. em água ofertada pelo sistema de abastecimento na Índia também apresentou percentuais baixos, sendo 3,3%, superior aos 36% relatados na Tailândia[111]. Por outro lado, um estudo realizado na Grécia por Arvanitidou *et al*. [112] identificou 27,4% de amostras positivas de *Salmonella* spp. em água coletada de rio, com maior prevalência nos meses quentes (41,4%) quando comparados com os meses frios (5,4%).

A presença de salmonelas em água no nosso país já foi evidenciada em vários locais. Costa GA & Hofer E[89], em 1972, já pesquisavam *Salmonella* spp. no esgoto da cidade do Rio de Janeiro. Ainda nesta cidade, Rodrigues *et al*.[113] identificaram 13,2% de salmonelas em 22 amostras isoladas de praias. Martins *et al*.[114] estudaram a presença do gênero *Salmonella* em ambientes aquáticos no Estado de São Paulo, e encontraram 51,7% de positividade em 412 amostras de praias e 27,1% em 214 amostras de água doce. Farias[115] isolou 221 cepas de *Salmonella* spp. de esgoto e córregos em São Paulo e obteve a identificação de 19 sorovares, sendo os mais freqüentes *S*. Panama, *S*. Infantis, *S*. Agona e *S*. Hadar. Em 2014, Palhares e colaboradores[102] coletaram 384 amostras do Rio Pinhal, no Rio Grande do Sul, em quatro anos de monitoramento, e isolaram *Salmonella spp*. em 241 amostras (62,7%). Neste estudo, os autores observaram que o maior número de salmonelas ocorreu em amostras associadas a locais com alta densidade animal por hectare, sendo possível demonstrar uma grande variabilidade de sorovares na área de estudo: foram encontrados 30 sorovares diferentes em pelo menos 11 pontos monitorados.

E, em se tratando da importância da presença deste micro-organismo para o ambiente, anfíbios e répteis são considerados reservatórios de uma ampla variedade de sorovares de *Salmonella*, sendo facilmente colonizados com transferência vertical e horizontal desse patógeno. Existem diversos relatos de anfíbios e répteis associados à transmissão de *Salmonella* spp. para os seres humanos, incriminando esta forma de transmissão como um importante problema de Saúde Pública e fazendo, inclusive, com que alguns países alterassem sua legislação para a proibição da importação destes animais[116, 117].

Os sorovares de *Salmonella* não tifóide têm uma ampla gama de hospedeiros,

incluindo ruminantes, aves e répteis, dado que trata-se de um patógeno ambiental bastante persistente e capaz de sobreviver e proliferar em diversos ambientes[118].

4.3. Avaliação da Suscetibilidade Bacteriana aos Antimicrobianos

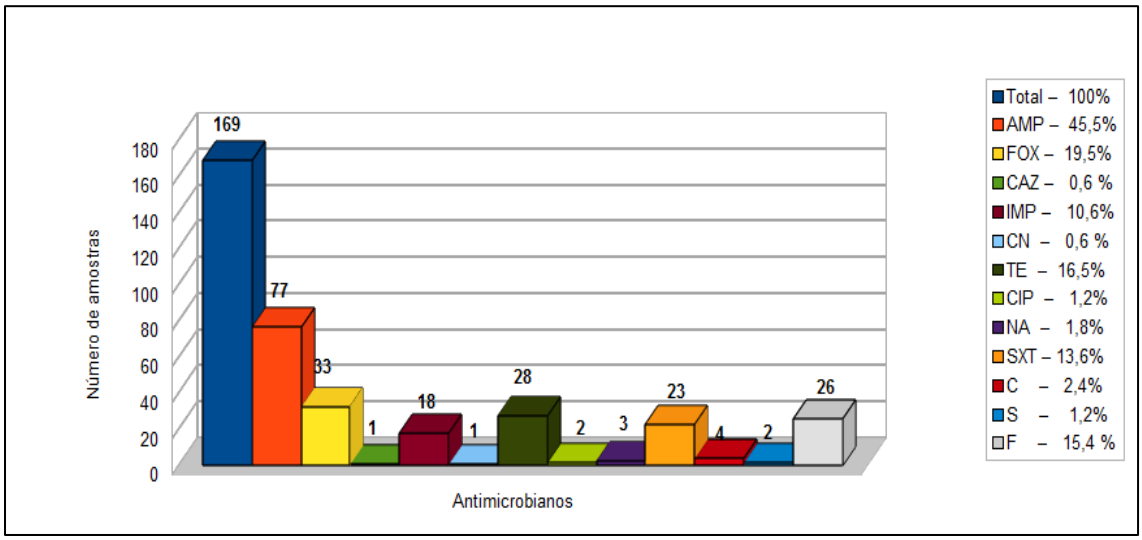
A resistência aos antibióticos observada em vários gêneros bacterianos representa um problema de Saúde Pública mundial. Segundo a WHO[119], seu aumento tem ocorrido de forma alarmante nos últimos anos, sendo estimado que, no futuro, o uso de fármacos para o tratamento de infecções possa resultar em perda de efetividade.

Na primeira etapa desta pesquisa, todos os isolados da família Enterobacteriaceae foram analisados frente a drogas antimicrobianas, resultando em diversos perfis de suscetibilidade, apresentados no Gráfico 2.

Do montante de 168 isolados, um grupo de 108 amostras representando 64% da amostragem apresentou alguma resistência a uma ou mais drogas, restando 61 amostras (36%) sensíveis a todos os antimicrobianos (Gráfico 3).

Quanto à avaliação da susceptibilidade aos antimicrobianos, no universo amostral analisado no primeiro período de coleta, as amostras apresentaram maior perfil de resistência para as drogas do grupo dos betalactâmicos como a penicilina (45,5%) e a cefalosporina de segunda geração - Cefoxitina (19,5%). Os próximos maiores percentuais de resistência a antimicrobianos foram observados para tetraciclina (16,5%), nitrofuranos (15,4%), antifolatos (13,6%), carbapenemas (10,6%), nesta ordem e menor percentual de resistência para fenicois (2,4%), quinolonas como ácido nalidíxico (1,8%) e ciprofloxacina (1,2%), aminoglicosídeo como estreptomicina (1,2%) e gentamicina (0,6%) e cefalosporina de terceira geração – Ceftazidima (0,6%).

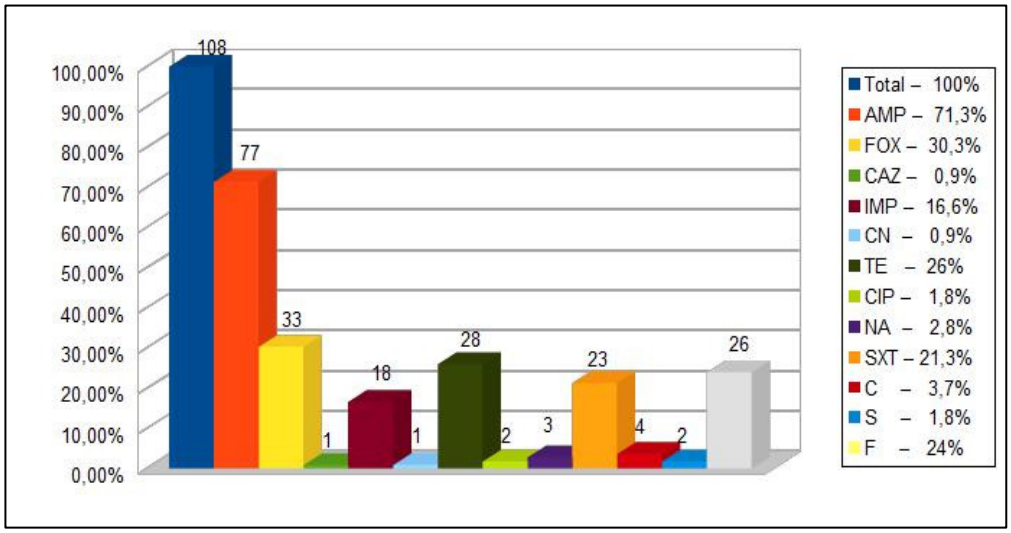
Gráfico 2 – Relação entre o Total de Isolados Bacterianos Analisados (n=169) e o Número de Isolados Bacterianos Resistentes a cada Antimicrobiano Testado (Junho/2012)**.**



Legenda: Ampicilina (AMP), Cefoxitina (FOX), Ceftazidina (CAZ), Imipenem (IMP), Gentamicina (CN), Tetraciclina (TE), Ciprofloxacina (CIP), Ácido Nalidíxico (NA), Sulfametoxazol-Trimetoprim (SXT), Cloranfenicol (C), Estreptomicina (S), Nitrofurantoína (F)

Das 108 amostras que representam 64% das amostras resistentes no primeiro período de coleta, no grupo dos betalactâmicos como a penicilina a resistência atingiu a 71,3%; cefoxitina (cefalosporina de segunda geração) 30,3%; tetraciclina 26%; nitrofuranos 24%; antifolatos 21,3%; carbapenemas 16,6%; e com menor percentual de resistência assinalam-se os fenicois 3,7%; quinolonas como o ácido nalidíxico 2,8%; ciprofloxacina 1,8%; aminoglicosídeos como estreptomicina 1,8%; gentamicina 0,9% e Ceftazidima 0,9% (cefalosporina de terceira geração) (Gráfico 3).

Gráfico 3 – Relação entre o Total de Isolados Bacterianos Resistentes (n=108) e o Número de Isolados Bacterianos Resistentes a cada Antimicrobiano Testado (Junho/2012)**.**



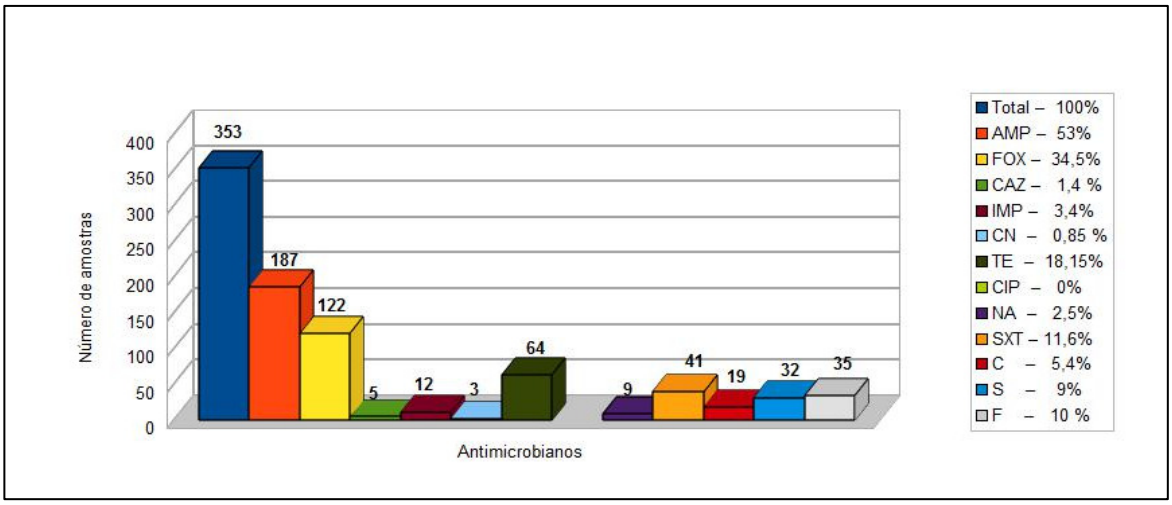
Legenda: Ampicilina (AMP), Cefoxitina (FOX), Ceftazidina (CAZ), Imipenem (IMP), Gentamicina (CN), Tetraciclina (TE), Ciprofloxacina (CIP), Ácido Nalidíxico (NA), Sulfametoxazol-Trimetoprim (SXT), Cloranfenicol (C), Estreptomicina (S), Nitrofurantoína (F)

Na segunda etapa, os isolados da família Enterobacteriaceae apresentaram a predominância de cepas resistentes sobre as sensíveis reproduzindo o mesmo quadro que foi obtido na primeira etapa (Gráfico 4).

Assim, dos 353 isolados, 252 amostras apresentaram alguma resistência a pelo menos uma das drogas testadas, diante das 101 amostras (29%) sensíveis aos antimicrobianos.

Os percentuais de resistência obtidos no segundo período de coleta apresentaram: predominância de amostras resistentes às drogas do grupo dos betalactâmicos como a penicilina (53%); e à cefoxitina, uma cefalosporina de segunda geração (34,5%); seguido de tetraciclina (18,5%); nitrofuranos (10%); antifolatos (11,6%) e aminoglicosídeo como estreptomicina (9%); fenicois (5,4%); carbapenes (3,4%); quinolonas como ácido nalidíxico (2,5%); cefalosporina de terceira geração como ceftazidima (1,4%); gentamicina (0,85%) e sensibilidade total para ciprofloxacina (Gráfico 4).

Gráfico 4 – Relação entre o Total de Isolados Bacterianos Analisados (n=353) e o Número de Isolados Bacterianos Resistentes a cada Antimicrobiano Testado (Janeiro/2013)**.**

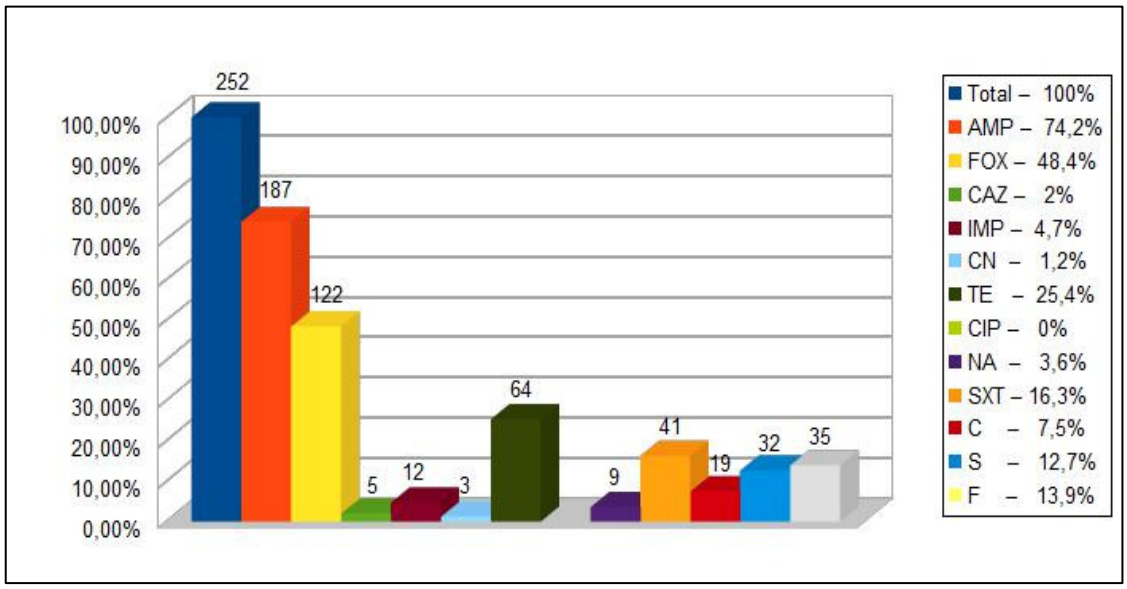


Legenda: Ampicilina (AMP), Cefoxitina (FOX), Ceftazidina (CAZ), Imipenem (IMP), Gentamicina (CN), Tetraciclina (TE), Ciprofloxacina (CIP), Ácido Nalidíxico (NA), Sulfametoxazol-Trimetoprim (SXT), Cloranfenicol (C), Estreptomicina (S), Nitrofurantoína (F)

Comparando-se os dois períodos de coleta, o percentual de resistência do segundo período registrou um aumento de amostras resistentes para determinadas drogas, como: penicilina, cefoxitina, tetraciclina, estreptomicina, fenicois, ácido nalidíxico, ceftazidima, gentamicina e declínio nas drogas dos grupos de nitrofuranos, antifolatos, carbapenemas e ciprofloxacina. Porém, o percentual de variação foi discreto, representando até 10% de alteração para mais ou para menos, exceto no caso da cefalosporina, que evidenciou um aumento de 15% de resistência no segundo período de coleta (Gráfico 5).

Das 252 que representam 71% das amostras resistentes no período da segunda coleta, nas drogas do grupo dos betalactâmicos como a penicilina se verificou 74,2% de cepas resistentes e em sequência registraram-se as resistências à cefoxitina (cefalosporina de segunda geração) 48,4%; tetraciclina 25,4%; antifolatos 16,3%; nitrofuranos 13,9%; aminoglicosídeo como estreptomicina 12,7%; fenicois 7,5%; carbapenemas 4,7%; quinolonas como ácido nalidíxico 3,6%; ceftazidima (cefalosporina de terceira geração) 2%; gentamicina 1,2% e total sensibilidade a ciprofloxacina (Gráfico 5).

Gráfico 5 – Número e Percentual de Resistência aos Antimicrobianos nas Amostras Coletadas no Período de Janeiro de 2013**.**



Legenda: Ampicilina (AMP), Cefoxitina (FOX), Ceftazidina (CAZ), Imipenem (IMP), Gentamicina (CN), Tetraciclina (TE), Ciprofloxacina (CIP), Ácido Nalidíxico (NA), Sulfametoxazol-Trimetoprim (SXT), Cloranfenicol (C), Estreptomicina (S), Nitrofurantoína (F)

De acordo com Tenover[120], as Enterobactérias são frequentemente sensíveis aos antimicrobianos testados, porém os gêneros *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp. e *Serratia* spp. podem apresentar resistência natural à Ampicilina, admitindo-se que esta pode ser a causa da elevada resistência detectada.

Não foram observadas diferenças de resistência a antimicrobianos entre as diferentes regiões geográficas estudadas. Também não observamos diferenças acentuadas de resistência a antimicrobianos entre as diferentes origens das amostras, assim como não foi possível associar os diferentes níveis de resistência aos fármacos a perfis específicos de resistência segundo os pontos de coleta.

Como apresentado na Tabela 10, podemos observar os percentuais de resistência aos antimicrobianos distribuídos por gênero e/ou espécie. Os maiores percentuais para um maior número de drogas são observados nas espécies *E. coli*, *Citrobacter* spp., *Proteus* spp. e *Klebsiella* spp.

O perfil de prevalência de resistência de *Salmonella* spp. encontrado neste estudo foi considerado baixo, e foi representado pelos seguintes percentuais: 7,7% Ampicilina; 3,8%

Cefoxitina; 1,9% Imipenem; 3,8% Sulfametaxazol-Trimetoprim; 1,9% Cloranfenicol; 1,9% Estreptomicina e 1,9% Nitrofurantoina.

Durante muitos anos, ampicilina, Sulfametaxazol-trimetoprim e cloranfenicol foram as drogas de escolha para o tratamento de infecções graves causadas por *Salmonella* spp., mas as taxas crescentes de resistência a esses agentes têm reduzido significativamente as suas eficácias. Subsequentemente, as cefalosporinas de terceira geração, devido às suas propriedades farmacodinâmicas, bem como os baixos níveis de resistência em *Salmonella* spp., estão sendo usados para tratar a salmonelose invasiva[121]. A ciprofloxacina também é, cada vez mais, utilizada com sucesso para o tratamento de salmonelose humanas em todo o mundo[121, 122], entretanto, nenhuma amostra foi resistente a esta droga, corroborando os dados relatados na literatura científica. A resistência à estreptomicina também tem sido observada e frequentemente relatada entre isolados de *Salmonella* spp., porém, apenas uma amostra (1,9%) das 52 isoladas foi resistente à estreptomicina neste estudo.

Tabela 13 – Nível de Resistência aos Antimicrobianos nas Amostras dos Gêneros/Espécies de Enterobactérias Isolados das Diferentes Fontes.

GÊNERO/ ESPÉCIE	ANTIMICROBIANOS																							
	AMP		FOX		CAZ		IMP		CN		TE		CIP		NA		SXT		C		S		F	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Citrobacter spp. (22)	9	40,9	6	27,3	0	0	1	4,5	0	0	5	22,7	1	4,5	0	0	1	4,5	3	13,6	1	4,5	4	18,2
Citrobacter freundii (26)	19	65,5	17	65,5	0	0	2	10,5	0	0	8	30,7	0	0	0	0	1	3,8	1	3,8	1	3,8	7	27
E.coli (170)	73	42,9	33	19,4	4	2,5	10	0,6	2	1,2	38	22,3	0	0	7	4,1	38	22,3	5	3	19	11,2	11	6,4
Enterobacter spp. (89)	55	61,8	38	42,6	0	0	7	7,8	1	1,1	7	7,8	1	1,1	0	0	1	1,1	0	0	2	2,2	17	19,1
Enterobacter aerogenes (1)	1	100	1	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Enterobacter agglomerans (21)	15	71,4	6	28,5	0	0	0	0	1	4,7	4	19	0	0	2	9,5	5	23,8	0	0	3	14,2	2	9,5
Enterobacter cloacae (7)	4	57	4	57,1	0	0	2	28,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	14,2	0	0
Enterobacter sakazakii (1)	1	100	1	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hafnia alvei (6)	2	33,3	2	33,3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	16,6	1	16,6	0	0	0	0	0	0
Klebsiella spp. (27)	20	74	13	48,1	1	3,7	1	3,7	0	0	1	3,7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	22,2
Klebsiella oxytoca (5)	5	100	1	20	0	0	0	0	0	0	2	40	0	0	0	0	2	40	0	0	0	0	0	0
Klebsiella pneumoniae (30)	25	83,3	2	6,6	1	3,3	0	0	0	0	7	23,3	0	0	0	0	5	16,6	1	3,3	0	0	3	10
Proteus spp. (4)	2	50	2	50	0	0	1	25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Proteus mirabilis (12)	3	25	3	25	0	0	0	0	0	0	8	66,6	0	0	0	0	5	41,6	4	13,3	3	25	5	41,6
Proteus vulgaris (13)	5	38,4	9	69,2	0	0	1	7,7	0	0	8	61,5	0	0	0	0	2	15,3	3	23	1	7,7	2	15,3
Salmonella spp. (52)	4	7,7	2	3,8	0	0	1	1,9	0	0	0	0	0	0	0	0	2	3,8	1	1,9	1	1,9	1	1,9
Serratia spp. (19)	10	52,6	7	36,8	0	0	3	15,7	0	0	4	21	0	0	1	5,2	1	5,2	3	15,7	2	10,5	2	10,5
Serratia rubidaea (2)	1	50	1	50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
sem identificação (15)	10	66,6	7	46,6	0	0	1	6,6	0	0	0	0	0	0	1	6,6	0	0	2	13,3	0	0	1	6,6
Total (522)	264	50,5	155	29,7	6	1,1	30	5,74	4	0,7	92	17,6	2	0,3	12	2,3	64	12,2	23	4,4	34	6,5	61	11,6

Legenda: Ampicilina (AMP), Cefoxitina (FOX), Ceftazidina (CAZ), Imipenem (IMP), Gentamicina (CN), Tetraciclina (TE), Ciprofloxacina (CIP), Ácido Nalidíxico (NA), Sulfametoxazol-Trimetoprim (SXT), Cloranfenicol (C), Estreptomicina (S), Nitrofurantoína (F).

Há diversos relatos de perfis de resistência de *Salmonella* spp. na literatura nacional e internacional. Um estudo recente[123] observou que 18% das amostras isoladas de diversas fontes apresentaram resistência a dois ou mais antimicrobianos, com maior percentual de resistência para sulfametoxazol-trimetoprim, tetraciclina e estreptomicina, enquanto que a resistência à ciprofloxacina apresentou percentual menor.

Entre salmonelas isoladas de suinos em 2009, a resistência foi comumente observada à tetraciclina (78,7%), sulfonamidas (76,6%), estreptomicina (42,6%) e cloranfenicol (36,2%), enquanto salmonelas isoladas de patos apresentaram altas taxas de resistência a sulfafurazol (92,9%), e baixas taxas de resistência a sulfametoxazol- trimetoprim (3,6%). Para as salmonelas de origem de frango, foi observado 100% de resistência ao ácido nalidíxico, enquanto a resistência a outros agentes foi relativamente baixa (intervalo: 6,1% para 19,3%)[124].

Um aumento na incidência contínua de resistência a ácido nalidíxico em *Salmonella* Enteritidis de origem alimentar e de origem fecal humana, associadas a surtos gastrointestinais, é observada no Brasil. Estudos publicados com isolados de diferentes partes do país mostraram a resistência prevalente em ácido nalidíxico de 0,8%, 22% e 42% durante os períodos de 1985-1999, 2001-2002 e 2002-2006, respectivamente[123].

Uma alta porcentagem de cepas de *Salmonella* spp. resistentes aos antibióticos utilizados na criação de suínos tem sido demonstrada no Brasil. Kich *et al*.[125] descobriram que 83% das estirpes de *Salmonella* foram resistentes a pelo menos um antibiótico testado e 43% eram resistentes a quatro ou mais antibióticos.

A resistência a mais de um antibiótico também foi encontrada em nosso estudo. Das 360 amostras (100%) que apresentaram alguma resistência às drogas testadas, 251 (69,7%) apresentaram resistência a mais de uma droga, caracterizando multirresistência (MR). Neste universo amostral, aquelas de origem ambiental revelaram maior diversidade e maior percentual de padrões de multirresistência quando confrontados aos isolados de origem humana e animal.

A circulação de bactérias multirresistentes pertencentes à família Enterobacteriaceae é uma grande preocupação para a Saúde Pública, pois estes micro-organismos desempenham papéis importantes como agentes etiológicos em ambientes hospitalares, comunitários e mesmo em ambientes naturais[123].

Os aminoglicosídeos têm sido considerados uma alternativa para tratar infecções causadas por Enterobacteriaceae resistente a múltiplas drogas, em associação ou não com

outros antimicrobianos. Neste caso, a amicacina é especialmente importante, já que a resistência à gentamicina é disseminada[126]. De fato, as taxas de resistência à gentamicina são elevadas, com 45% para *K. pneumoniae* e 35% para *Enterobacter* spp., sendo relatadas respectivamente no Chile e Argentina[127].

Taxas de resistência à Amicacina entre Enterobacteriaceae costumavam ser inferior a 10%. Portanto é importante destacar o uso prudente de aminoglicosídeos, a fim de preservar a sua efetiva aplicação nos próximos anos na América do Sul. A consequência desse cenário no contexto da resistência antimicrobiana é a criação de um círculo vicioso em que o aumento da transmissão dos patógenos resistentes favorece a disseminação de infecções difíceis de tratar, aumenta o tempo de internação de pacientes infectados, fomenta o uso de grandes quantidades de agentes antimicrobianos que, por sua vez, seleciona aqueles organismos com maior arsenal de mecanismo de resistência.

Estudos realizados no Brasil no período entre 1986 e 2010, demostram que em 128 amostras de *Salmonella* ser. Enteritidis isoladas de alimentos e fezes humanas, quase um terço dos isolados foi resistente a ácido nalidíxico[128]. Neste caso, não só a expansão clonal, mas também a propagação de plasmídeo tem sido responsável por esse aumento na resistência e, considerando que os dados de resistência a quinolonas apresentados são provavelmente subestimados, é razoável prever que, em poucos anos determinantes mediados por plasmídeo também vão desempenhar um papel na resistência às quinolonas observados em isolados clínicos de *Salmonella* spp. na América do Sul.

Wheeler *et al.*[129] realizaram um estudo com isolados a partir de fezes de répteis e de água do mar em que conclui que bactérias resistentes a antimicrobianos foram mais comumente obtidas a partir de locais com impactos antrópicos do que em locais mais isolados ou protegidos.

A contaminação do ambiente por agentes antimicrobianos também pode surgir devido ao descarte de esgoto, principalmente dos hospitais, mas também de ambientes domésticos e industriais[130]. O efluente hospitalar é especialmente prejudicial, uma vez que contém uma contagem significativa de bactérias multirresistentes em conjunto com antibióticos de largo espectro e muitas vezes é descartado em matrizes aquáticas sem tratamento[131, 132]. Portanto, os sistemas de saneamento frágeis constituem outro fator antropogênico importante favorecendo a evolução da resistência antimicrobiana[133].

Tabela 14 – Perfis de Resistência Distribuídos pelas Fontes de Isolamento e Respectivos Pontos de Coleta.

PERFIS	LOCAL			N	%
	HUMANA	ANIMAL	AMBIENTAL		
AMP + FOX	S. Mocó (10)	Guarita Serra Vermelha (2) Caldeirão do Gado (2) Fazenda Esperança (2) S. Mocó (1)	Caldeirão Cerâmica (2) Caldeirão do Alto da Serrinha (2) Caldeirão Grotão da esperança (1) Caldeirão do Vilmar/ Cald. do Sítio do Meio (3) Caldeirão BPF (2) Caldeirão Fundos do BPF (2) Caldeirão do Apertado (2) Caldeirão do Gado - Baixão das Mulheres (2) Poço Joãozinho da Borda (3) Barragem do Onça (2) Barragem dos 80 (1) Baixão da Vaca (2) Caldeirão do Veredão Paraguaio (2) Caldeirão da beirada (2) Poço do Morro do Sereno (2) Barragem do São João Vermelho (1) Tanque de cimento do Gongo (2) Olho d'água do Gongo (1) Caldeirão/Olho d'água da Cacimba (3) Olho d'água da Cocheira (4) Caldeirão do Urubu (1) Olho d'água da Serra Branca (3) Caldeirão do Nezinho (1) Caldeirão do Muriçoca (2) Caldeirão da Barriguda (1) Caldeirão do Perna (1) Cisterna Joãozinho da Borda (1) Barragem da Veneza (1) Barragem do Cambraia (1) Boqueirão das Andorinhas (1)	71	28,2
AMP + CAZ	S. Mocó (1)	S. Mocó (1)		2	0,8
AMP + IMP	S. Mocó (2)		Caldeirão BPF (2) Olho d'água da Serra Branca (1) Caldeirão da Barriguda (1) Baixão da Vaca (3) Caldeirão do Veredão Paraguaio (2) Caldeirão do Nezinho (1)	12	4,7
AMP + CN			Barragem do Jenipapo (1)	1	0,4
AMP + TE	S. Mocó (4)	Boqueirão da Pedra Furada (1)	Poço Joãozinho da Borda (1)	6	2,3
AMP + C			Caldeirão do Muriçoca (1)	1	0,4
AMP + SXT	S. Mocó (3)			3	1,2
AMP +F	S. Mocó (1)		Caldeirão Cerâmica (1) Caldeirão BPF (1) Olho d'água do Cezario (2) Barragem do Jenipapo (2) Caldeirão do fundo do Boqueirão do Gongo (2) Poço Joãozinho da Borda (1) Barragem do Onça (1) Olho d'água do Gongo (1) Caldeirão/Olho d'água da Cacimba (1) Olho d'água da Cocheira (1)	14	5,5
AMP +S			Barragem do Onça (1) Caldeirão do Gado - Baixão das Mulheres (1)	2	0,8
FOX + S			Caldeirão do Alto da Serrinha (2) Olho d'água do Cezario (1)	3	1,2
FOX + F			Caldeirão da beirada (1) Poço do Morro do Sereno (1)	2	0,8
IMP + SXT	S. Mocó (1)			1	0,4
CN +SXT	S. Mocó (1)			1	0,4

PERFIS	LOCAL			N	%
	HUMANA	ANIMAL	AMBIENTAL		
TE + SXT	S. Mocó (4)	Guarita Serra Vermelha (1) Boqueirão da Pedra Furada (1)		6	2,4
TE + F			Caldeirão/Olho d'água da Cacimba (1) Poço do FUMDHAM (1) Caldeirão do Alto da Serrinha (1) Caldeirão do Veredão Paraguaio (1) Barragem do São João Vermelho (1) Olho d'água do Gongo (1) Caldeirão do Muriçoca (1)	7	2,7
C + F			Caldeirão da beirada (1)	1	0,4
CIP + F			Caldeirão/Olho d'água da Cacimba (1)	1	0,4
AMP + FOX +IMP	S. Mocó (2)	Boqueirão da Pedra Furada (1)	Poço Joãozinho da Borda (3)	6	2,4
AMP + FOX + CN			Caldeirão da Barriguda (1)	1	0,4
AMP + FOX + TE			Caldeirão BPF (1)	1	0,4
AMP + FOX + F	S. Mocó (4)		Caldeirão do Museu/ Anfiteatro (1) Cisterna Joãozinho da Borda (1) Barragem da Lagoinha (1) Barragem da Veneza (3) Barragem dos 80 (2) Caldeirão da beirada (2) Barragem do Cambraia (1) Caldeirão/Olho d'água da Cacimba (1) Olho d'água da Cocheira (2) Caldeirão do Urubu (1) Olho d'água da Serra Branca (3) Caldeirão do Nezinho (1) Caldeirão da Barriguda (4) Caldeirão Fundos do BPF (1) Barragem do São João Vermelho (1)	29	11,5
AMP + FOX + CIP			Tanque de cimento do Gongo (1)	1	0,4
AMP + CAZ + F			Olho d'água do Cezario (1)	1	0,4
AMP + TE + SXT	S. Mocó (7)	Fazenda Esperança (1) S. Mocó (1)		9	3,6
AMP + TE + F	S. Mocó (1)		Caldeirão Cerâmica (1) Olho d'água do Cezario (1) Zabelê (1)	4	1,6
AMP + SXT +S	S. Mocó (4)			4	1,6
AMP + SXT +C	S. Mocó (2)			2	0,8
FOX + TE + F			Caldeirão do Apertado (1) Caldeirão da beirada (1) Poço do FUMDHAM (1)	3	1,2
IMP + TE + F			Baixão da Vaca (1)	1	0,4
TE + SXT + S	S. Mocó (1)		-	1	0,4
TE + C + F			Caldeirão/Olho d'água da Cacimba (1) Poço do Morro do Sereno (1)	2	0,8
AMP + FOX + C + F			Zabelê (1) Olho d'água da Serra Branca (1) Caldeirão do Nezinho (1)	3	1,2
AMP + FOX + TE + F			Caldeirão BPF (1) Caldeirão da beirada (2) Olho d'água da Cocheira (1)	4	1,6
AMP + FOX + NA + SXT			Caldeirão do Veredão Paraguaio (1)	1	0,4
AMP + FOX + IMP + TE			Barragem dos 80 (1)	1	0,4
AMP + IMP + TE + SXT	S. Mocó (1)			1	0,4
AMP + IMP + TE + F			Caldeirão do Gado - Baixão das Mulheres (1)	1	0,4
AMP + NA + SXT + C			Poço do FUMDHAM (1)	1	0,4
TE + NA + STX + S	S. Mocó (1)			1	0,4
TE + SXT + C + S	S. Mocó (1)	S. Mocó (1)	Barragem da Lagoinha (1)	3	1,2
TE + SXT + C + F			Barragem do Onça (1)	1	0,4
AMP + TE + NA + SXT	S. Mocó (2)			2	0,8
AMP + TE + SXT + C	S. Mocó (1)		Caldeirão do Perna (1)	2	0,8
AMP + TE + C + F			Caldeirão do Apertado (1)	1	0,4
AMP + TE + SXT + S	S. Mocó (12)			12	4,8
FOX + TE + SXT + F			Caldeirão do Vilmar/ Cald. do Sítio do Meio (1)	1	0,4

PERFIS	LOCAL			N	%
	HUMANA	ANIMAL	AMBIENTAL		
CAZ + TE + C + F			Caldeirão do Vilmar/ Cald. do Sítio do Meio (1)	1	0,4
AMP + FOZ + CAZ + IMP + SXT	S. Mocó (1)			1	0,4
AMP +IMP +TE + S +F			Caldeirão Grotão da esperança (1) Barragem dos 80 (1)	2	0,8
AMP + FOX + NA + C + S			Poço do Morro do Sereno (1)	1	0,4
AMP + TE + NA + C + S	S. Mocó (1)			1	0,4
AMP + TE + NA + SXT + S	S. Mocó (1)			1	0,4
AMP + FOZ +NA + SXT + F			Zabelê (1)	1	0,4
AMP + FOZ +TE + S +F			Baixão da Vaca (1)	1	0,4
AMP + FOZ +TE + C +F			Barragem da Lagoinha (1)	1	0,4
AMP + FOZ +SXT + C + S	S. Mocó (1)			1	0,4
AMP + FOZ +CAZ +C + F			Caldeirão do Perna (1)	1	0,4
TE + SXT + C + S +F	S. Mocó (1)			1	0,4
CAZ + TE + SXT + C + F			Caldeirão BPF (1)	1	0,4
AMP + FOX + IMP +TE + C +F			Caldeirão da beirada (1)	1	0,4
AMP + FOX + NA + SXT + C + F			Barragem do Cambraia (1)	1	0,4
FOX + IMP +TE + SXT + S +F			Baixão da Vaca (1)	1	0,4
Amostras com alguma resistência N= 360 (100%)	50 (13,8%)	6 (1,6%)	83 (23%)	251 (69,7%)	

Nas 251 amostras (69,7%) que apresentaram o perfil de multirresistência (MR) a diferentes antimicrobianos (de 2 até 6 antimicrobianos), os associados com maior frequência foram ampicilina, cefoxitina, imipenem, sulfametoxazol-trimetoprim, tetraciclina e nitrofurantoina, todos representantes de classes diferentes de antimicrobianos. Ao todo, foram observados mais de 60 perfis de resistência a antimicrobianos nos isolados (Tabela 14).

Nos últimos anos, a evolução da resistência aos antimicrobianos vem sendo evidenciada em *Salmonella* spp., resultado, em boa parte, do uso indiscriminado de drogas antimicrobianas na medicina humana e animal. Estes fármacos são utilizados no tratamento de infecções no homem, plantas e animais, bem como, profilaticamente para prevenir infecções, administradas em baixas doses na alimentação animal, para melhoria da taxa de crescimento e conversão alimentar. Uma consequência indesejável de seu uso é o potencial desenvolvimento de resistência antimicrobiana em patógenos e a subsequente transmissão ao homem[118].

Este resultado pode ser consequência da emissão crescente de antibióticos no ambiente devido ao seu uso indiscriminado na medicina e na veterinária, além da agricultura. A poluição dos rios, uma das principais fontes de água para consumo humano e animal, pode desempenhar um importante papel contribuindo para a seleção e a disseminação das bactérias resistentes aos antibióticos, caracterizando um grave problema de Saúde Pública, incluindo a eliminação das drogas através dos efluentes das estações de tratamento de esgotos no meio urbano. Uma boa parcela desses efluentes são lançados *in natura* em mananciais aquíferos, bem como nos oceanos[120].

Ambientes contaminados, acompanhados da falta de saneamento e abastecimento de

água potável, favorecem a propagação de bactérias resistentes a antimicrobianos em toda a comunidade. Alguns estudos relatam o isolamento de populações bacterianas resistentes a antibióticos em ambientes impactados pela liberação de substâncias químicas nocivas e resíduos de produtos biológicos, a partir de residências, hospitais e indústrias[66, 134, 135]. Além disso, os genes que codificam a resistência múltipla a antimicrobianos têm sido identificados em uma ampla gama de hospedeiros, presentes em plasmídeos conjugativos[135].

A aquisição de plasmídeos pelas comunidades bacterianas ambientais pode desempenhar um papel importante na adaptação microbiana em ambientes impactados por atividades antropogênicas. Genes carreados por estes plasmidios podem conferir resistência a antibióticos presentes no ambiente, resultando em um mosaico de elementos genéticos móveis e a seleção de subpopulações bacterianas multirresistentes em resposta a pressão seletiva exercida[66].

Por isso, quando plasmídeos de resistência são introduzidos em comunidades microbianas ambientais, existe a possibilidade de bactérias patogênicas presentes adquirirem estes genes de resistência, resultando em patógenos humanos e animais resistentes a antibioticoterapia e representando um risco elevado para a saúde da população.

Em muitos casos, há ocorrência da resistência múltipla e mediada por plasmídeos, tornando a bactéria resistente a dois ou mais antibióticos, simultaneamente. Isso pode ser explicado pela localização comum de genes de resistência para diferentes antibióticos no mesmo plasmídeo ou pela presença de mais de um plasmídeo na célula bacteriana, que podem ser transferidos entre bactérias de grupos taxonômicos diferentes e disseminar suas características de resistência a antibióticos promovendo uma seleção de amostras resistentes em diferentes ecossistemas. Por exemplo, a principal forma de resistência das bactérias Gram-negativas aos aminoglicosídeos, às tetraciclinas, ao cloranfenicol e ao sulfametoxazol-trimetoprim é mediada por plasmídeos[28].

4.4. Identificação dos Sorovares de *Salmonella* Isolados

A vigilância dos sorovares de *Salmonella* em ambientes aquáticos constitui um dos principais elementos do monitoramento das infecções humanas e animais

As salmoneloses constituem um dos maiores problemas de Saúde Pública, pois a maioria dos sorovares atingem indistintamente o homem e os animais de sangue quente, propagando-se pela contaminação de alimentos de origem animal e seus derivados, ou ainda pela contaminação da água, que desenvolvem manifestações clínicas de gastrenterite (enterocolite) e infecção alimentar[58].

Das 522 amostras pertencentes à família Enterobacteriaceae, 52 (10%) se caracterizam no gênero *Salmonella*. No grupo de amostras provenientes do primeiro período de coleta, não foi detectado este patógeno nos espécimes clínicos (fezes). Em contraposição, da fonte ambiental, nove isolados foram obtidos de diferentes pontos de coleta cujo perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos foi realizado (Tabela 15).

Tabela 15 – Isolados Ambientais de *Salmonella* spp. Provenientes do Período de Junho de 2012, Distribuídos pelos Pontos de Coleta e a Respectiva Suscetibilidade Antimicrobiana.

Nº DA AMOSTRA	PONTOS DE COLETA	SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS			
		AMP	IMP	NA	SXT
J 97	Caldeirão Grotão da esperança	S	S	S	R
J 98	Caldeirão Grotão da esperança	S	S	I	S
J 108	Caldeirão do Gado - Baixão das Mulheres	S	S	S	S
J 112	Baixão da Vaca	R	R	S	S
J 113	Barragem do Cambraia	S	S	S	S
J 127	Tanque de cimento do Gongo	S	I	S	S
J 138	Caldeirão do Nezinho	R	S	S	S
J 161	Caldeirão do Urubu	S	S	S	S
J 162	Caldeirão do Urubu	S	S	S	S

Legenda: S – Sensível; I – Intermediário; R – Resistente; **AMP** - Ampicilina, **IMP** - Imipenem, **NA** - Ácido Nalidíxico, **SXT** - Sulfametoxazol-Trimetoprim

Na amostragem proveniente da coleta realizada em janeiro de 2013, obteve-se 43 isolados de *Salmonella* spp., caracterizados em sorovares oriundos das fontes humana (1 isolado), animal (2 isolados) e ambiental (40 isolados). Estas amostras pertencem a 11 sorovares distintos: Worthington, Panama, Brooklyn, Glasgow, Braenderup, Isangi, Grumpensis, Rubislaw, Miami, Cerro e Thompson. Todas as amostras foram analisadas pela técnica de PFGE, com o objetivo de comparar os perfis filogenéticos e estabelecer relações

entre eles. Duas amostras de *Salmonella. enterica* subsp. houtenae foram isolada mas não foi possível a analise filogenética utilizando PFGE pois um dos isolado do mesmo grupo não se prestou análise para utilizarmos como parâmetro de comparação (Tabela 16).

Tabela 16 – Sorovares de *Salmonella* Isolados de Diferentes Fontes no Período de Janeiro de 2013 Analisados pela Técnica PFGE e a Respectiva Suscetibilidade aos Antimicrobianos.

SOROVAR	ORIGEM	PONTO DE COLETA	ANÁLISE PFGE	SUSCETIBILIDADE					
				AMP	FOX	NA	C	S	F
L 4 *S.*Worthington	Humana	Sítio do Mocó	100% de homologia com amostra do mesmo sorovar	S	**R**	S	S	S	S
L 17 *S.*Worthington	Animal	Caldeirão do Gado - Baixão das Mulheres	100% de homologia com amostra do mesmo sorovar	S	S	S	S	S	S
L 18 *S.*Panama	Animal	Caldeirão do Gado - Baixão das Mulheres	100% de homologia com amostras do mesmo sorovar isoladas da Barragem do Onça	S	S	S	S	I	S
L 108 *S.*Brooklyn	Ambiental	Caldeirão do Museu/ Anfiteatro	100% de homologia entre as amostras do mesmo sorovar	S	S	S	S	S	S
L 109 *S.*Brooklyn	Ambiental	Caldeirão do Museu/ Anfiteatro	100% de homologia entre as amostras do mesmo sorovar	S	S	S	S	S	S
L 110 *S.*Brooklyn	Ambiental	Caldeirão do Museu/ Anfiteatro	100% de homologia entre as amostras do mesmo sorovar	S	S	S	S	S	S
L 111 *S.*Brooklyn	Ambiental	Caldeirão do Museu/ Anfiteatro	100% de homologia entre as amostras do mesmo sorovar	S	S	S	S	S	S
L 145 – *S.*Glasgow	Ambiental	Caldeirão Grotão da esperança	50% de homologia entre as amostras do mesmo sorovar	S	S	S	S	S	S
L 146 – *S.*Braenderup	Ambiental	Caldeirão Grotão da esperança	100% de homologia entre as amostras do mesmo sorovar	S	S	S	S	S	S
L 150 – *S.*Braenderup	Ambiental	Caldeirão Grotão da esperança	100% de homologia entre as amostras do mesmo sorovar	S	S	S	S	S	S
L 164 – *S.*Glasgow	Ambiental	Caldeirão do BPF	82% de homologia entre as amostras do mesmo sorovar	S	S	S	S	S	S
L 185 – *S.*Isangi	Ambiental	Caldeirão do Gado - Baixão das Mulheres	100% de homologia com amostra L355 do caldeirão do Urubu	S	S	S	S	**R**	S
L 186 – *S.*Isangi	Ambiental	Caldeirão do Gado - Baixão das Mulheres	100% de homologia com amostra L355 do caldeirão do Urubu	S	S	S	S	I	S
L 187 – *S.* subsp. houtenae	Ambiental	Caldeirão do Gado - Baixão das Mulheres	Não tipável	S	S	S	S	I	S
L 225 *S.*Panama	Ambiental	Barragem do Onça	100% de homologia com amostras Panama isoladas de animal	S	S	S	S	S	S
L 228 *S.*Panama	Ambiental	Barragem do Onça	100% de homologia com amostras Panama isoladas de animal	S	S	S	S	S	S
L 249 *S.*Glasgow	Ambiental	Baixão da Vaca	100% de homologia com amostras do mesmo sorovar isoladas do tanque do Gongo	S	S	S	S	I	S
L 309 *S.*Isangi	Ambiental	Tanque de cimento do Gongo	90% de homologia com amostras de mesmo sorovar do caldeirão do Urubu	S	S	S	S	S	S

SOROVAR	ORIGEM	PONTO DE COLETA	ANÁLISE PFGE	SUSCETIBILIDADE					
				AMP	FOX	NA	C	S	F
L 310 *S.*Grumpensis	Ambiental	Tanque de cimento do Gongo	100% de homologia com amostras de mesmo sorovar do olho d'água do Gongo	S	S	S	S	S	S
L 311 *S.*Glasgow	Ambiental	Tanque de cimento do Gongo	100% de homologia com amostras do mesmo sorovar isoladas do Baixão da Vaca	S	S	S	S	S	S
L 312 *S.* subsp. houtenae	Ambiental	Tanque de cimento do Gongo	Sem parêmrtro para comparação	S	S	S	S	S	I
L 313 *S.*Isangi	Ambiental	Tanque de cimento do Gongo	80% de homologia com amostras de mesmo sorovar do caldeirão do Urubu	S	S	S	S	S	S
L 314 *S.*Rubislaw	Ambiental	Tanque de cimento do Gongo	95% de homologia com amostras de mesmo sorovar	S	S	S	S	S	S
L 315 *S.*Rubislaw	Ambiental	Tanque de cimento do Gongo	95% de homologia com amostras de mesmo sorovar	S	S	S	S	S	I
L 323 *S.*Grumpensis	Ambiental	Olho d'água do Gongo	100% de homologia com amostras de mesmo sorovar do Tanque de cimento do Gongo	S	S	S	S	S	S
L 324 *S.*Miami	Ambiental	Olho d'água do Gongo	100% de homologia com amostras de mesmo sorovar do Tanque de cimento do Gongo	S	S	S	S	S	S
L 325 *S.*Grumpensis	Ambiental	Olho d'água do Gongo	100% de homologia com amostras de mesmo sorovar do Tanque de cimento do Gongo	S	S	S	S	I	S
L 326 *S.*Miami	Ambiental	Olho d'água do Gongo	94% de homologia com amostras de mesmo sorovar	S	S	S	S	S	S
L 327 *S.*Cerro	Ambiental	Caldeirão/Olho d'água da Cacimba	100% de homologia com amostras de mesmo sorovar	S	S	S	S	S	S
L 328 *S.*Cerro	Ambiental	Caldeirão/Olho d'água da Cacimba	100% de homologia com amostras de mesmo sorovar	S	S	S	S	S	S
L 334 *S.*Cerro	Ambiental	Caldeirão/Olho d'água da Cacimba	100% de homologia com amostras de mesmo sorovar	S	S	S	S	S	**R**
L 343 *S.*Thompson	Ambiental	Olho d'água da Cocheira	55% de homologia com amostras de mesmo sorovar	S	S	S	S	S	S
L 344 *S.*Thompson	Ambiental	Olho d'água da Cocheira	96% de homologia com amostras de mesmo sorovar L345 e L346	S	S	S	S	S	S
L 345 *S.*Thompson	Ambiental	Olho d'água da Cocheira	96% de homologia com amostras de mesmo sorovar L344 e L346	S	S	S	S	S	S
L 346 *S.*Thompson	Ambiental	Olho d'água da Cocheira	96% de homologia com amostras de mesmo sorovar L344 e L345	S	S	S	S	S	S
L 347 *S.*Thompson	Ambiental	Olho d'água da Cocheira	55% de homologia com amostras de mesmo sorovar	S	S	S	S	S	S
L 355 *S.*Isangi	Ambiental	Caldeirão do Urubu	100% de similaridade com amostras de mesmo sorovar do Caldeirão do Gado/Baixão das Mulheres	S	S	S	S	S	S
L 356 *S.*Isangi	Ambiental	Caldeirão do Urubu	95% de similaridade com amostras L357	S	S	S	S	I	S

SOROVAR	ORIGEM	PONTO DE COLETA	ANÁLISE PFGE	SUSCETIBILIDADE					
				AMP	FOX	NA	C	S	F
L 357 *S.*Isangi	Ambiental	Caldeirão do Urubu	95% de similaridade com amostras L356	S	S	S	S	S	S
L 358 *S.*Cerro	Ambiental	Caldeirão do Urubu	100% de homologia com amostras de mesmo sorovar isoladas do Caldeirão/Olho d'água da Cacimba	S	S	I	S	S	S
L 385 *S.*Panama	Ambiental	Caldeirão do Muriçoca	93% de homologia com amostras do mesmo ponto de coleta	S	S	S	S	S	S
L 389 *S.*Panama	Ambiental	Caldeirão do Muriçoca	93% de homologia com amostras do mesmo ponto de coleta	**R**	S	S	**R**	S	S
L 390 *S.*Panama	Ambiental	Caldeirão do Muriçoca	Não tipável	S	S	S	S	S	S

Legenda: S - Sensível; I - Intermediário; R - Resistente; **AMP** - Ampicilina, **FOX** - Cefoxitina, **NA** - Ácido Nalidíxico, **C** - Cloranfenicol, **S** - Estreptomicina, **F** - Nitrofurantoína

No Brasil, o histórico epidemiológico das salmonelas é caracterizado pelo predomínio de alguns sorovares, cujo padrão pode variar de uma região para outra. *Salmonella* ser. Typhimurium e Panamá são os sorovares mais prevalentes isolados de animais em trabalhos nacionais, porém os sorovares Infantis e Derby também ocorrem com bastante frequência[108].

Economou *et al.*[136] realizaram um estudo durante um período de 12 meses (junho de 2007 a maio de 2008), sobre a prevalência e a susceptibilidade de sorovares de *Salmonella* e sua relação com as bactérias patogênicas e de indicadores específicos em rios e águas costeiras. De 240 águas coletadas foram isolados 28 sorovares de *Salmonella* spp. destacando Enteritidis, Thompson e Virchow, sendo que a resistência foi detectada apenas no sorovar Thompson.

Moura *et al.* [137] realizaram pesquisa de *Salmonella* spp. em carnes caprinas comercializadas na cidade do Recife, Pernambuco identificando oito sorovares: 4 (50%) *Salmonella enterica* subsp. houtenae; 2 (25%) *S.* ser. Anatum; 1 (12,50%) *S.* ser. Rubislaw; e 1 (12,50%) *S.* ser. Derby. A análise do antibiograma revelou perfil de sensibilidade de 75% a sulfa-trimetoprim, 62,50% para tetraciclina e resistência de 100% à penicilina. Observou-se ainda, multirresistência de todos os sorovares a pelo menos três antibióticos.

No Brasil, *S. enterica* subsp. houtenae foi detectada em menos de 1% dos isolados procedentes de diversas fontes alimentares em um estudo realizado na cidade de São Paulo entre os anos de 1996 a 2000[58]. Também é descrita em tratos biliares de gambás selvagens, considerados como reservatório deste agente e, este micro-organismo, como de origem ambiental e de animais de sangue frio[138].

Tirolli e Costa[139] detectaram a prevalência de *Salmonella* ser. Panama em carcaças

resfriadas provenientes de Manaus. Moreira *et al.*[140] determinaram a ocorrência de *Salmonella* ser. Panama em carcaças de frangos abatidos e comercializados em Goiás.

Micallef[141] trabalhou com um montante de 63 isolados obtidos de amostras positivas para *Salmonella* e sorotipadas. Todos os isolados recuperados a partir do solo foram identificados como *Salmonella* ser. Typhimurium. Cinco sorovares adicionais foram recuperados a partir de amostras de água ou de sedimentos: *S*. ser. Newport, *S*. ser. Braenderup, *S*. ser. Javiana, *S*. ser. Lille e *S*. ser. Tennessee. Todos *S*. ser. Braenderup e *S*. ser. Javiana isolados foram sensíveis à amicacina, ceftriaxona, ciprofloxacina, gentamicina, ácido nalidíxico, trimetoprim/sulfametoxazol e estreptomicina.

Kich *et al.*[125] trabalharam a prevalência de salmonelas em rebanhos de suínos em Santa Catarina, com sorotipagem de 1.158 amostras, obtendo a seguinte distribuição de sorovares: Typhimurium (50,7%); Panama (28,5%); Derby (6,3%); Senftenberg (5,4%); Mbandaka (4,6%); Infantis (1,5%); *S. enterica* subsp. houtenae (0,7%); Montevideu (0,5%) e Salmonella spp. (1,9%). A resistência destas amostras foi observada nos seguintes fármacos: tetraciclina (79%), ampicilina (46%), canamicina (41%), gentamicina (39%), estreptomicina (35%), sulfametoxazol/sulfizoxazole (23%), trimetoprim/sulfametoxazol (10%), cloranfenicol (10%), cefalotina (5%), ácido nalidíxico (5%), amoxicilina/ácido clavulânico (1%) e cefoxitina (1%).

A principal razão para a prevalência de outros sorovares de *Salmonella* em vez de *S. enteritidis* em ovos de aves domésticas e amostras ambientais de aves pode ser devido à sua capacidade de adaptação às condições ambientais, indicando a mudança dinâmica de sorovares de *Salmonella* ocorrendo em determinada região[44].

Em estudos em água de rio, de todos os isolados encontrados por Poma[105] 30 sorovares diferentes foram distribuídos ao longo da área de rio amostrada. Esse fato demonstra a alta variabilidade do micro-organismo no ambiente aquático. Três sorovares ocorreram em mais de 50% das amostras, Panamá (47/48), Infantis (33/48), e Typhimurium (24/48). Foram encontradas oito sorovares por local/ano, sugerindo que uma vasta gama de sorovares de *Salmonella* impactando na qualidade microbiológica da água do rio. Mais de 50% (91/180) dos isolados foram sensíveis a todos os antimicrobianos testados e 54 perfis diferentes foram encontrados. Neste estudo, 49,5% dos isolados foram resistentes a pelo menos um antimicrobiano e a multirresistência ocorreu em 18% dos isolados. Mais de 10% dos isolados foram resistentes à ampicilina, doxiciclina, ácido nalidíxico, neomicina, canamicina e tetraciclina, com os dois últimos apresentando a maior resistência, 21,1% e

13,8%, respectivamente.

Vereen *et al*.[142] indicaram que as infecções por *Salmonella* spp. entre os seres humanos em geral apresentam uma máxima de isolamentos nos meses de verão, e estudos ambientais muitas vezes mostram picos sazonais variados para estes patógenos, com alguns sugerindo maior prevalência nos meses de verão. Em nosso trabalho a maior prevalência de isolamentos de *Salmonella* spp. foi no período do verão, mas não podemos correlacionar este achado devido ao número de coletas não ocorrer de forma repetida nos períodos de verão e inverno.

O efeito da luz solar sobre a persistência de *S. enterica, E. coli e Campylobacter jejuni* em rio e água do mar foi investigado por Sinton *et al.*[143]. Eles mostraram que as taxas de inativação das alíquotas bacterianas sob a luz solar foram claramente superiores às observadas na ausência da luz solar, e que o grau de inativação foi diretamente relacionado com a quantidade de insolação. Além disso, de acordo com Chandran e Hatha[144], amostras de *S. enterica* foram inativadas até 1,6 vezes mais rápido que amostras de *E.coli*.

4.5. Caracterização Filogenética dos Sorovares de *Salmonella* Isolados Utilizando a Técnica de PFGE (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*)

O PFGE é uma técnica usada para análise de macrorrestrição que tem se mostrado muito útil para a comparação e diferenciação de muitos agentes patogênicos bacterianos. Assim, esta técnica de eletroforese que é apropriada para separar grandes fragmentos de DNA, por meio da reorientação do DNA em gel pela ação de campos elétricos alternados é reconhecida como padrão ouro para identificação e tipagem de linhagens bacterianas devido a sua alta relevância epidemiológica[97]. Os métodos de tipagem molecular podem ser usados para o monitoramento da disseminação e a prevalência dos deslocamentos geográficos da epidemia e dos clones endêmicos com o objetivo de avaliar em longo prazo as estratégias preventivas ou o monitoramento das infecções emergentes e reemergentes.

Assim, das 52 amostras isoladas de *Salmonella* spp., 40 foram analisadas quanto aos seus padrões de corte quando submetidos a enzima de restrição para se traçar uma possível clonalidade entre elas (Figura 6). Visando auxiliar a análise deste resultado e a sua dedução, as partes referentes aos sorovares de *Salmonella* foram apresentadas separadamente.

O conceito de relação clonal é importante na epidemiologia das doenças infecciosas, podendo ser resultantes da exposição a uma fonte comum do agente etiológico.

Em geral esses micro-organismos são clonais, ou seja, representam a progênie de uma única célula sendo geneticamente idênticos.

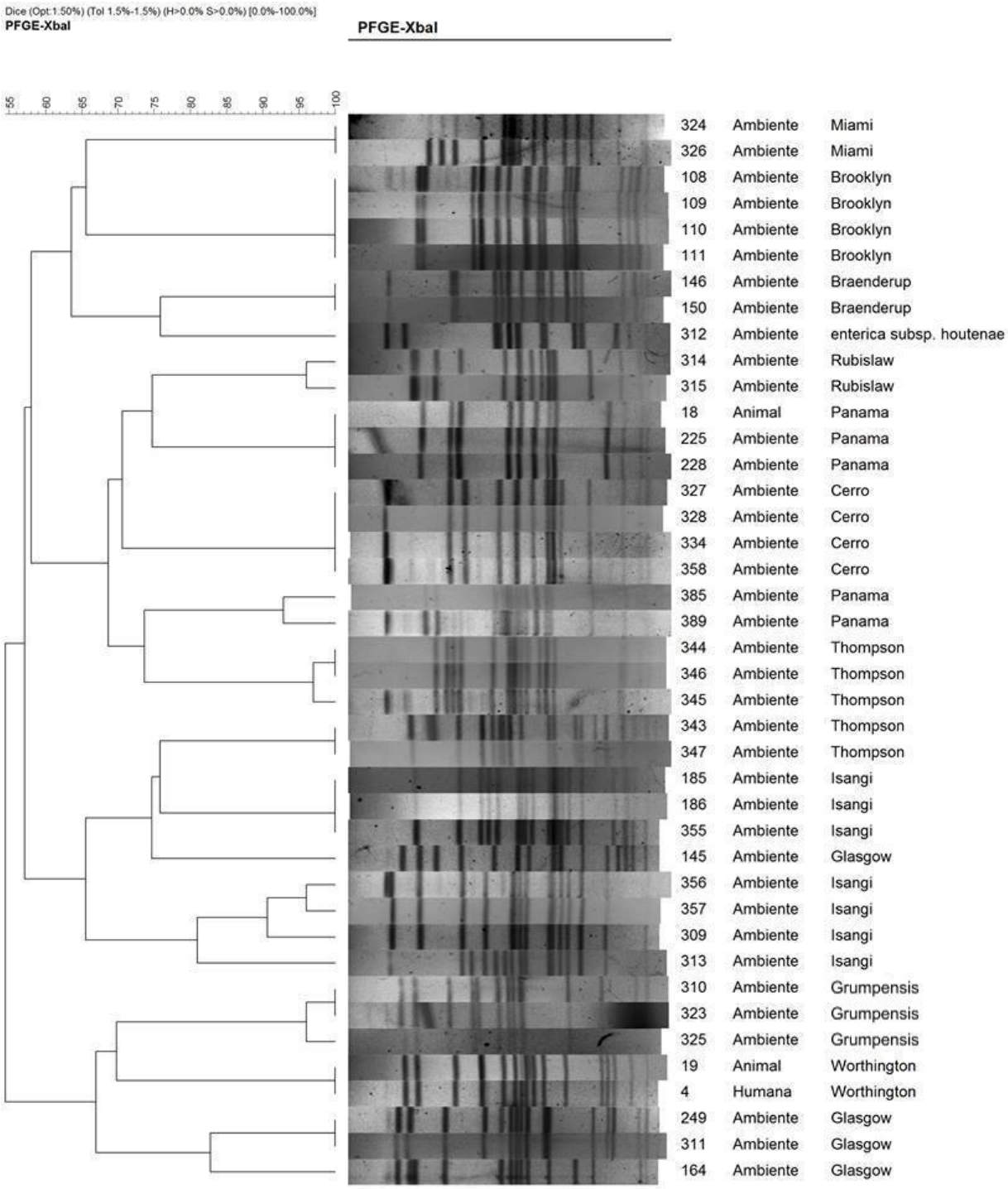


Figura 6 – Distribuição dos grupos filogenéticos de *Salmonella* spp. avaliadas através de PFGE digeridos pela enzima XbaI (Homologia entre 55% e 100%) e padrões calculados pelo Coeficiente de Dice.

Na análise dos sorovares em separado, no primeiro dendrograma observamos que as amostras de *Salmonella* ser. Braenderup, isoladas no ponto de coleta Caldeirão da esperança, apresentam 100% de similaridade, o que demonstra o padrão de corte idêntico sugerindo que ambas amostras sejam o mesmo clone.

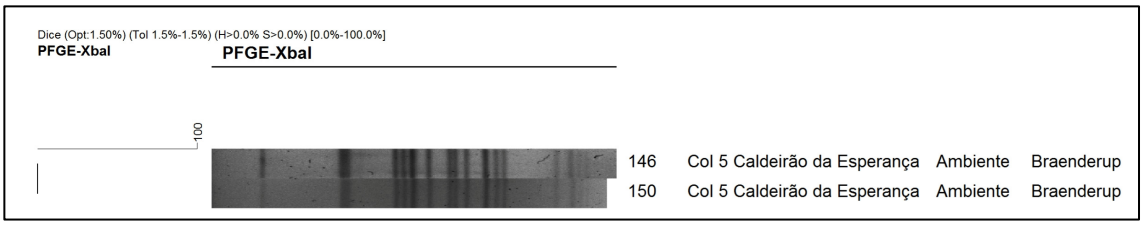


Figura 7 – Distribuição dos grupos filogenéticos de *Salmonella* ser. Braenderup avaliados através de PFGE digeridos pela enzima XbaI (Homologia = 100%) e padrões calculados pelo Coeficiente de Dice.

No segundo dendrograma, as amostras de *Salmonella* ser. Cerro, apesar de serem de diferentes pontos de isolamento apresentam um mesmo padrão de corte, tornando perceptível que as amostras isoladas tanto no Caldeirão/Olho d'água da Cacimba quanto isolada no Caldeirão do Urubu apresentam 100% de similaridade filogenética.

Ambas as regiões são frequentadas por animais silvestres residentes do PNSC, sendo que a área do Caldeirão/Olho d'água da Cacimba é um local de descanso diurno dos felinos como as onças (*Panthera onça*), informação confirmada por guias e informantes locais, bem como a presença de inúmeras pegadas deste animal ao redor do ponto de água de consumo. Já o ponto de coleta denominado Caldeirão do Urubu é conhecido como um "bebedouro de aves", localizado às margens de uma das trilhas internas que cruzam o parque e é local bastante comum para presença de aves das mais diversas espécies que compõem a fauna local.

Uma das possibilidades para que pontos distantes compartilhem amostras com 100% de similaridade filogenética configurando clones é justamente a mobilidade e presença de aves nesse ambiente, que funcionaria como dispersor deste clone.

Especialmente as aves constituem um dos principais reservatórios de *Salmonella* spp., representando um risco em potencial na transmissão ou veiculação indireta para o homem e outras espécies animais. Os sorovares de *Salmonella* caracterizados como ubiquitários, não apresentam seletividade por linhagens ou raças de aves e outros animais, razão pela qual são

indistintamente isolados de aves silvestres, que funcionam como hospedeiros portadores e em algumas situações como doentes[145].

Salmonelas zoonóticas são comumente descritas como patógenos de origem alimentar, no entanto, a água tratada para consumo humano, bem como águas naturais são conhecidas por serem uma fonte importante para a transmissão desses micro-organismos entéricos, os quais podem entrar no ambiente aquático diretamente com fezes de humanos ou animais infectados ou indiretamente, por exemplo, através do lançamento de efluentes[146] em terras agrícolas. *Salmonella* spp. podem ser encontradas numa grande variedade de vertebrados, bem como o homem. Fontes animais de *Salmonella* spp. incluem animais de estimação, animais de fazenda e animais silvestres; bezerros, aves, suínos, ovinos, bem como aves selvagens e répteis podem ser reservatórios de *Salmonella* spp.[145].

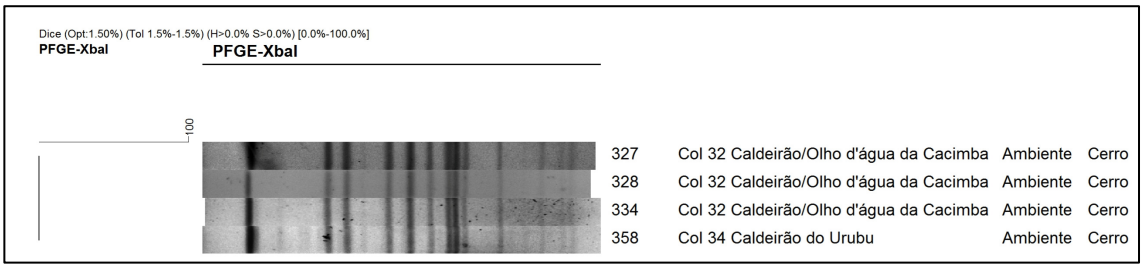


Figura 8 – Distribuição dos grupos filogenéticos de *Salmonella* ser. Cerro avaliados através de PFGE digeridos pela enzima XbaI (Homologia = 100%) e padrões calculados pelo Coeficiente de Dice.

As amostras de *Salmonella* ser. Brooklyn apresentaram 100% de similaridade filogenética. É importante ressaltar que estas amostras foram isoladas em ponto de coleta fora dos domínios do PNSC e no seu entorno (aproximadamente a 30 Km da entrada do BPF), como também na entrada da Fundação Museu do Homem Americano (FUMDHAM), área de visitação quase que obrigatória dos turistas que desejam conhecer a região, configurando uma situação de maior concentração e circulação de pessoas.

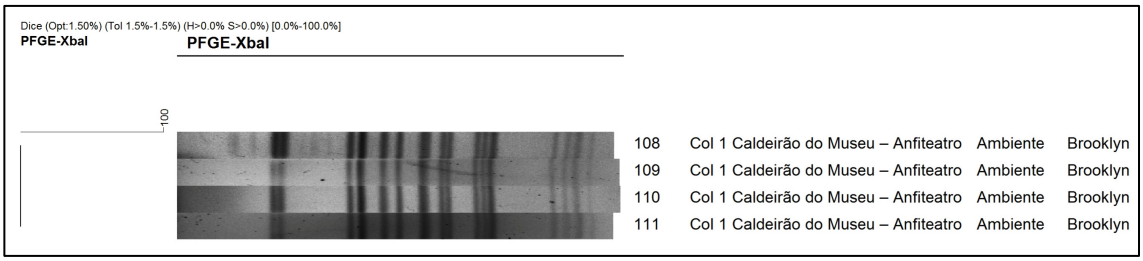


Figura 9 – Distribuição dos grupos filogenéticos de *Salmonella* ser. Brooklyn avaliados através de PFGE digeridos pela enzima XbaI (Homologia = 100%) e padrões calculados pelo Coeficiente de Dice.

As amostras de *Salmonella* ser Glasgow apresentam quatro pontos distintos de isolamento, todos em pontos de coleta no interior do PNSC (Baixão da Vaca, Tanque de cimento do Gongo, Caldeirão do BPF e Caldeirão da Esperança), distribuídas em dois clusters distintos. No primeiro clusters observa-se até 80% de similaridade entre as amostras isoladas dos pontos Baixão da Vaca, Tanque de cimento do Gongo e Caldeirão do BPF e um segundo cluster com a amostras isolada do Caldeirão da Esperança que apresenta um padrão de restrição que difere deste primeiro grupo representando uma outra origem clonal.

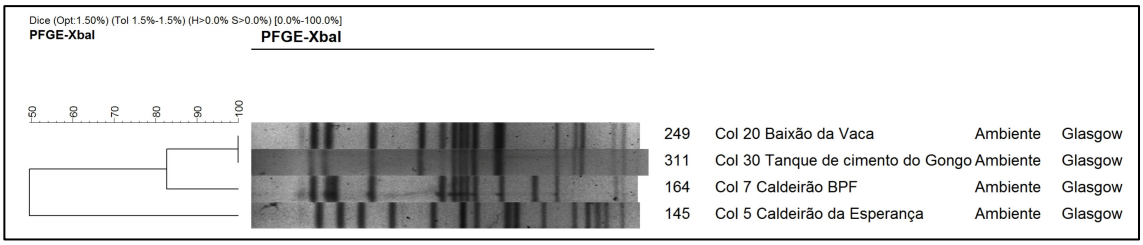


Figura 10 – Distribuição dos grupos filogenéticos de *Salmonella* ser. Glasgow avaliados através de PFGE digeridos pela enzima XbaI (Homologia entre 50% e 100%) e padrões calculados pelo Coeficiente de Dice.

As amostras de *Salmonella* ser. Isangi isoladas dos pontos de coleta Caldeirão do Urubu, Tanque de cimento do Gongo e Caldeirão do Gado/Baixão das Mulheres são ambas pertencentes ao sorovar Isangi, porém quando comparadas filogeneticamente analisadas observa-se a formação de dois clusters distintos. O primeiro cluster é composto por quatro amostras (L356, L357, L309 e L313) e quatro pulsotipos, sendo duas amostras isoladas do Caldeirão do Urubu apresentando mais de 95% de similaridade com dois pulsotipos e duas amostras do Tanque de cimento do Gongo.

As amostras L356 e L357, ambas isoladas no Caldeirão do Gongo aparentam ter a mesma origem clonal, exceto pela presença de uma banda a mais na amostra L356, que pode representar a presença de um plasmídio. As duas amostras isoladas no Tanque de cimento do Gongo, L309 e L313, possuem 80% de similaridade, entretanto, ao comparar a amostra L309 com as amostras L356 e L357, observa a existência de 90% de clonalidade. Apesar da amostra L313 apresentar padrões de bandas distintos as outras amostras do mesmo cluster, a amostra apresenta 80% de similaridade com as demais. Este padrão diferenciado pode representar a influência de eventos genéticos, revelando a possibilidade de ganho de novo sítios de restrição para a enzima.

O segundo cluster é formado por duas amostras isoladas do Caldeirão do Gado/Baixão das mulheres e amostra isolada do Caldeirão do Urubu apresentando 100% de similaridade (L185, L186 e L355). As amostras L185 e L186 podem configurar um mesmo clone e a amostra L355 representa uma outra linhagem clonal com as demais isoladas no mesmo ponto de coleta, representado por menos de 70% de similaridade entre elas.

É importante lembrar que estes pontos de coleta apresentam 18km de distancia entre eles e neste caso algum elemento carreador destes sorovares está agindo sobre essa dinâmica.

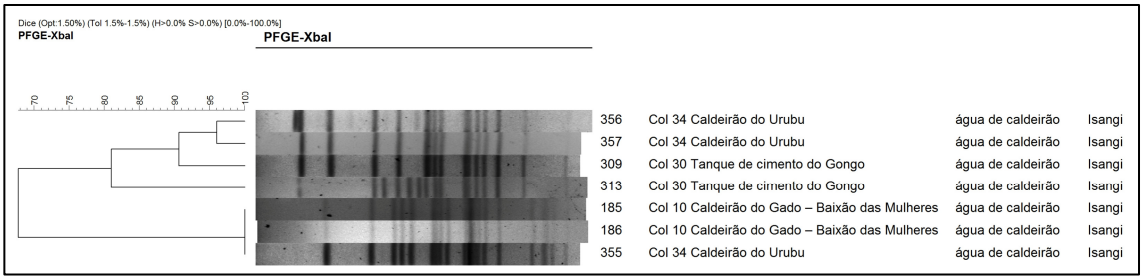


Figura 11 – Distribuição dos grupos filogenéticos de *Salmonella* ser. Isangi avaliados através de PFGE digeridos pela enzima XbaI (Homologia entre 70% e 100%) e padrões calculados pelo Coeficiente de Dice.

As amostras de *Salmonella* ser. Grumpensis foram isoladas de pontos de coleta distintos, mas correlacionados, pois são pontos são bastante próximos, inclusive a água que brota no ponto de coleta Olho d'água do Gongo em períodos onde não há estiagem podem ser represada logo abaixo no ponto Tanque de cimento do Gongo. Os três isolados apresentam um mesmo pulso-tipo sendo cepas com 100% de similaridade representando um mesmo clone circulante nestes pontos.

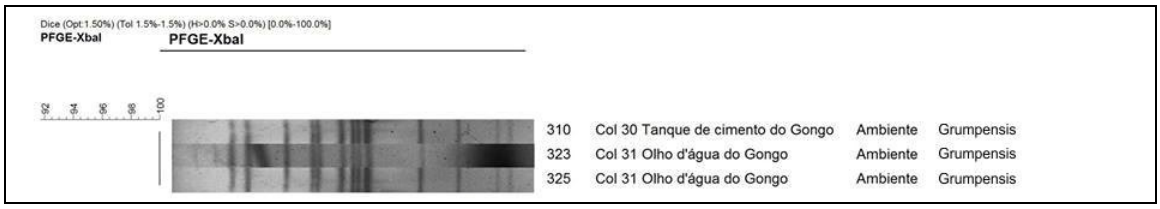


Figura 12 – Distribuição dos grupos filogenéticos de *Salmonella* ser. Grumpensis avaliados através de PFGE digeridos pela enzima XbaI (Homologia entre 70% e 100%) e padrões calculados pelo Coeficiente de Dice.

As amostras de *Salmonella* ser. Miami isoladas do ponto de coleta Olho d'agua do gongo, apresentam, aproximadamente similaridade entre si (> 94%), o que provavelmente representa o mesmo clone.

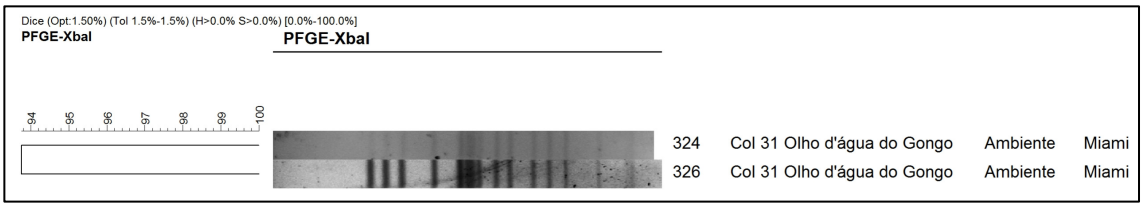


Figura 13 – Distribuição dos grupos filogenéticos de *Salmonella* ser. Miami avaliados através de PFGE digeridos pela enzima XbaI (Homologia = 94%) e padrões calculados pelo Coeficiente de Dice.

Salmonella ser. Panama representa grande importância para a Saúde Pública com vários relatos de surtos de DTA. Neste estudo obtivemos seis isolados deste sorovar, sendo cinco de origem ambiental e um de origem animal. As amostras de fonte ambiental foram de dois pontos de coleta distintos (Barragem do Onça e Caldeirão do Muriçoca) ambas fora da área pertencente ao PNSC e a amostra de origem animal isolada de fezes de anuro (sapo) encontrada nas margens do Caldeirão do Gado/Baixão das Mulheres área pertencente ao PNSC. Em cada uma das amostras isoladas no Caldeirão do Muriçoca (amostra L390) não foi possível a realização da análise filogenética devido ao seu DNA, após fase de de extração, se apresentar degradado.

Quando a análise filogenética das amostras observa-se a presença de dois clusters. As amostras L385 e L389 apresentam mais que 90% de similaridade podendo representar o mesmo clone e as amostras isoladas na Barragem do Onça (L225 e L228) apresentam 100%

de similaridade com amostra de origem animal L18, ambas apresentando o mesmo pulsotipo.

Este achado é bastante relevante, se tratando de um sorovar de interesse em Saúde Pública, já que o mesmo é incriminado com surtos humanos[45, 145, 147]. Amostras de *Salmonella* ser. Panama encontrados tanto em fezes de animal silvestre quanto em corpos d'água (Barragem do Onça) apresentam 100% de similaridade o que pode sugerir uma possível circulação desta cepa neste ambiente. Apesar do ponto de coleta Barragem do Onça ficar a aproximadamente 25 Km de distância do ponto de coleta da amostra animal a veiculação dessa cepa se deu muito provavelmente pelo transito de animais e/ou principalmente aves entre estes pontos distintos.

Importante ressaltar que a Barragem do Onça é o local de armazenamento e captação de água para o fornecimento a população dos municípios de São Raimundo Nonato e parte do município de Coronel José Dias, municípios onde o PNSC está inserido.

Na maioria das cidades e lugarejos do sudeste do Piauí o atual abastecimento de água pode ser considerado caótico pois, embora exista um enorme potencial de água em subsolo e alguns poços sejam utilizados para fornecer água junto com cacimbas, barreiros e cisternas, o sistema implantado e sua manutenção é insatisfatória.

Com a finalidade de incrementar o abastecimento de água na região, foi construída em 2000 a Barragem Petrônio Portela, também conhecida como Barragem da Onça, e em 2005 foi realizado o projeto denominado "Adutora do Garrincho" que instalou a canalização da água da barragem para oito municípios.

A presença do sorovar Panama nesta Barragem, de tamanha importância para a sua região, configura uma possível fonte de contaminação ambiental para humanos e animais.

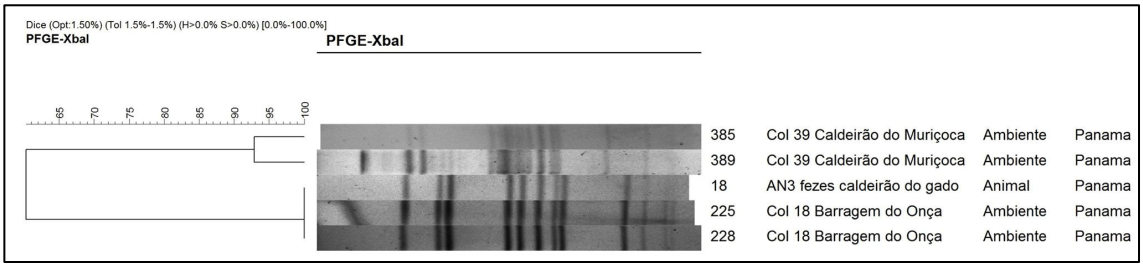


Figura 14 – Distribuição dos grupos filogenéticos de *Salmonella* ser. Panama avaliados através de PFGE digeridos pela enzima XbaI (Homologia entre 60% e 100%) e padrões calculados pelo Coeficiente de Dice.

As amostras de *Salmonella* ser Rubislaw foram isoladas do ponto de coleta Tanque de cimento do Gongo e apresentam aproximadamente 95% de similaridade, o que provavelmente configura se tratar de um clone. Ao se analisar o padrão de bandeamento apresentado por ambas, a amostra L314 mostra uma banda a mais, o que sugere a presença de um plamídeo.

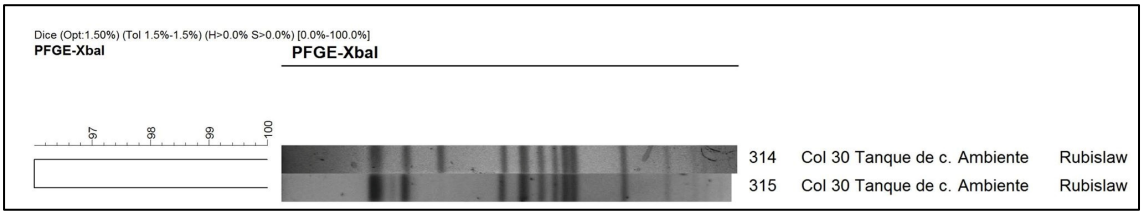


Figura 15 – Distribuição dos grupos filogenéticos de *Salmonella* ser. Rubislaw avaliados através de PFGE digeridos pela enzima XbaI (Homologia = 66%) e padrões calculados pelo Coeficiente de Dice.

Amostras de *Salmonella* ser. Thompson, isoladas do Olho d'água da Cocheira, ponto de coleta bastante frequentado por diversos animais silvestres presentes no parque, inclusive pelos felinos, originou dois clusters. O primeiro cluster (formado pelas amostras L344, L346 e L345), sugere que as amostras L344 e L346 podem ser o mesmo clone por apresentarem 100% de similaridade; e a amostra L345 apresenta mais de 95% de similaridade frente as demais. O segundo cluster é formado pelas amostras L343 e L347 que demonstraram 100% de similaridade em si podendo ser clones, mas apresentam menos de 60% de similaridade com o outro cluster, o que sugere um histórico evolutivo bastante diferenciado.

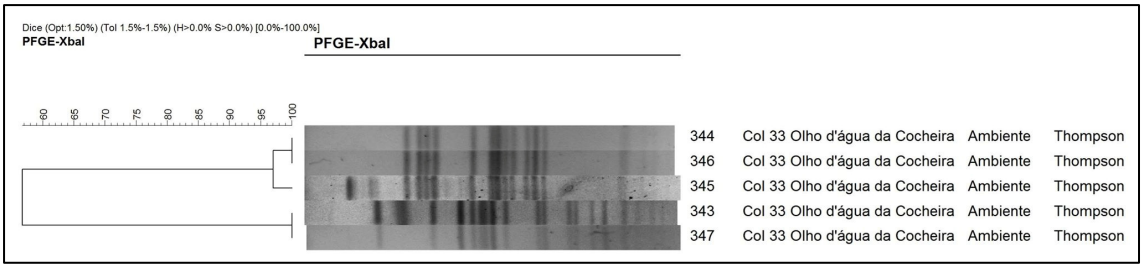


Figura 16 – Distribuição dos grupos filogenéticos de *Salmonella* ser. Thompson avaliados através de PFGE digeridos pela enzima XbaI (Homologia entre 60% e 100%) e padrões calculados pelo Coeficiente de Dice.

O único isolado de origem humana coletado no Sítio do Mocó apresenta 100% de similaridade com isolado de origem animal (amostra de fezes de Anuros - sapo) coletado as margens do Caldeirão do Gado/Baixão das Mulheres são amostras de *Salmonella* ser. Worthington. Este achado também se configura como uma possível hipótese para a circulação de sorovares de *Salmonella* neste ambiente. A distância entre os dois pontos de coleta é de aproximadamente 250 metros e, possivelmente, percorrida no trajeto natural do animal em questão.

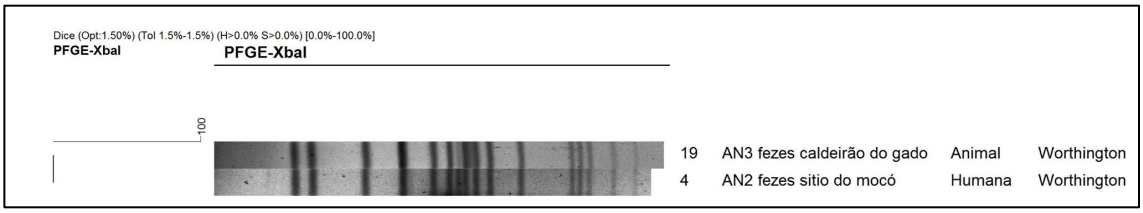


Figura 17 – Distribuição dos grupos filogenéticos de *Salmonella* ser. Worthington avaliados através de PFGE digeridos pela enzima XbaI (Homologia = 100%) e padrões calculados pelo Coeficiente de Dice.

A análise de PFGE que consiste em padrões de eletroforese em gel de campo pulsado obtidos a partir de amostras de agentes patogênicos conferem informações epidemiológicas sobre os isolados. Embora muitos métodos moleculares estejam disponíveis, a análise de macrorrestrição - PFGE se mostra particularmente útil para a comparação e diferenciação de muitos agentes patogênicos bacterianos. Contudo, a sensibilidade e poder discriminatório da PFGE dependem do organismo a ser subtipado e a enzima de restrição utilizada. Sua alta relevância epidemiológica fez com que esta técnica fosse classificada como "padrão ouro" para a subtipagem de micro-organismos patogênicos.

O encaminhamento contínuo das informações, decorrentes dos resultados obtidos, a partir da avaliação de diferentes perfis moleculares permite fortalecer as ações de vigilância. Estas se farão com base no conhecimento, quanto à etiologia, permitindo atuar através de alerta precoce, com o reconhecimento entre os circulantes, da disseminação dos clones de relevância no meio ambiente, atuando no controle destes patógenos, emergentes em nosso meio.

4.6. Aspectos Eco-epidemiológicos

O relacionamento entre Unidades de Conservação com suas vizinhanças deve ser trabalhado no sentido de buscar o entendimento e o apoio das populações locais, a promoção do desenvolvimento sócio-econômico das comunidades e o estabelecimento de processos participativos comunitários de modo a garantir padrões de sustentabilidade para todos os habitantes. Em razão da necessidade de proteger de modo mais significativo os ecossistemas, faz-se necessário o desenvolvimento de processos participativos, sob a forma de trabalhos conjuntos entre os gerenciadores das Unidades e grupos categorizados da sociedade. Os gestores do Parna da Serra da Capivara têm como principal preocupação o fato de definir uma política ampla de preservação ambiental uma vez que se promove o ecoturismo, que se constitui em importante fonte de divisas para região e para o Parque, de forma a não degradar o meio ambiente[73, 99].

A identificação, caracterização e reconhecimento de importantes sítios geológicos, geomorfológicos ou de paisagens naturais ou culturais têm sido, nas últimas décadas, valorizado e fomentado como ferramenta importante na educação e divulgação de temas voltados para o meio ambiente.

A região do Parque Nacional Serra da Capivara apresenta características ímpares e diversificadas de naturezas diferentes e complementares: ambientais - ao situar-se numa fronteira geológica, contato das formações da Bacia do Parnaíba e da depressão periférica do São Francisco; ecológica - contato de vegetação pertencentes a diferentes formações vegetais, como caatinga, cerrado e floresta; culturais - por abrigar a maior concentração de sítios arqueológicos, atualmente conhecidos nas Américas; e turísticas – beleza natural de paisagens magníficas e privilegiados pontos panorâmicos de observação.

A área do Parque engloba terras dos municípios de São Raimundo Nonato (IDH-0,661, considerado médio, com 65% de população urbana e 35% rural), Coronel José Dias (IDH-0,546, considerado baixo, com 33% de população urbana e 67% rural), João Costa (IDH-0,561, considerado baixo, com 23% de população urbana e 77% rural) e Brejo do Piauí (IDH-0,515, considerado baixo, com 37% de população urbana e 63% rural). O IDH da região equivale à faixa de baixo desenvolvimento humano, segundo os critérios universais definidos pelas Nações Unidas, retratando a qualidade de vida da região com uma má distribuição de renda e níveis elevados de pobreza da população[81].

Assim, uma área que mantem um atrativo turístico de grande porte inserido em municípios onde os serviços públicos são deficientes, se faz necessário um estudo sobre a

prevalência de bactérias associadas a condições sanitárias. Na Figura 6 observa-se que os pontos marcados no mapa são os locais positivos para isolamento de *Salmonella* spp. A maioria estão localizados no interior do parque representados por Caldeirões para consumo de água para os animais silvestres. Outros ainda estão no entorno do Parque utilizados por animais de criação (Caldeirão do Muriçoca) e ainda na Barragem que é utilizada para abastecimento de água local (Barragem do Onça).

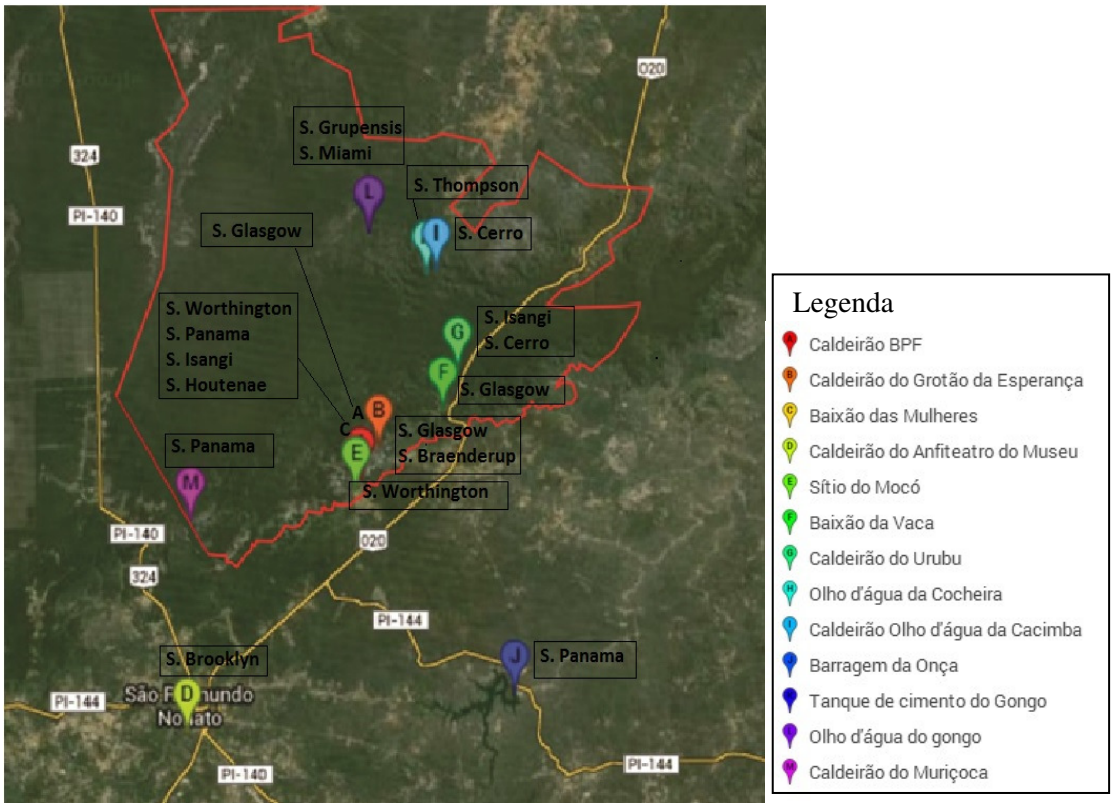


Figura 18: Pontos de coleta positivos para isolamento de *Salmonella* spp.

Os barreiros existentes nas localidades do entorno do PNSC representam importante fonte de água para a subsistência dos animais de criação residentes nestas localidades e em períodos de grande estiagem para o uso das famílias[73]. Não existe monitoramento da qualidade da água dos barreiros, o que do ponto de vista da Saúde Pública, torna o seu uso arriscado, uma vez que podem ser facilmente contaminados pelas fezes de animais, que os utilizam de forma intensa, e por fezes humanas carreadas pelas chuvas, tendo em vista a inexistência de esgotamento sanitário na área de estudo.

O mesmo pode-se dizer para os caldeirões localizados no interior do PNSC[73], que servem como fonte de água para os animais silvestres e funcionam como uma forma de

manter os animais em seu habitat evitando que os mesmos percorram grandes distâncias e saiam dos domínios do Parque a procura de água. Porém é de suma importância o monitoramento dessas fontes de água para que as mesmas não funcionem como um reservatório de patógenos zoonóticos.

Os dados deste estudo são relevantes para a Saúde Pública, pois contribuem para o monitoramento ambiental a partir do conhecimento da epidemiologia molecular dos sorovares de *Salmonella* circulantes no ambiente, nos animais e na população que habita a região do Parque Nacional da Serra da Capivara, Piauí – Brasil.

5. CONCLUSÕES

- Observou-se a presença de bactérias da Família Enterobacteriaceae em todos os pontos de coleta, principalmente nos sistemas aquáticos, indicando a presença de coliformes recente nos locais de coleta;

- Em nenhuma origem ou ponto de coleta foi possível o isolamento de bactérias do gênero *Campylobacter*, importante enteropatógeno de impacto para a Saúde Pública;

- O perfil de resistência antimicrobiana mais representativo, no primeiro e segundo período de coleta foi: ampicilina (45,5%) e (53%), cefoxitina (19,5%) e (34,5%) e tetraciclina (16,5%) e (18,5%) respectivamente;

- Não foram observadas diferenças de resistência a antimicrobianos entre os diferentes pontos de coleta estudados;

- Os maiores percentuais de resistência foram observados nas espécies *Escherichia coli*, *Citrobacter* spp., *Proteus* spp. e *Klebsiella* spp, respectivamente;

- Observou-se ocorrência de multirresistência a antimicrobianos diferentes combinados (de 2 até 6 antimicrobianos), onde os perfils com maior frequência foram Ampicilina, Cefoxitina, Imipenem, Sulfametoxazol-Trimetoprim e Tetraciclina;

- Amostras de origem ambiental revelaram maior diversidade e maior percentual de padrões de multirresistência quando confrontadas aos isolados de origem humana e animal.

- A *Salmonella* está presente em diferentes ecossistemas aquáticos no interior e entorno do Parque Nacional da Serra da Capivara, representando 10% das amostras analisadas;

- Foram identificados 11 sorovares de *S. entérica* subsp. *enterica:* Worthington, Panama, Brooklyn, Glasgow, Braenderup, Isangi, Grumpensis, Rubislaw, Miami, Cerro, Thompson e duas amostra identificada como *S. enterica* subsp. houtenae;

- O perfil de resistência de *Salmonella* spp. encontrado foi baixo representado por: 7,7% Ampicilina; 3,8% Cefoxitina; 1,9% Imepenem; 3,8 Sulfametaxazol-Trimetoprim; 1,9% Clorafenicol; 1,9% Estreptomicina e 1,9% Nitrofurantoina;

- Isolados com mesma origem clonal circulam em pontos de coletas distintos no Parque Nacional de Serra da Capivara como observados nos sorovares Glasgow, Cerro, Isangi;

- Amostras de *Salmonella* ser Panama apresentam clone com 100% de homologia filogenética nas amostras de água isoladas dos pontos Barragem do Onça e amostra de fezes de anuro isoladas as margens do Caldeirão do Gado - Baixão das Mulheres (em torno e interior do PNSC respecitamente);

- Amostras de *Salmonella* ser Worthington apresentam clone com 100% de homologia filogenética isolado nas amostras de fezes humana no Sítio do Mocó e em amostra de fezes de anuro isoladas as margens do Caldeirão do Gado - Baixão das Mulheres (em torno e interior do PNSC respectivamente); deixando pistas da circulação desta patógeno no ambiente.

- Os dados obtidos neste estudo são relevantes para a Saúde Pública, pois contribuem para o monitoramento ambiental a partir do conhecimento da epidemiologia dos sorovares de *Salmonella* circulantes no ambiente, impactando animais e a população que habita na região do Parque Nacional Serra da Capivara-Piauí-Brasil.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1- GEO Brasil. Perspectivas do meio ambiente no Brasil. O estado do meio ambiente no Brasil - Organizado por Thereza Christina Carvalho Santos & João Batista Drummond Câmara. Brasília: Edições IBAMA: 440 p. 2002.

2- WHO. World Health Organization. Definition of Environmental Health developed at WHO consultation, Bulgaria, 1993. Disponível em: http://health.gov/environment/DefinitionsofEnvHealth/ehdef2.htm. Acesso em julho de 2013.

3- Nelson G. Saúde e meio ambiente nas cidades: os desafios da saúde ambiental. Saúde e Sociedade 8(1): 49-61, 1999.

4- Sabroza PC, Waltner-Toews D. Concepções sobre saúde e doença. Cadernos de Saúde Pública 17 (Supl): 4-5, 2001.

5- Khan SU, Atanasova KR, Krueger WS, Ramirez A, Gray GC. Epidemiology, geographical distribution, and economic consequences of swine zoonoses: a narrative review. Emerging Microbes and Infections 2: 1-11, 2013.

6- EFSA - European Food Safety Authority. The Community Summary Report On Trends And Sources of Zoonoses and Zoonotic Agents In The European Union In 2007. The EFSA Journal: 217 p. 2009.

7- Krauss H, Weber A, Appel M, Enders B, Graevenitz AV, Isenberg HD, Schiefer HG, Slenczka W, Zahner H. Zoonosis. Infectious Diseases Transmissible From Animals to Humans. ASM Press. American Society for Microbiology, Washington DC., USA. 3rd Edition, 456p. 2003.

8- Armelagos GJ, Brown PJ, Turner B. Evolutionary, historical and political economic perspectives on health and disease. Social Science & Medicine 61: 755–765, 2005.

9- Reinhard KJ, Ferreira LF, Bouchet F, Sianto L, Dutra JMF, Iniguez A, Leles D, Le Bailly M, Fugassa M, Pucu E, Araújo A. Food, parasites, and epidemiological transitions: A broad perspective. International Journal of Paleopathology 3: 150– 157, 2013.

10- Chomel BB. Zoonosis bacterianas de aparición reciente. Pan Am J Public Health 11(1): 50-55, 2002.

11- Travis DA, Watson RP, Tauer A. The spread of pathogens through trade in wildlife. Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties 30(1): 219-239, 2011.

12- Woolhouse ME, Webster JP, Domingo E, Charlesworth B, Levin BR. Biological and Biomedical Implications of the Co-Evolution of Pathogens and their Hosts. Nature Genetics 32(4): 569-77, 2002.

13- Rogers S, Haines J. Detecting And Mitigating The Environmental Impact Of Fecal Pathogens Originating From Confined Animal Feeding Operations: Review. Environmental Protection Agency (EPA): 185p. 2005.

14- Mayer JD. Geography, Ecology and Emerging Infectious Diseases. Social Science & Medicine 50: 937-952, 2000.

15- Steele JH. Veterinary Public Health: Past Success, New Opportunities. Preventive Veterinary Medicine 86: 224–243, 2008.

16- Murphy FA. Emerging Zoonoses: The Challenge For Public Health And Biodefense. Preventive Veterinary Medicine 86: 216–223, 2008.

17- Bengis RG, Leighton FA, Fischer JR, Artois M, Mörner T, Tate CM. The Role Of Wildlife In Emerging And Re-Emerging Zoonoses. Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties 23(2): 497-511, 2004.

18- On SLW. Taxonomy of *Campylobacter*, *Helicobacter* and related organisms. Clin. Microbiol. Rev. 9: 405-422, 2001.

19- Organização Pan-Americana da Saúde – OPAS. Disponível Em <http://www.opas.org.br>. Acessado em agosto de 2009.

20- Nielsen EV, Engberg J, Fussing V, Petersen V, Brogren CH, On SLW. Evaluation of phenotypic and genotypic methods for subtyping *Campylobacter jejuni* isolates from humans, poultry and cattle. Journal of Clinical Microbiology 38: 3800-3810, 2000.

21- Pickett CL. *Campylobacter* toxins and their role in pathogenesis. *In*: Nachamki I, Blaser, MJ *Campylobacter*. 2nd ed. Washington, D.C. ASM Press: 151-156, 2000.

22- Van Vliet AHM, Ketley JM. Pathogenesis of enteric *Campylobacter* infection. Journal of Applied Microbiology 90: 45-56, 2001.

23- Frost JA. Current epidemiological issues in human campylobacteriosis. Journal Applied Microbiology. 90: 85S-95S, 2001.

24- Mims CA, Playfair JHL, Roitt IM, Wakelin D, Williams R. Microbiologia Médica. 1ª Ed Bras. São Paulo, SP, Editora Manole: 558 p, 1995.

25- Skirrow MB, Blaser MJ. Clinical and epidemiological considerations. In: Nachamkin I, Blaser MJ, Tompkins L S. *Campylobacter jejuni*. Current status and future trends. 1st ed., Washington, DC, USA, Am. Soc. Microbiol.: 3-8, 1992.

26- Altekruse SF, Stern NJ, Fields PI, Swerdlow DL. *Campylobacter jejuni* - an emerging foodborne pathogen. Emerging Infectious Disiases 5: 28-35, 1999.

27- Nachamkin I, Allos BM, Ho T. *Campylobacter* species and Guillain-Barré syndrome. Clinical Microbiology Reviews 11: 555-567, 1998.

28- Trabulsi LR. Microbiologia. São Paulo. Ed. Atheneu, 2005.

29- Wasteson Y. Zoonotic *Escherichia coli*. Acta Vet. Scand. Suppl. 95:79-84, 2001

30- Focaccia RV. Tratado de Infectologia. Rio de Janeiro. Ed. Atheneu: 984-989, 2005.

31- Pohjanvirta VML. Coli Bacteria In Poultry - A Possible Zoonosis. Disponível em: http://www.evira.fi/portal/en/research_on_animal_diseases_and_food/current_issues/archive/?a=viewmessage&Id=1394. Acessado em Agosto de 2011.

32- Franco BDGM, Landgraf M. Microbiologia dos Alimentos. São Paulo, Atheneu: 196p. 2005.

33- Le Minor L. Genus III. *Salmonella* Lignières 1900. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Krieg NR, Holt JG. Ed: Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1: 427-458, 1984.

34- Germano PML, Germano MIS. Higiene e vigilância sanitária de alimentos. 3. ed. São Paulo, Manole, 2008.

35- Grimont PAD, Weill F-X. Antigenic Formulae of the *Salmonella* Serovars, Ninth Edition, World Health Organization Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. Institut Pasteur, Paris, France. 2007.

36- Euzéby JP. Revised *Salmonella* nomenclature: designation of *Salmonella enterica* (ex Kauffmann and Edwards 1952) Le Minor and Popoff 1987 sp. nov., nom. rev. as the neotype species of the genus *Salmonella* Lignieres I900 (Approved Lists 1980), rejection of the name *Salmonella choleraesuis* (Smith 1894) Weldin 1927 (Approved Lists 1980), and conservation of the name *Salmonella typhi* (Schroeter 1886) Warren and Scott 1930 (Approved Lists 1980). Request for an Opinio. International Journal of Systematic Bacteriology 49:927-930, 1999

37- Guibourdenche M, Roggentin P, Mikoleit M, Fields PI, Bockemuhl J, Grimont PAD, Weill FX. Supplement 2003–2007 (No. 47) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. Research in Microbiology 161: 26–29, 2010.

38- Brenner FW, Villar RG, Angulo FJ, Tauxe R, Swaminathan B. *Salmonella* nomenclature. J. Clin. Microbiol. 38: 2465-2467, 2000.

39- Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn JRWC. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 6. ed. Philadelphia, Lippincott: 1760 p, 2008.

40- Neves J. Salmonelose septicêmica prolongada em fase às Doutrinas de Kiel e de Montevidéu. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 1(2):58-68, 1967

41- Jay JM. Microbiologia de alimentos, 6. ed. Porto Alegre, Artmed: p.771, 2005.

42- SVS - Secretaria de Vigilância em Saúde. Doenças Transmitidas por Alimentos. Manual Integrado de Vigilância, Prevenção e Controle de Doenças Transmitidas por Alimentos. Disponível em: http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/profissional-e-gestor/vigilancia/links-vigilancia/6764-publicacoes. Acessado em outubro de 2013.

43- Secretaria de Vigilância em Saúde. Febre Tifóide. In: Guia de Vigilância Epidemiológica. Brasília: 350-363, 2009.

44- Singh V. *Salmonella* Serovars and Their Host Specificity. Journal of Veterinary Science & Animal Husbandry, 1: 301, 2013.

45- Loureiro ECB. Epidemiologia descritiva de *Salmonella* em ecossistemas aquáticos de diferentes áreas do estado do Pará. Tese de Doutorado. Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará. Pará, 2007.

46- Humphrey T. Public-health aspects of *Salmonella* infection. In: *Salmonella* in Domestic animals. Wray C. & Wray A. Ed. CABI Publishing, New York, USA: 245-263, 2000.

47- Murray CJ. Environmental aspects of *Salmonella*. In: *Salmonella* in Domestic animals. Wray C. & Wray A. Ed. CABI Publishing, New York, USA: 265-283, 2000.

48- Feachem RG, Bradley DJ, Garelick H & Mara DD. Sanitation and Disease, Health Aspects of Excreta and Wastewater Management. Washington, USA, John Wiley & Sons. 501p, 1983.

49- Rivera ING, Martins MT. Bactérias enteropatogênicas no ambiente aquático. Revista Ciências Farmacêuticas, São Paulo, 17: 115-136, 1996.

50- Friend M. The Role Of Native Birds And Other Wildlife On The Emergence Of Zoonotic Diseases. The Emergence Of Zoonotic Diseases: Understanding The Impact On Animal And Human Health - Workshop Summary. Forum On Emerging Infections: 176p, 2002.

51- Lehtola MJ, Pitkanen T, Miebach L, Miettinen IT. Survival Of *Campylobacter jejuni* In Potable Water Biofilms: A Comparative Study With Different Detection Methods. Water Sci. Technol. 54(3): 57-61, 2006.

52- Augusto LGS, Branco A. Política de informação em Saúde Ambiental. Revista Brasileira de Epidemiologia 6(2): 150-57, 2003.

53- BRASIL, Ministério da Saúde – Conselho Nacional De Saúde. Desenvolvimento Do Sistema Único De Saúde No Brasil: Avanços, Desafios E Reafirmação De Princípios E Diretrizes. 72p, 2002. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/desenvolvimento_sus.pdf. Acessado em Março de 2012.

54- Neto MLF, Ferreira AP. Perspectivas Da Sustentabilidade Ambiental Diante Da Contaminação Química Da Água: Desafios Normativos. Interfaces - Revista de Gestão Integrada em Saúde do Trabalho e Meio Ambiente 2(1): 1-15, 2007.

55- Moraes DSL, Jordão BQ. Degradação de recursos hídricos e seus efeitos sobre a saúde humana. Revista de Saúde Pública 36(3): 370-4, 2002.

56- Amaral LA, Rossi Junior OD, Nader Filho A. Ocorrência De *Staphylococcus* sp. Em Água Utilizada Em Propriedades Leiteiras Do Estado De São Paulo. Arquivos Brasileiros de Medicina, Veterinária e Zootecnia 55: 1-9, 2003.

57- Grabow W. Waterborne Diseases: Update on Water Quality Assessment and Control. Water S.A. 22: 193-202. 1996.

58- Organização Mundial de Saúde - OMS. Disponível Em <http://www.who.int>. Acessado em Agosto de 2013.

59- Hofer E; Reis CMF; Theophilo GND; Cavalcanti VO; Lima NV; Henriques MFCM. *Aeromonas* associated with an acute diarrhea outbreak in São Bento do Una, Pernambuco. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 39(2):217-220, 2006.

60- Isaac-Marquez AP, Lezama-Davila CM, Ku-Pech RP, Tamay-Segovia P. Calidad Sanitaria de los suminstros de Agua para Consumo Humano en Campeche. Salud Pública Méx. 36: 655-661. 1994.

61- BRASIL. Ministério da Saúde. Doença Diarreica Aguda. Disponível em: http://portal.saude.gov.br /portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1549. Acessado em Outubro de 2013.

62- Stukel TA, Greenberg ER, Dain BJ, Reed FC, Jacobs NJ. A Longitudinal Study Of Rainfall And Coliform Contamination In Small Community Drinking Water Supplies. Environmental Science and Technology 24: 571-5, 1990.

63- Vinten AJA, Douglas JT, Lewis DR, Aitken MN, Fenlon DR. Relative Risk Of Surface Water Pollution By *E. coli* Derived from Faeces of Grazing Animals Compared To Slurry Application. Soil Use Manage. 20: 13–22. 2004.

64- Fiennes, RNTW. Zoonoses and the Origens and Ecology of Human Disease, Academic Press, London, 1978.

65- Martinez JL. Environmental Pollution by Antibiotics and by Antibiotic Resistance Determinants. Environmental Pollution 157(11): 2893-902, 2009.

66- Martinez JL. The Role of Natural Environments in the Evolution of Resistance Traits in Pathogenic Bacteria. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences 276: 2521-2530, 2009.

67- Santos M. Metamorfoses do espaço habitado: fundamentos teóricos e metodológicos da Geografia. 1º ed. São Paulo: Hucitec, 1988.

68- Dean W. A ferro e fogo: a história da devastação da Mata Atlântica brasileira. Rio de Janeiro: Companhia das Letras: 484 p. 1997.

69- Pádua MTJ. Sistema brasileiro de unidades de conservação: de onde viemos e para onde vamos? In: Congresso Brasileiro de Unidades de Conservação, 1, 1997, Curitiba: IAP; Unilivre; Rede Nacional Pró Unidades de Conservação, v. 1. 1997.

70- Rocha LGM. Os parques nacionais do Brasil e a questão fundiária: o caso do Parque Nacional da Serra dos Órgãos. Niterói. Dissertação (Mestrado em Ciência Ambiental). Universidade Federal Fluminense. 2002.

71- BRASIL, Lei no 9.985, de 18 de julho de 2000.

72- IBDF - Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal & Fundação Brasileira Para Conservação da Natureza. Plano do Sistema de Unidades de Conservação do Brasil - II Etapa. Brasília: IBDF. 1982.

73- Santos ALB. Os múltiplos usos da água e suas relações com a saúde da população do entorno do Parque Nacional Serra da Capivara, no semi-árido do Piauí. Dissertação de Mestrado. 111p. Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2007.

74- Gazzinelli A, Gazzinelli MF, Cadete MM, Pena Filho S, Sá RI, Kloos H. Sociocultural Aspects of Schistosomiasis Mansoni In An Endemic Area In Minas Gerais, Brazil. Caderno

Saúde Pública 14: 841-849, 1998.

75- White GF, Bradley DJ, White AU. Drawers Of Water: Domestic Water Use In East Africa. Chicago: Chicago University Press. 1972.

76- Martins AMF. Parque Nacional Serra da Capivara – Patrimônio Cultural da Humanidade. Dissertação de Mestrado apresentada ao Centro de Pesquisa e Documentação de História Contemporânea do Brasil – CPDOC, Fundação Oswaldo Cruz, 2011.

77- Borges-Pereira J, Castro JAF, Campos JHF, Nogueira JS, Zauza PL, Marques P, Cardoso MA, Britto C, Araújo AJG. Estudo da infecção e morbidade da doença de Chagas no município de João Costa – Parque Nacional Serra da Capivara, Piauí, Brasil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 35(4): 315-322, jul-ago, 2002.

78- Herrera L, D'Andrea PS, Xavier SCC, Mangia RH, Fernandes O, Jansen AM. *Trypanosoma cruzi* infection in wild mammals of the National Park 'Serra da Capivara' and its surroundings (Piauí, Brazil), an area endemic for Chagas disease. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 99: 379-388, 2005.

79- Emperaire L. Végétation et gestion des ressources naturelles dans la caatinga du sud-est du Piauí (Brésil). Paris: ORSTOM, 1989.

80- Lemos JR. Composiçâo florística do Parque Nacional Serra da Capivara, Piauí, Brasil Rodriguésia 55(85):55-66, 2004

81- Censo - IBGE 2010. Disponível em: http://www.cidades.ibge.gov.br/xtras/home.php?lang=. Acessado em Maio de 2014.

82- Guidon N, Delebrias G. Carbon 14 dates point to man in the Americas 32.000 years ago. Nature, 321(6072): 769-771, 1995.

83- FMHA - Fundação Museu do Homem Americano. Parque Nacional Serra da Capivara. Teresina: Alínea Publicações, 1998.

84- Pessis AM. Parque Nacional Serra da Capivara: perfil sócio-econômico. Recife: FUMDHAM – SUDENE, 1998.

85- Brandão ML. Helmintos de mamíferos da região do Parque Nacional Serra da Capivara, sudeste do Piauí: Diversidade e influência antrópica. Dissertação de Mestrado. 79p. Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2007.

86- Chame M. Terrestrial Mammal Feces: a Morphometric Summary and Description. Mem Inst Oswaldo Cruz 98 (Suppl. I): 71-94, 2003.

87- Ramaiah N, De J. Unusual Rise in Mercury Resistant Bacteria in Coastal. Environments Microbial Ecology 45: 444-454, 2003.

88- Duque, SS. Estudo do gene merA em bactérias gram-negativas resistentes ao mercúrio isoladas de ecossistemas aquáticos brasileiros: contribuição para a mitigação dos riscos do mercúrio à saúde humana através da biorremediação. Teses apresentada no Curso de Doutorado em Saúde Pública da Escola Nacional de Saúde Pública, ENSP, RJ, 2012.

89- Costa GA, Hofer E. Isolamento e identificação de Enterobactérias. Monografia, Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 120 p. 1972.

90- Esteves WTC, Ferreira AP, Siciliano S. Potential Public Health impact of *Campylobacter* spp. Case study: lower course of São João river, RJ, Brazil. Caderno de Saúde Coletiva 19 (1): 74-81,2011.

91- Ballows A, Hausler Jr WJ, Herrmann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ. Manual of Clinical Microbiology. American Society for Microbiology, Washington, 1991.

92- Vilardo MCB, Thomé JDS, Esteves WTC, Lauria-Filgueiras AL & Oliveira SS. Application of biochemical and polymerase chain reaction assays for identification of *Campylobacter* isolates from non-human primates. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 101(5): 499-501, 2006.

93- King A. Recommendations for Susceptibility Tests on Fastidious Organisms and Those Requiring Special Handling. J. Antimicrob. Chemother. 48 Suppl 1: 77-80. 2001. Erratum In: J. Antimicrob. Chemother. 49(6): 1050, 2002.

94- Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. American Journal of Clinical Pathology. 45:493-496, 1966

95- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement. CLSI document M100-S23, USA, 2013.

96- Popoff MY. Antigenic formulas of *Salmonella* serovars, 8th ed. WHO Collaborating Center of Reference and Research on *Salmonella*, Institut Pasteur, Paris, France, 2001.

97- Magalhães VD, Ferreira, JC, Barelli C, Darini ALC. Pulsed field gel electrophoresis use in bacteriology – a technical review. Revista do Instituto Adolfo Lutz 64(2): 155-161, 2005.

98- Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swminathan B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial typing. Journal of Clinical Microbiology 33(9): 2233–2239, 1995.

99- Silva AS, Porto ER, Gomes PCF. Seleção de áreas de construção de barreiros para uso de irrigações de salvação no trópico semi-árido. Circular Técnica 3. Petrolina: EMBRAPA/CPATSA, 1981.

100- Jacobsen CS, Bech TB. Soil survival of Salmonella and transfer to freshwater and fresh produce. Food Research International, 45: 557–566, 2012.

101- Hafez EE, Elbestawy E. Molecular Characterization of Soil Microorganisms: Effect of Industrial Pollution on Distribution and Biodiversity. World Journal of Microbiology and Biotechnology 25: 215-224, 2008.

102- Marino RP, Gannon JJ. Survival of faecal coliform and faecal Streptococci in storm drains sediment. Water Research 25(9): 1089-1098, 1991.

103- Kebabijian R. Monitoring the effects of urban runoff on recreational water, Journal of Environmental Health 56: 15-18, 1994.

104- Crabill C, Donald R, Snelling J, Foust R, Southam G. The impact of sediment fecal coliform reservoirs on seasonal water quality in Oak Creek, Arizona. Water Research, 33: 2163-2171, 1999.

105- Poma HR, Cacciabue DG, Garcé B, Gonzo EE, Rajal VB. Towards a rational strategy for monitoring of microbiological quality of ambient waters. Science of the Total Environment 433: 98–109, 2012.

106- Jones K. Campylobacters in water, sewage and the environment. Journal of Applied Microbiology 90: 68S-79S, 2001.

107- Threlfall EJ. Antimicrobial drug resistence in *Salmonella*: Problems e perspectives in food and water-borne infection. Fems Microbiology Reviews 26: 141-148, 2002.

108- Palhares JCP, Kich JD, Bessa MC, Biesus LL, Berno LG, Triques NJ. Salmonella and antimicrobial resistance in an animal-based agriculture river system. Science of the Total Environment 472: 654–661, 2014.

109- Swanson SJ, Snider C, Braden CR, Boxrud D, Wünschmann A, Rudroff JA, Lockett J, Smith KE. Multidrug-resistant *Salmonella* enteric serotype Typhimurium associated with pet rodents. The New England Journal of Medicine 356: 21-28, 2007.

110- Martinez-Urtaza J, Saco M, Novoa J, Perez-Piñeiro P, Penteado J, Lozano-Leon A, Garcia-Martin O. Influence of environmental factors and human activity on the presence of *Salmonella* serovars in a marine environment. Applied and Environmental Microbiology 70: 2089-2097, 2004.

111- Singh R, Yadav AS, Tripathi V, Singh RP. Antimicrobial resistance profile of *Salmonella* present in poultry and poultry environment in north India. Food Control 33: 545-548, 2013.

112- Arvantidou M, Kanellou K, Vagionda DG. Diversity of *Salmonella* spp. and fungi in northern Greek rivers and their correlation to fecal pollution indicators. Environmental Research 99: 278-284, 2005.

113- Rodrigues DP, Solari CA, Ribeiro RV, Costa JECM, Reis EMF, Silva SJ, Hofer E. *Salmonella* em água de praias no município do Rio de Janeiro, RJ. Revista de Microbiologia 20: 12-17, 1989.

114- Martins MT, Pessoa GVA, Sanchez OS, Sato MI, Monteiro CK, Coimbrão CA, Marques E. Isolamento de *Salmonella* no ambiente aquático: significado sanitário. Revista de Microbiologia 19: 29-39, 1988.

115- Farias EWC. Pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* spp e *Salmonella* spp. em amostras de águas de esgoto e águas de córrego da cidade de São Paulo. Dissertação (Mestrado em Ciências) – São Paulo, Universidade de São Paulo, 97p. 2000.

116- Geue L, Löschner U. *Salmonella enterica* in reptiles of German and Austrian origin. Veterinary Microbiology 84: 79–91, 2002.

117- Mermin J, Hutwagner L, Vugia D, Shallow S, Daily P, Bender J, Koehler J, Marcus R, Angulo, FJ. Reptiles, Amphibians, and Human Salmonella Infection: A Population-Based, Case-Control Study for the Emerging Infections Program FoodNet Working Group. Journal of Clinical Infectious Diseases 38(Suppl 3): S253–61, 2004.

118- Mezal EH, Stefanova R, Khan AA. Isolation and molecular characterization of *Salmonella enterica* serovar Javiana from food, environmental and clinical samples. International Journal of Food Microbiology 164: 113–118, 2013.

119- WHO. World Health Organization. Critically important antibacterial agents for human medicine: categorization for the development of risk management strategies to contain antimicrobial resistance due to nonhuman use. Report of the second WHO Expert Meeting, Copenhagen, 2007. Disponível em http://www.who.int/foodborne_disease/ resistance/antimicrobials_ human.pdf. Acessado em Dezembro de 2012.

120- Tenover FC. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria. The American Journal of Medicine 119: S3–S10, 2006.

121- Fonseca EL, Mykytczuk O L, Asensi MD, Reis EMF, Ferraz LR, Paula FL, Ng LK, Rodrigues DP. Clonality and Antimicrobial Resistance Gene Profiles of Multidrug Resistant *Salmonella enterica* Serovar Infantis Isolates from Four Public Hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. Journal of Clinical Microbiology 44: 2767–2772, 2006.

122- Agada GOA, Abdullahi IO, Aminu M, Odugbo M, Chollom SC, Kumbish PR, Okwori AEJ. Prevalence and Antibiotic Resistance Profile of *Salmonella* Isolates from Commercial Poultry and Poultry Farm-handlers in Jos, Plateau State, Nigeria. British Microbiology Research Journal 4(4): 462-479, 2014.

123- Bonelli RR, Moreira BM, Picão RC. Antimicrobial resistance among Enterobacteriaceae in South America: History, current dissemination status and associated socioeconomic factors. Drug Resistance Updates 17(1-2): 24-36, 2014.

124- Lai J, Wu C, Wu C, Qi J, Wang H, Liu Y, Shen J. Serotype distribution and antibiotic resistance of *Salmonella* in food-producing animals in Shandong province of China, 2009 and 2012. International Journal of Food Microbiology 180: 30–38, 2014.

125- Kich JD, Coldebella A, Morés N, Nogueira MG, Cardoso M, Fratamico PM, Call JE, Fedorka-Cray P, Luchansky JB. Prevalence, distribution, and molecular characterization of *Salmonella* recovered from swine finishing herds and a slaughter facility in Santa Catarina, Brazil. International Journal of Food Microbiology 151: 307–313, 2011.

126- Hanberger H, Fredriksson M, Ternhag A, Giske CG. Rational use of amino-glycosides – author response. Scand. J. Infect. Dis. 45: 655–656, 2013.

127- Gales AC, Castanheira M, Jones RN, Sader HS. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SEN-TRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008–2010). Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 73: 354–360, 2012.

128- Campioni F, Moratto Bergamini AM, Falcão JP. Genetic diversity, virulence genes and antimicrobial resistance of *Salmonella* Enteritidis isolated from food and humans over a 24-year period in Brazil. Food Microbiol. 32: 254–264, 2012.

129- Wheeler E, Hong PY, Bedon LC, Mackie RI. Carriage of antibiotic-resistant enteric bacteria varies among sites in Galapagos reptiles. Journal of Wildlife Diseases 48: 56–67, 2012.

130- Andersen SB, Hughes DP. Host specificity of parasite manipulation –zombie ant death location in Thailand vs. Brazil. Communicative & Integrative Biology 5: 1–3, 2012.

131- Nuñez L, Moretton J. Disinfectant-resistant bacteria in Buenos Aires city hospital wastewater. Brazilian Journal of Microbiology 38: 644-648, 2007.

132- Picao RC, Cardoso JP, Campana EH, Nicoletti AG, Petrolini FV, Assis DM, Juliano L, Gales AC. The route of antimicrobial resistance from the hospital effluent to the environment:

focus on the occurrence of KPC-producing *Aeromonas* spp. and Enterobacteriaceae in sewage. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 76: 80-85, 2013.

133- Walsh TR, Toleman MA. The emergence of pan-resistant Gram-negative pathogens merits a rapid global political response. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 67: 1–3, 2012.

134- Bass L, Liebert CA, Lee MD, Summers AO, White DG, Thayer SG, Maurer JJ. Incidence and Characterization of Integrons, Genetic Elements Mediating Multiple-Drug Resistance, in Avian *Escherichia coli*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 43: 2925–2929, 1999.

135- Allen HK, Donato J, Wang HH, Cloud-Hansen KA, Davies J, Handelsman J. Call of the Wild: Antibiotic Resistance Genes in Natural Environments. Nature Reviews Microbiology 8: 251-259, 2010.

136- Economou V, Gousia P, Kansouzidou A, Sakkas H, Karanis P, Papadopoulou C. Prevalence, antimicrobial resistance and relation to indicator and pathogenic microorganisms of *Salmonella enterica* isolated from surface waters within an agricultural landscape. International Journal of Hygiene and Environmental Health 216: 435–444, 2013.

137- Moura APBL, Pinheiro Junior JW, Oliveira RBA, Duarte DAM, Ribeiro AR, Reis EMF. Pesquisa de coliformes termotolerantes, totais e *Salmonella* spp. em carnes caprinas comercializadas na cidade do Recife, Pernambuco. Arq. Inst. Biol., São Paulo, 74: 293-299, 2007.

138- Tavechio AT, Ghilardi AC, Peresi JT, Fuzihara TO, Yonamine EK, Jakabi M, Fernandes SA. *Salmonella* serotypes isolated from nonhuman sources in São Paulo, Brazil, from 1996 through 2000. Journal of Food Protection 65(6): 1041-1044, 2002.

139- Tirolli ICC, Costa CA. Ocorrência de *Salmonella* spp. em carcaças de frangos recém abatidos em feiras e mercados da cidade de Manaus-AM. Acta Amazonica 36(2): 205 – 208, 2006.

140- Moreira GN, Rezende CSM, Carvalho RN, Mesquita SQP, Oliveira ANA, Tadaieski ML. Ocorrência de *Salmonella* sp. em carcaças de frango abatidos e comercializados em municípios do estado de Goiás. Revista do Instituto Adolfo Lutz; 67 (2):126-130, 2008.

141- Micallef SA, Goldstein RER, George A, Kleinfelter L, Boyer MS, McLaughlin CR, Estrin A, Ewing L, Beaubrun JJ, Hanes DE, Kotharye MH, Tall BD, Razeq JH, Joseph SW, Sapkota AR. Occurrence and antibiotic resistance of multiple Salmonella serotypes recovered from water, sediment and soil on mid-Atlantic tomato farms. Environmental Research 114: 31–39, 2012.

142- Vereen Jr E, Lowrance RR, Jenkins MB, Adams P, Rajeev S, Lipp EK. Landscape and seasonal factors influence *Salmonella* and *Campylobacter* prevalence in a rural mixed use watershed. Water Research 47 (16): 6075–6085, 2013.

143- Sinton L, Hall C, Braithwaite R. Sunlight inactivation of *Campylobacter jejuni* and *Salmonella enterica*, compared with *Escherichia coli*, in seawater and river water. Journal Water Health 5(3): 357-65, 2007.

144- Chandran A, Hatha AAM. Relative survival of *Escherichia coli* and *Salmonella* Typhimurium in a tropical estuary. Water Research 39(7): 1397–1403, 2005.

145- Hofer E, Silva Filho SJ, Reis, EMF. Prevalência de sorovares de *Salmonella* isolados de aves no Brasil. Pesquisa Veterinária Brasileira. 17:55-62, 1997.

146- Hofer E. & Costa GA. Investigação sobre a ocorrência de *Salmonella* em esgotos sanitários da cidade do Rio de Janeiro. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 70:221-236, 1972.

147- Loureiro ECB, Marques NDB, Ramos FLP, Reis EMF, Rodrigues DP, Hofer E. Sorovares de Salmonella de origem humanas identificadas nos períodos de 1991 a 2008. Revista PanAmazônica de Saúde 1:93-100,2010.

7. ANEXOS

Anexo I

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Ministério da Saúde
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ – FIOCRUZ
Escola Nacional de Saúde Pública
Departamento de Endemias Samuel Pessoa

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Prezado Senhor(a),

Você está sendo convidado (a) para participar da pesquisa de doutorado intitulada "**Circulação de Bactérias potencialmente patogênicas no Parque Nacional Serra da Capivara: Sua prospecção no Trinômio Zoonótico: Homem, Animal, Ambiente".**

Você foi selecionado(a) para participar desta pesquisa em virtude de sua residencia não apresentar rede publica de abastecimento e distribuição de água e esgoto, mas sua participação não é obrigatória. A qualquer momento você pode desistir de participar e retirar seu consentimento. Sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador ou com a Fundação Oswaldo Cruz.

O objetivo deste estudo é analisar a presença e circulação de bactérias potencialmente enteropatogênicas e zoonóticas, da região do Parque Nacional Serra da Capivara, sudeste do Piauí.

Sua participação nesta pesquisa consistirá em receber material para realizar, você mesmo, a coleta de suas fezes frescas. Para a coleta deste material basta apenas encostar a superfície absorvente do utensilio de coleta, uma haste macia recoberta por algodão estéril - um swab, nas fezes frescas produzidas em qualquer local e introduzir esta haste no meio de transporte que estará acondicionado junto com a haste. Para os indivíduos participantes da pesquisa que fornecerem material fecal e que apresentarem positividade para os gêneros de bacterianos patogênicos serão orientados a procurar serviço de saúde mais próximo.

Os resultados obtidos serão divulgados por meio do trabalho final de doutorado e, também, através de artigos científicos e apresentações em congressos.

Você receberá uma cópia deste termo, onde constam o telefone e o endereço do pesquisador responsável. Quaisquer dúvidas que você tenha sobre o estudo ou sobre sua participação poderão ser esclarecidas a qualquer momento.

Eu, _____, identidade nº _____, órgão expeditor _____, declaro ter lido este documento e ter sido informado pelo pesquisador responsável pelo estudo, sobre o protocolo de pesquisa no qual serei incluído(a), bem como sobre minha participação no projeto.

_____

Assinatura do entrevistado

Em caso de responsável por menor, participante da pesquisa com menos de 18 anos de idade, favor preencher está área:

Nome do Menor: _____

Responsável: _____

_____

Assinatura do Responsável

_____

Assinatura do pesquisador

Jacqueline Darc da Silva Thomé

Endereço do pesquisador
Fundação Oswaldo Cruz
Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca
Rua Leopoldo Bulhões, 1480 **–** Manguinhos Térreo - Laboratório de Ecologia
Rio de Janeiro – RJ CEP: 21040-900
Tel: (21) 2598-2666 / 2671

Em caso de dúvida quanto à condução ética do estudo, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da ENSP:

Rua Leopoldo Bulhões, 1.480 - Térreo
Manguinhos - Rio de Janeiro - RJ / CEP. 21041-210
Tel e Fax - (21) 2598-2863
Mail : cep@ensp.fiocruz.br
http://www.ensp.fiocruz.br/etica

Anexo II

TESTE DE SUSCETIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS[89]

A. Preparo da Suspensão Bacteriana:

1. Suspender colônias puras e isoladas em tubos contendo 4 mL de Caldo Mueller-Hinton (Oxoid, Estados Unidos), com o auxilio de uma alça bacteriológica;

2. Incubar os tubos em estufa bacteriológica a 37°C por 2 a 6 horas;

3. Comparar, a cada 2 horas, a turvação da suspensão com a escala 0,5 de Mc Farland (BioMerieux), equivalente a 1,5 X 10^8 células bacterianas/mL;

4. Realizar a semeadura quando a suspensão bacteriana alcançar a turvação predeterminada.

B. Preparo do Meio de Cultura

1. Preparar e esterilizar, de acordo com as recomendações do fabricante, o ágar Mueller-Hinton (Oxoid);

2. Distribuir em placas de Petri estéreis de 20x100 mm de diâmetro, um volume de aproximadamente 20 mL, visando obtenção de camada interna de 4 mm de profundidade.

C. Semeadura da Bactéria e Aplicação dos Discos Impregnados com os Antimicrobianos:

1. Semear a suspensão bacteriana em induto contínuo sobre a superfície da placa de ágar Mueller-Hinton (Oxoid) utilizando um swab estéril;

2. Depositar sobre a superfície da placa semeada os discos de papel de filtro impregnados com os antimicrobianos: Ampicilina (10 μg), Ácido Nalidixico (30 μg), Cefoxitina (30 μg), Ceftaxidima (30 μg), Ciprofloxacina (10 μg), Gentamicina (10 μg), Imipenem (10 μg), Estreptomicina (10 μg), Cloranfenicol (30 μg), Sulfametoxazol-Trimetoprim (25 μg), Tetraciclina (30 μg) e Nitrofurantoina (300 μg), oriundos da Oxoid, tendo o cuidado de aplicar seis discos por placa, para evitar a sobreposição de halos, que dificultaria a leitura e a interpretação do teste;

3. Utilizar a cepa-padrão *Escherichia coli* ATCC 25922 como amostra controle do experimento;

4. Incubar as placas em estufa bacteriológica a 35° C durante 18 horas.

D. Leitura e Interpretação dos Resultados:

1. Medir o tamanho da zona de inibição do crescimento bacteriano (em milímetros) para cada antibiótico testado com o auxílio de um paquímetro digital (Mitutoyo, Japão);

2. Interpretar a medida do halo de inibição do crescimento bacteriano seguindo as orientações do manual CLSI, 2013 comparando-os com a tabela dos valores de referência. As amostras bacterianas são Sensíveis quando o antimicrobiano é capaz de inibir seu crescimento; são Resistentes quando crescem na presença da droga; e apresentam suscetibilidade Intermediaria quando sofrem alguma inibição de crescimento, expressa por um diâmetro do halo de inibição reduzido.

Anexo III

TÉCNICA E PROCEDIMENTO PFGE PARA *Salmonella* spp.[92]

A) Preparação de Plugues e Lise Celular:

1. Cultivar as amostras em placas de TSA (*Tryptic Soy Agar*). Antes, é importante testar a pureza das colônias e repicar em mais de um tubo para obter crescimento confluente, de modo a assegurar que a mesma colônia possa ser testada novamente, se necessário. Incubar as culturas a 37°C durante 14-18 horas;

2. Remover as células do crescimento bacteriano usando um *swab* estéril e suspender em 2 mL de tampão de suspensão de células (CSB). Utilizando um espectrofotômetro, ajustar a densidade óptica para 610 nm de comprimento de onda;

3. Ajustar a suspensão de 400 µL de células e transferir para um tubo de centrífuga de 1,5 mL contendo 20 µL de proteinase K, a partir de solução mãe de (20 mg/mL), e homogeneizar delicadamente por pipetagem com 400 µL de agarose 1% (Seakem Gold);

4. Dispensar a mistura nas cavidades de um molde reutilizável, deixando-a solidificar à temperatura ambiente durante 10-15 minutos;

5. Transferir os plugues formados para um tubo de centrífuga de 50 mL contendo 5 mL de tampão de lise celular e 25 µL de proteinase K. Incubar os tubos por período de 2 horas com agitação (150-175 rpm). Preaquecer um volume de água ultrapura estéril a 54-55°C para que plugues possam ser lavados 2 vezes com 10-15 ml de água;

6. Remover os tubos da incubadora e, cuidadosamente, despejar o tampão de lise em um recipiente de descarte apropriado. Adicionar 10 mL de água ultrapura preaquecida (50°C);

7. Devolver os tubos para a incubadora e deixar agitar a 200 rpm durante 10-15 minutos a 50°C;

8. Remover a água e repetir a fase anterior;

9. Remover a água novamente e adicionar 10 mL de tampão TE preaquecido (50°C). Os tubos devem voltar para a incubadora e deixar agitar a 200 rpm durante 10-15 minutos a 50°C;

10. Decantar o tampão TE e repetir o passo anterior por mais três vezes;

11. Na última lavagem, adicionar 10 mL de tampão de TE estéril. Após a última lavagem, as amostras podem ser digeridas imediatamente, adicionando a enzima XbaI (50 U/amostra) e aguardando 2 horas, ou podem ser armazenadas sob refrigeração (4°C).

B) Restrição/Digestão do DNA em Plugues de Agarose com XbaI

1) Uma lâmina de 2.0 a 2.5 mm de largura é cortada a partir do Plugues de agarose de cada isolado;

2) Adicionar 200 µl de tampão de restrição contendo a enzima XbaI diluída (1 X) para tubos de microcentrífuga de 1,5 ml já rotulados.

3) Incubar os tubos por um período de 2 horas a 37°C.

C) Preparação e Carregamento do Gel no Sistema PFGE:

1) O tampão de restrição é substituído por 200 µL de TBE 0,5 X e incubado a temperatura ambiente durante 5 minutos.

2) Os tampões são removidos do tubo e colocados sobre o pente. Os plugues são selados no pente, adicionando agarose a 1 % (Seakem Gold).

3) Enquanto o gel solidifica, prepara-se 100 mL de agarose a 1% (Seakem Gold) para verter na caixa de envase do gel montado. Adiciona-se 2000 mL de TBE 0,5 X à câmara de eletroforese;

4) O pente é removido e os poços são preenchidos com gel de agarose a 1% (Seakem Gold). Em seguida, o gel é colocado na câmara de PFGE.

5) As configurações para o sistema de electroforese CHEF - DR III seguiram os seguintes padrões:

Tempo de troca inicial: 2,2 s

Tempo final: 63,8 s

Tensão: 6 V

Ângulo incluído: 120 °

Duração: 19 horas

6) Depois de 19 h, o gel é removido da caixa e corado durante 30 minutos com brometo de etídio (10 mg/ml). O gel é lavado a cada 20 minutos durante 1 hora com 500 mL de água ultrapura.